



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

FARELO DE ARROZ FERMENTADO: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

ANELISE CHRIST RIBEIRO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES

Orientadora

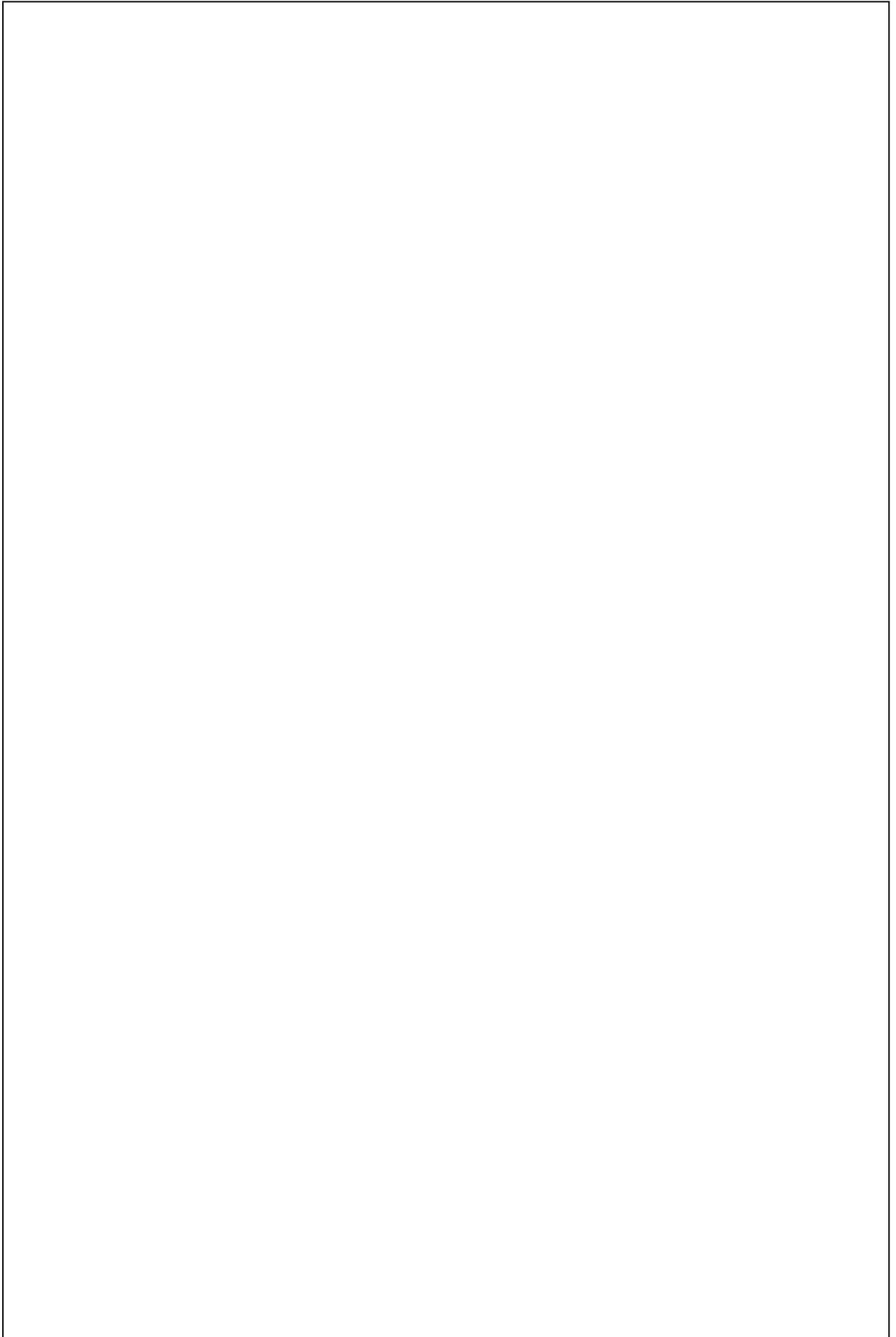
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS-MELLADO

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2018







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

FARELO DE ARROZ FERMENTADO: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

ANELISE CHRIST RIBEIRO

Tese apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção  
do título de doutor em  
Engenharia e Ciência de  
Alimentos.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES  
Orientadora

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS-MELLADO  
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2018



## Ficha catalográfica

R484f Ribeiro, Anelise Christ.  
Farelo de arroz fermentado : caracterização, avaliação biológica e aplicação tecnológica / Anelise Christ Ribeiro. – 2018.  
140 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.  
Orientadora: Dra. Leonor Almeida de Souza Soares.  
Coorientadora: Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado.

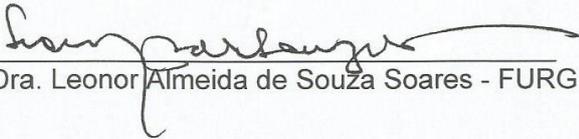
1. Digestibilidade 2. Insetos 3. Microrganismos 4. Minerais 5. Nutrição I. Soares, Leonor Almeida de Souza II. Salas-Mellado, Myriam de las Mercedes III. Título.

CDU 633.18

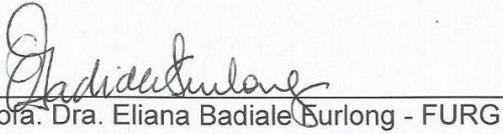


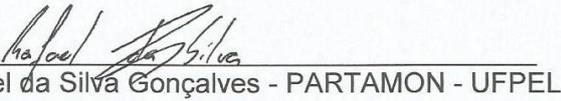
**APROVAÇÃO**

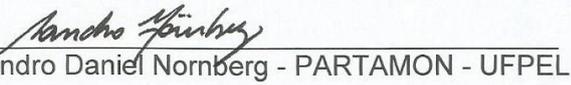
Tese defendida por Anelise Christ Ribeiro aprovada em 12 de julho de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

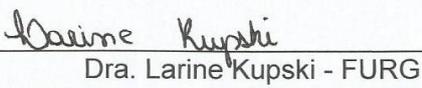
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares - FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eliana Badiale Burlong - FURG

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael da Silva Gonçalves - PARTAMON - UFPEL

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sandro Daniel Nornberg - PARTAMON - UFPEL

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Larine Kupski - FURG



*À minha mãe Eliana, minha irmã Gisele, meu esposo Rafael e minha filha Maria Antônia.*



## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e saúde, por me amparar e dar força para superar as dificuldades e me suprir em todas as minhas necessidades. Por ter me dado uma família, amigos e colegas maravilhosos.

À minha mãe Eliana, um ser iluminado ao qual tive a benção de poder ter como mãe e outras funções a qual ela desempenhou com todo amor e carinho durante todos esses anos. É o meu Deus na terra. Obrigado por tudo e para sempre amo-te “mil mundos colados” como desde pequena.

À minha irmã Gisele, por ser muito importante na minha vida. Obrigado por tudo que fizeste por mim. Por às vezes deixar teus afazeres de lado pra me auxiliar, por toda atenção dada. Amo-te muito e para sempre.

Ao meu marido Rafael, agradeço por toda a paciência que tiveste comigo, por seres essa pessoa maravilhosa e por me tratares como rainha e ter me dado uma princesa. Obrigado por ser perfeito para mim, o amor da minha vida.

À minha filha Maria Antônia, o motivo pelo qual sou imensamente feliz. Meu maior presente, minha melhor criação. Apesar de ser pequena, foste a minha maior fonte de ensinamento.

Minha companheira de todas as horas. A minha princesa! Minha vida toda por ti!

À minha família Eloí, Carlos Tadeu, Rodrigo, Rafaela, Eduardo, Carolina, João Guilherme, Manuela, por todo o apoio durante todos esses anos. Amo vocês.

Por vocês todos que sempre fui e voltei de Rio Grande durante esses anos todos. Amo vocês eternamente e sem vocês minha vida não teria sentido!

À minha orientadora Leonor, pessoa a qual não tenho palavras pra agradecer, que me acolheu e me fez acreditar que seria capaz de chegar aqui. Por toda a força e incentivo dado, se um dia conseguir chegar a ser a metade da mulher que és serei muito feliz e realizada. Admiro-te muito e almejo ser uma pessoa maravilhosa e profissional assim como és. A minha co-orientadora, prof.<sup>a</sup> Myriam, que é uma inspiração, pelo conhecimento e bom humor. Agradeço por todos os ensinamentos e pela amizade e carinho que sempre me foi ofertado.

À prof. Eliana pelo conhecimento, conselhos e amizade. Se não fosse o teu convite para trabalhar no laboratório com certeza hoje eu não estaria escrevendo esta tese e descoberto este mundo que tanto amo. Que possamos trilhar um caminho de muitas conquistas daqui pra frente. Sou eternamente agradecida por tudo.

À prof. Jaqueline pelo conhecimento, conselhos e amizade. Tu não sabes o quanto foste importante pra mim nessa trajetória de 4 anos. Muitas vezes o meu conforto vinha através dos teus olhos. Muito obrigada!

À Larine pela amizade, incentivo, conhecimento e inspiração. Obrigado por abrires mão muitas vezes dos teus afazeres para ajudar nos meus. A tua presença me alegra e ilumina.

À Kelly que me socorre sempre, pessoa de extrema capacidade e conhecimento, não sei o que seria de mim sem a tua presença no laboratório.

Amo muito vocês! Só Deus sabe o quanto sou agradecida por vocês fazerem parte da minha vida e o quanto lutarei pra que continuem nela.

À Maristela, anjo que Deus enviou para nos auxiliar. A tua ternura e paciência são os segredos do nosso sucesso no laboratório.

À Lidiane pela amizade, parceria e orientações. Posso afirmar que se este trabalho foi concluído foi graças a tua ajuda e dedicação. Morro de saudades tuas! Fica o meu muito obrigado.

Aos queridos amigos Rafael e Sandro, vocês foram a melhor surpresa no decorrer do meu doutorado. Deram-me incentivo e ânimo. Espero juntos, alcançarmos o sucesso! Obrigada!

Às minhas “Caróis”, como tive sorte de tê-las trabalhando comigo, extremamente dedicadas e capazes. Tenho certeza que tudo que depender de vocês se tornará um sucesso! Grata!

Às parcerias neste trabalho Fábio Andrei, Fábio Chaves, Helen Hackbart, Michele Coelho, Cristiano Ferreira, Dori Nava, Rafael Gonçalves, Sandro Nornberg e Deschamps, obrigada por tudo, por todas a ajuda. Vocês fazem parte deste trabalho. Obrigado por toda ajuda!

Às minhas caroneiras maravilhosas, Andressa, Gabriela e Hallal por muitas vezes vocês tornaram os meus dias mais felizes, meu dia começa animado quando estou com vocês. Obrigada pela amizade!

Aos colegas de laboratório Sabrina, Rafaela, Xicão, Vic, “Elisabeth”, Verônica, Marcy, Priscila, Marina, Carmen, “Karencita”, Fran, Wesclen, “Maicoff”, “Craudia”, Julio, Taiana, Kevin, Rafa e todos os demais que ainda estão ou já saíram, sem vocês os dias teriam sido menos alegres e obrigado por aturarem a mim e as minhas brincadeiras. Acreditem, da nossa convivência, sempre algo bom de vocês ficou em mim.

Às amigas do vale night Déborah, Dênis, Sabrine, Fran, Carol, Andressa, Gabi e Mari as noites em que saímos juntas é muito bom e é um prazer poder conviver com vocês. A Náthali e Annie que mesmo de longe sempre torcem por mim. Muito obrigada!

À FURG, aos professores e amigos do curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. À Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aquele que de alguma forma contribuíram com este trabalho!!!

*“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes”*

Martin Luther King Jr.



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b> - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.....	49
<b>Tabela 2</b> - Condições operacionais do equipamento de ICP OES.....	50
<b>Tabela 3</b> - Composição proximal do farelo fermentado integral (FI) e farelo desengordurado (FD) durante a fermentação e não fermentado (NF).....	52
<b>Tabela 4</b> - Teor de minerais em farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação por 0, 24, 48, 72 e 96 h e farelo não fermentado (NF).....	54
<b>Tabela 5</b> - Valores de minerais em farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação por 0h e 96 h em comparação com o índice de Ingestão Diária Recomendado.....	56

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b> - Programa de aquecimento do micro-ondas.....	71
<b>Tabela 2</b> - Condições de operações do ICP OES* .....	71
<b>Tabela 3</b> - Composição proximal (%) de FI, FD fermentados e não fermentado (NF), submetidos a diversos tempos de fermentação.....	75
<b>Tabela 4</b> - Teor de minerais em farelo de arroz integral (FI), desengordurado (FD) fermentados e não fermentado (NF) durante a fermentação.....	77

### ARTIGO 3

<b>Tabela 1</b> - Composição das dietas artificiais avaliadas para a produção larval de <i>C. capitata</i> .....	90
<b>Tabela 2</b> - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão <i>in vitro</i> .....	92
<b>Tabela 3</b> – Área (10 <sup>6</sup> ) dos metabólitos da digestibilidade.....	96
<b>Tabela 4</b> – Correlação de Pearson dos nutrientes identificados pela análise metabolômica....	97
<b>Tabela 5</b> – Composição proximal (%) de larvas de <i>C. capitata</i> nutridos com as diferentes dietas.....	99

**ARTIGO 4**

<b>Tabela 1</b> - Formulações dos cookies padrão (F0) e com farelo fermentado (F1, F2, F3).....	111
<b>Tabela 2</b> - Resultado do questionário formulado para avaliar o perfil do público consumidor.....	116
<b>Tabela 3</b> - Atributos sensoriais avaliados nas formulações de cookies padrão (F0) e com farelo fermentado com <i>S. cerevisiae</i> (F1, F2, F3).....	117
<b>Tabela 4</b> - Índices de aceitabilidade e de intenção de consumo (%) dos cookies padrão (F0) e com farelo fermentado com <i>S. cerevisiae</i> (F1, F2, F3).....	117
<b>Tabela 5</b> - Atributos sensoriais avaliados e índice de aceitabilidade dos cookies com 25% de farelo fermentado por <i>R. oryzae</i> (RO).....	118
<b>Tabela 6</b> – Composição proximal das diferentes formulações dos cookies.....	119
<b>Tabela 7</b> – Teor e perfil dos compostos fenólicos extraídos das diferentes formulações de cookies.....	120
<b>Tabela 8</b> - Atividade antioxidante dos compostos fenólicos (20µL) extraídos das diferentes formulações de cookies.....	120
<b>Tabela 9</b> - Avaliação da vida de prateleira de cookies elaborados com farelo de arroz fermentado com <i>S. cerevisiae</i> durante 90 dias.....	122

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Constituintes do grão de arroz.....29

**Figura 2** - Fases do ciclo biológico de *Ceratitits capitata*. (A) Adultos – macho à esquerda e fêmea à direita); (B) ovo; (C) larva; (D) pupário.....38

### ARTIGO 1

**Figura 1** - Compostos fenólicos de farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação e não fermentado (NF).....59

### ARTIGO 2

**Figura 1** – Compostos fenólicos extraídos de FI e FD fermentados por *S. cerevisiae* durante 8h.....78

### ARTIGO 4

**Figura 1** - Questionário formulado para avaliar o perfil do público consumidor de panificáveis na cidade de Alegrete, RS.....110

**Figura 2** - Ficha utilizada para os testes de aceitação de intenção de consumo dos cookies.....112



## Sumário

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>25</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
3.1 ARROZ.....	27
3.2 FARELO DE ARROZ .....	27
3.3 BENEFÍCIOS DO FARELO DE ARROZ.....	29
3.4 FUNGOS.....	30
3.4.1 <i>Rhizopus oryzae</i> .....	31
3.4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
3.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	33
3.6 NUTRIENTES E METABOLISMO.....	34
3.7 DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i> X <i>in vivo</i> .....	35
3.8 INSETOS <i>S. oryzae</i> e <i>C. capitata</i> NA DIGESTIBILIDADE. <i>in vivo</i> .....	36
3.9 SUPLEMENTAÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA.....	39
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO I: INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR <i>Rhizopus oryzae</i> SOBRE A DISPONIBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E DESENGORDURADO.....</b>	<b>43</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>45</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
2.1 MATERIAL.....	48
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	48
2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS FARELOS.....	49
2.4 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS.....	49
2.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	50
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
3.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL.....	51
3.2 DISPONIBILIZAÇÃO DE MINERAIS.....	54
3.3 DISPONIBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	60

<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>5. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

**ARTIGO II: INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR *Saccharomyces cerevisiae* NA AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E DESENGORDURADO.....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
2.1 MATERIAL.....	71
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	71
2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS FARELOS.....	71
2.4 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS.....	71
2.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	73
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

**ARTIGO 3: DIGESTIBILIDADE *in vitro* E *in vivo* DE FARELOS DE ARROZ FERMENTADOS.....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>85</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
2.1 MATERIAL.....	88
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	88
2.3 ELABORAÇÃO DAS DIETAS E DIGESTIBILIDADE IN VIVO.....	89
2.3.1 Gorgulhos de arroz ( <i>Sitophilus oryzae</i> ).....	89
2.3.2 <i>Ceratitidis capitata</i> .....	89
2.3 TOXICIDADE DOS FARELOS FERMENTADOS.....	90
2.4 DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i> .....	91
2.5 METABOLÔMICA.....	93
2.6 COMPOSIÇÃO PROXIMAL.....	94
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	94
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>

**ARTIGO 4: ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DE BISCOITOS TIPO COOKIE COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>106</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>109</b>
2.1 MATERIAL.....	109
2.2 PESQUISA DE MERCADO.....	109

2.3 FERMENTAÇÕES DO FARELO DE ARROZ.....	110
2.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BISCOITOS TIPO COOKIE COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	111
2.4.1 Análise sensorial dos cookies com farelo de arroz fermentado.....	112
2.4.2 Composição proximal dos cookies com farelo de arroz fermentado.....	113
2.4.3 Extração, quantificação e perfil dos compostos fenólicos extraídos dos cookies com farelo de arroz fermentado.....	113
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	114
2.5.1 Atividade antioxidante por DPPH.....	114
2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS.....	114
2.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	115
..7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	115
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
3.1 PESQUISA DE MERCADO.....	115
3.2 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	116
3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	118
3.4 EXTRAÇÃO, PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ.....	119
3.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	121
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>129</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>133</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>135</b>



## **CAPÍTULO I**

**RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**



## RESUMO

O farelo de arroz é um coproduto do processo de polimento do arroz integral e representa cerca de 10% do produto descascado. O estado do Rio Grande do Sul se destaca no cultivo deste grão que origina proporções variáveis de coprodutos. Várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de avaliar seu potencial para alimentação humana. Dentro deste contexto, a fermentação em estado sólido é uma possível alternativa para disponibilizar teores destes compostos, como também o teor de fibras, melhorar a digestibilidade do farelo de arroz. O objetivo do estudo foi obter uma fonte alternativa para alimentação humana pela utilização do farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* avaliando sua composição proximal, perfis minerais, de fitoquímicos e digestibilidade *in vitro* e *in vivo*. As matérias primas utilizadas como substrato foram o farelo de arroz integral e o desengordurado. Para a fermentação com *R. oryzae*, os substratos foram acondicionados em biorreatores de bandeja e autoclavados antes da adição das soluções nutrientes e de esporos, cuja concentração inicial foi a de  $4 \times 10^6$  esporos. g de farelo<sup>-1</sup>. Para a fermentação com a levedura os farelos de arroz foram acondicionados e autoclavados, utilizando *S. cerevisiae* (3% pp<sup>-1</sup>) e água (30%). A avaliação da composição proximal e perfil de minerais foi realizada de acordo com A.O.A.C., determinando os elementos Ca, Fe, Mg, Na, P, S, Cr, Cu, Mn, Sr e Zn por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivo (ICP-OES). Além disso, as amostras fermentadas foram submetidas a testes de digestibilidade *in vitro* que consiste na utilização de sucos sintéticos simulando as etapas da digestão e à digestibilidade *in vivo* utilizando insetos (*Ceratitidis capitata*). Essas foram submetidas à análise de metabolômica por CG-EM. Foi ainda elaborado um cookie utilizando o farelo de arroz fermentado e avaliando sua composição, aceitação e consumo, vida de prateleira, contaminação microbiológica e bioatividade. A fermentação utilizando o *Rhizopus oryzae* aumentou os teores de lipídios, proteínas, fibras e os minerais, exceto cálcio e ferro, durante a fermentação. Os compostos fenólicos aumentaram após 48 h de fermentação para ambos os farelos. A utilização de *S. cerevisiae* promoveu o aumento de cinzas, proteínas e compostos fenólicos, em 5%, 62% e 10%, respectivamente no farelo de arroz integral fermentado por 6 h. Para o farelo desengordurado acarretou no aumento de lipídeos em 38% e fibras em 14%. Os compostos fenólicos foram extraídos em maior proporção no farelo de arroz integral fermentado em 6 h. Por meio da análise metabolômica foi possível evidenciar a eficiência da análise de metabólitos originados da digestibilidade *in vitro* e *in vivo* estudados (glicídios, aminoácidos, ácidos, ácidos graxos e álcoois). Os cookies com 25% de farelo de arroz fermentado apresentaram os melhores resultados. Destacando o de arroz fermentado por *R. oryzae* que obteve melhor avaliação global e aceitabilidade na análise sensorial, maior disponibilidade de nutrientes e atividade antioxidante, apresentando vida útil de 90 dias. Os dados obtidos indicam resultados favoráveis para a continuação dos processos, estudos de sua viabilidade econômica e produção industrial.

Palavras-chaves: Digestibilidade. Insetos. Microrganismos. Minerais. Nutrição.



## FERMENTED RICE FARM: CHARACTERIZATION, BIOLOGICAL EVALUATION AND TECHNOLOGICAL APPLICATION

### ABSTRACT

Rice bran is a coproduct of the polishing process of brown rice and represents about 10% of the husked product. The state of Rio Grande do Sul stands out in the cultivation of this grain that gives rise to variable proportions of coproducts. Several researches have been conducted to assess their potential for human consumption. In this context, the solid state fermentation is a possible alternative to provide contents of these compounds, as well as the fiber content, to improve the digestibility of rice bran. The aim of the study was to obtain an alternative source for human consumption by the use of fermented rice bran by *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* evaluating its proximal composition profiles minerals, phytochemicals and digestibility *in vitro* and *in vivo*. The raw materials used as substrate were the brown rice bran and the defatted. For the fermentation with *R. oryzae*, the substrates were placed in tray bioreactors and autoclaved before addition of nutrient solutions and spores, whose initial concentration was  $4 \times 10^6$  spores. g of bran<sup>-1</sup>. For fermentation with yeast, the rice bran was conditioned and autoclaved, using *S. cerevisiae* (3% pp<sup>-1</sup>) and water (30%). The evaluation of the proximal and mineral profile composition was performed according to AOAC, determining the elements Ca, Fe, Mg, Na, P, S, Cr, Cu, Mn, Sr and Zn by flame atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP -OS). Furthermore, the fermented samples were subjected to *in vitro* digestibility trials involving the use of synthetic juices simulating the steps of digestion and digestibility *in vivo* using insects (*Ceratitis capitata*). These were submitted to GC-MS metabolomic analysis. A cookie was also prepared using fermented rice bran and evaluated its composition, acceptance and consumption, shelf life, microbiological contamination and bioactivity. Fermentation using *Rhizopus oryzae* increased lipid, protein, fiber and mineral contents, except for calcium and iron, during fermentation. The phenolic compounds increased after 48 h of fermentation for both farms. The use of *S. cerevisiae* promoted the increase of ashes, proteins and phenolic compounds, in 5%, 62% and 10%, respectively, in bran of fermented brown rice for 6 h. For the defatted bran, the lipids increased by 38% and fibers by 14%. The phenolic compounds were extracted in greater proportion in the bran of fermented brown rice in 6 h. By means of the metabolomic analysis it was possible to evidence the efficiency of the metabolites analysis of *in vitro* and *in vivo* digestibility (glycogen, amino acids, acids, fatty acids and alcohols). Cookies with 25% fermented rice bran presented the best results. Highlighting the rice fermented by *R. oryzae*, which obtained better global evaluation and acceptability in sensory analysis, greater availability of nutrients and antioxidant activity, presenting a useful life of 90 days. The data obtained indicate favorable results for the continuation of the processes, studies of its economic viability and industrial production.

Keywords: Digestibility. Insects. Microorganisms. Minerals. Nutrition.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a potencialidade da utilização do farelo de arroz fermentado na alimentação humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da fermentação do farelo de arroz por *Rhizopus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* na composição proximal e perfil de minerais;
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* dos farelos fermentados utilizando insetos;
- Aplicar o farelo fermentado na elaboração de produto de panificação.



## 1. INTRODUÇÃO

A busca por melhor qualidade de vida tem mudado hábitos dos consumidores que procuram de forma sistêmica produtos mais saudáveis. A preocupação em produzir alimentos saudáveis e seguros vem norteando a procura por alimentos naturais, não só por frutas, legumes e produtos orgânicos, mas também por grãos, cereais integrais e similares, que lideram este interesse por alimentos ricos em fibras, vitaminas, minerais e substâncias bioativas originais do alimento, além da vantagem de não conterem aditivos químicos (GOMES, 2009).

O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro que se destaca na produção de arroz com 1.077,6 mil hectares plantados, correspondendo a 7.947,3 milhões de toneladas do grão, representando 55% da área nacional, respondendo ainda por 69% da produção no país (CONAB, 2018). O arroz beneficiado polido é a forma comumente consumida na maioria das regiões brasileiras e é obtido a partir do polimento do grão integral, removendo proporções variáveis das suas camadas mais externas, resultando desse processo uma proporção variável de subprodutos em forma de grãos quebrados, casca e farelo (CASTRO et al., 1999).

O farelo de arroz é uma camada entre o grão e a casca, resultante do processo de descascamento e beneficiamento do arroz, representando cerca de 8% do grão em casca ou 10% do produto descascado. Destaca-se como importante coproduto dado à abundância e ao seu elevado valor nutricional. Atualmente o farelo de arroz possui baixo valor comercial e é utilizado na composição de ração animal, extração de óleo, fertilizante orgânico e como ingrediente de multimisturas para distribuição em creches e programas sociais. Várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de avaliar seu potencial para alimentação humana (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009; PEREIRA, 2010).

Estudos sobre fitoquímicos ( $\gamma$  - orizanol, tocoferóis e tocotrienóis), que têm sido relatados como antioxidantes; compostos fenólicos, como ácido ferúlico e gálico; proteínas de alto valor nutricional e hipoalergênico comparadas com propriedades funcionais da caseína, minerais, vitaminas; dentre outros compostos, indicam a ingestão de farelo de arroz, alegando benefício à saúde, e até mesmo, prevenção ou tratamento de doenças, como câncer (MORO et al., 2004; CASTRO et al., 1999; KANNANA et al., 2010; FORSTER et al., 2013; PARK et al., 2013). O farelo de arroz contém diversos nutrientes e minerais tais como vitamina E, vitamina B6, magnésio, cobre, ferro, entre outros. É rico em fibras, importantes para o bom funcionamento intestinal e para a prevenção do câncer de intestino. É um excelente alimento funcional que além de nutrir, ajuda na prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas,

como o colesterol alto, alguns tipos de câncer e o diabetes. Também pode prevenir prisão de ventre, cárie dental, beribéri (deficiência de vitamina B1), atuar na eliminação de metais pesados, e está se tornando cada vez mais valioso para o processamento de alimentos, uma vez que os consumidores preferem alimentos enriquecidos naturalmente (EMBRAPA, 2016; KIM; HAM, 2012; MESSIA et al., 2016; WATTANASIRITHAM et al., 2016). No entanto, o farelo de arroz possui algumas limitações para sua aplicação, como a atividade de enzimas hidrolíticas e oxidativas elevada e a digestibilidade baixa, e estes problemas podem ser minimizados pela fermentação (KIM; HAM, 2012).

A suplementação com farelo de arroz tem sido realizada com sucesso em vários alimentos (pão, bolos, macarrão e sorvetes) sem afetar significativamente as propriedades funcionais e estruturais. No entanto, com tantas propriedades nutracêuticas, o farelo de arroz ainda é pouco explorado como um alimento medicinal ou suplemento dietético (GUL et al., 2015). A fermentação em estado sólido é um processo biotecnológico utilizado como uma alternativa para melhorar funcionalidade biológica de material lignocelulósico, podendo acarretar maior rendimento e produtividades ou melhorar características do produto e liberar compostos importantes como enzimas, ácidos orgânicos e outros compostos bioativos. Uma vez que, alterações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação podem afetar as propriedades do substrato, como o aumento da digestibilidade (RAZAK et al., 2017). A partir deste ponto de vista, o fermentado pode ser designado como "alimento funcional naturalmente fortificado", e atualmente existem 5000 diferentes alimentos fermentados que são consumidos no mundo (RAY et al., 2016).

No Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da FURG destacam-se os estudos de Feddern; Furlong; Soares (2007), Oliveira et al. (2007), Silveira; Furlong, (2007), Oliveira et al. (2010), Schmidt et al. (2014), Christ-Ribeiro et al. (2017a) e Christ-Ribeiro et al., (2017b), Souza (2018) para valorizar o farelo de arroz melhorando o potencial da utilização deste coproduto.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a disponibilidade de nutrientes dos farelos de arroz (integral e desengordurado) fermentados por *Rhizopus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* avaliando sua digestibilidade *in vitro* e *in vivo* para elaboração de um cookie buscando uma fonte para alimentação humana.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ARROZ

O cultivo do arroz remonta à pré-história na China e na Índia. A colheita estava presente na Mesopotâmia no século IV AC, se difundiu para o norte da África e Japão nos primeiros séculos DC e foi introduzida na Europa por volta do século VI DC. Atualmente, o arroz é cultivado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. As principais áreas de produção estão localizadas na Índia, China, Indochina, Indonésia, Japão, Coréia, Filipinas, Paquistão, Estados Unidos, Brasil, Egito e entre os países europeus (BURLANDO; CORNARA, 2014).

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. É um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico e considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento. O brasileiro destina cerca de 22% do seu orçamento em alimentação, sendo este grão ainda o principal produto da cesta básica. O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária ao homem e é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo (EMBRAPA, 2016).

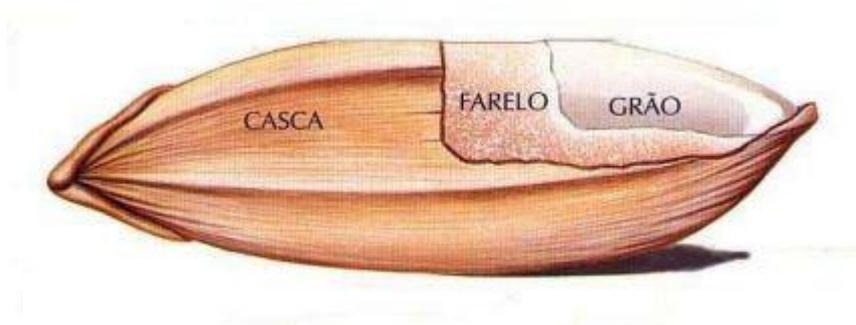
O arroz polido (forma mais consumida mundialmente) corresponde ao grão sem as camadas periféricas e o germe, as quais são extraídos durante o processo de beneficiamento. Devido a diferenças na composição nutricional, os vários graus de beneficiamento do arroz, que correspondem a perdas até 10% da massa do grão integral, determinam variações consideráveis nos teores dos nutrientes do grão. Além disso, outros fatores influenciam no valor nutritivo do arroz, tais como variáveis relacionadas com as condições e cultivo como temperatura, umidade, radiação solar, natureza do solo, adubação e com o preparo do cereal para o consumo. Ainda existem variedades expressivas, especialmente em relação ao valor proteico e de micronutrientes (SANTOS; STONE; VIEIRA, 2006).

#### 3.2 FARELO DE ARROZ

Um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, o farelo representa de 8% a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento. Apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato. Conforme já bem estabelecido na literatura, o grão de arroz

integral é constituído por partes que diferem consideravelmente entre si em termos nutricionais. As camadas periféricas como pericarpo, tegumento, nucela e capa de aleurona, que dão origem ao farelo se destacam pela presença de nutrientes, tais como fibras e vitaminas do complexo B. O endosperma, à base de amido, também é fonte de proteínas. O germe ou embrião, situado na camada de aleurona, distingue-se pela composição em proteínas e lipídeos. De forma geral, as concentrações dos nutrientes reduzem gradativamente das camadas periféricas em direção ao interior do grão, exceto no caso do amido (SANTOS; STONE; VIEIRA, 2006; PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008). Os constituintes do farelo de arroz estão representados na Figura 1.

**Figura 1** - Constituintes do grão de arroz.



Fonte: JOSAPAR.

O farelo de arroz apresenta abundância e baixo valor comercial, sendo mais empregado, na indústria brasileira, para extração de óleo, como ração animal e fertilizante, devido a limitações relacionadas à falta de controle das condições sanitárias de recolhimento e às dificuldades relativas à contaminação deste farelo com resíduos de casca e/ou amido. Por isso, os coprodutos de arroz são amplamente subutilizados devido à falta de técnicas adequadas de estabilização. Embora esses materiais tenham importância secundária no mercado de alimentos, eles mantêm altas concentrações de moléculas, servindo assim potencialmente como matéria-prima para aplicações nutracêuticas, cosmeceúticas e farmacêuticas (LACERDA et al., 2010).

Considerando-se que o Brasil é um grande produtor agrícola, e que, conseqüentemente, há uma expressiva geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais, que podem se tornar um problema ambiental, estudos sobre a reutilização destes produtos são extremamente importantes para o país como forma de agregar valor a porções de menor impacto comercial. Uma destas formas para esta valoração é a utilização destas matrizes

como fonte energética em processos fermentativos, os quais implicam na ação de micro-organismos que, para sua viabilidade, realizam transformações bioquímicas que se iniciam com a degradação de lignocelulose e conseqüente disponibilização de compostos funcionais (SCHMIDELL et al., 2001). Pesquisas que envolvam a viabilização da utilização do farelo de arroz, na alimentação humana, podem garantir ao consumidor um produto seguro, do ponto de vista nutricional, microbiológico e sensorial, além de auxiliar no planejamento de estratégias de promoção da saúde pública (PARRADO et al., 2006; BURLANDO; CORNARA, 2014; LACERDA et al., 2010).

O farelo de arroz, resultante do beneficiamento do grão, representa em torno de 8% do arroz em casca. A composição química deste farelo depende de fatores associados à variedade genética, condições ambientais de cultivo, constituição do grão ou processo de beneficiamento (principalmente brunição e polimento), este afetando, especialmente, o conteúdo de carboidratos e fibra alimentar. O farelo de arroz possui quantidades significativas de carboidratos, proteínas e lipídios, especialmente ácidos graxos insaturados, alta concentração de fibras insolúveis, vitaminas e sais minerais (MALEKIAN et al. 2000).

Tem-se evidenciado a importância à saúde de alimentos ricos em fibra alimentar, devido à relação deste componente com a diminuição do colesterol sanguíneo, proteção contra câncer, aumento do trânsito intestinal, intervenção no metabolismo de lipídios e carboidratos e na fisiologia do trato gastrointestinal. Além das vantagens relacionadas ao conteúdo de fibra alimentar presente no farelo de arroz, este, ao contrário dos farelos de trigo, aveia, cevada e centeio, não possui glúten, podendo, portanto, ser utilizado por pessoas intolerantes a esta proteína (LACERDA et al., 2010).

O farelo de arroz constitui excelente fonte de minerais, proteínas e óleo, destacando-se pelo expressivo teor de vitaminas. O elevado conteúdo de proteínas (cerca de 18%) e lipídeos do farelo de arroz (entre 12,8 e 22,6%), aliado ao seu baixo valor comercial, justificam seu emprego majoritário como matéria-prima para indústria de extração de óleo comestível. Além disso, possui elevado valor de carboidratos (em torno de 38%) que se destaca como promissor substrato para processos bioquímicos (PARRADO et al., 2006, BURLANDO; CORNARA, 2014).

O farelo de arroz desengordurado contém cerca de 15% de proteínas e 15% fibras, tendo cromo e cobre como principais minerais que exercem importante papel na formação de insulina. Além disso, contém zinco e magnésio (importantes para o desenvolvimento) e alto conteúdo em vitamina A. O farelo de arroz desengordurado pelletizado, por representar excelente fonte proteica, é amplamente utilizado como componente na formulação de rações

para animais. Tanto o farelo quanto o óleo extraído do farelo contêm ainda inúmeros componentes minoritários, enquadrados na categoria de biofenóis. Esses estão relacionados com diversos benefícios à saúde humana como, por exemplo, a redução do nível de colesterol sanguíneo (PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008).

A atividade antioxidante do farelo de arroz é principalmente devida a presença de  $\alpha$ -orizanol, esteróis e tocoferol, é uma das características que impulsiona pesquisas para exploração desta capacidade na produção de alimentos. Além deste também são bastante estudados os compostos fenólicos que são abundantes nesta matéria prima (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009; RIBEIRO, 2014; SCHIMDT et al., 2014).

### 3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A geração de subprodutos é inerente a qualquer setor industrial. Com o aumento da conscientização ecológica, ficou claro que o grande desafio da humanidade será equilibrar a produção de bens e serviços, o crescimento econômico, a igualdade social e a sustentabilidade ambiental. A preocupação com o meio ambiente leva à viabilização de projetos que promovem a sustentabilidade do sistema de produção. Atualmente, os reaproveitamentos desses subprodutos são cada vez mais difundidos. No Brasil, a indústria de alimentos produz grande quantidade de subprodutos. Aplicá-los em bioprocessos é viável, tendo em vista o seu baixo valor agregado, além da grande disponibilidade. Nesse sentido, as pesquisas com bioprocessos crescem exponencialmente, tendo como foco principal a produção de compostos com alto valor agregado a partir dos subprodutos agroindustriais (FERREIRA et al., 2011).

Estes resíduos contêm em sua estrutura como principal componente celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano. A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas a variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes, que podem variar de acordo com a espécie e o tecido vegetal (OSADOLOR et al., 2018).

Mundialmente, as atuais linhas de pesquisa em fermentação em estado sólido (FES) são o enriquecimento proteico de resíduos agroindustriais a partir de microrganismos selecionados, 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. O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. Ela, por sua vez, está relacionada a dois parâmetros: a umidade, cuja porcentagem de água na massa total do meio; e a atividade de água, um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (OLIVEIRA et al., 2010).

A fermentação em estado sólido, também, apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas.
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais.
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais.
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos sólidos agroindustriais, como o farelo de arroz, estes podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Neste contexto a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos visando a síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial. A FES é aplicada para produção de alimentos, biopesticidas, e substâncias químicas diversas. O grande potencial é principalmente na produção de enzimas através de fungos filamentosos, os quais têm recebido a maior atenção, pois apresentam capacidade de crescimento em baixos níveis de água (DANTAS; AQUINO, 2010).

Para valorizar o farelo de arroz têm sido estudado o potencial da utilização deste coproduto industrial empregando em diversas áreas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos como de acordo com Feddern et al. (2007), Oliveira et al. (2007), Silveira; Furlong, (2007), Oliveira et al. (2010), Schmidt et al. (2014), Souza et al. (2018) a utilização

do farelo de arroz como substrato para a fermentação de micro-organismos alteraram fatores físico-químicos, a disponibilização de nutrientes, fitoquímicos dentre outros. Na Tabela 1 estão as potenciais aplicações da FES por fungos na produção de alimentos e alimentos fermentados e vários metabólitos de grande interesse para a indústria de alimentos.

**Tabela 1** - Exemplos de fermentação em estado sólido para aplicações alimentares.

Microrganismo	Substrato	Produto	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de banana	$\alpha$ -amilase	
<i>Aspergillus oryzae</i> LBA 01	Farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão	Protease e $\alpha$ -amilase	CASTRO; SATO, 2013.
<i>Aspergillus niger</i> Aa- 20	Casca de limão	Pectinase	RUIZ et al., 2012.
<i>Aspergillus japonicus</i> PJ01	Casca de laranja, farelo de trigo, bagaço de laranja, cana de açúcar bagaço e palha de arroz	Pectinase, CMCase, e xilanase	LI et al., 2015
<i>Aspergillus awamori</i>	Bagaço de uva, cascas de laranja	Xilanase, CMCase, exo- polygalacturonase	DÍAZ et al., 2012.
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Bagaço e trigo de cana Farelo	Pectinases	PITOL et al., 2016.
<i>Thermomucor Indicae-seudaticae</i> N31	Farelo de trigo, cana bagaço e bagaço de laranja	Pectinases	MARTIN et al., 2010.
<i>Aspergillus niger</i> C, BRMCTAA 82	Fibra de palma e palma alcalina sabão	Lipase	SHARMA; VIVEKANAND; SINGN, 2008.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Palha de arroz e fava Palha	Ácidos orgânicos (cítrico, succínico, etc)	SABER ET AL., 2015.

**Tabela 1** - Exemplos de fermentação em estado Sólido para aplicações alimentares (cont.)

Microrganismo	Substrato	Produto	Referência
<i>Rhizopus oligosporus</i> MTCC 556	Bolo de Óleo de Mostarda	Fitase	SURESH; RADHA, 2015
<i>Trichoderma reesei</i> SAF3	Farelo de trigo, farelo de arroz, arroz palha, pó de serra (Terminalia arjuna L.), miolo de coco, folha de bananeira seca, palha de trigo, exaustores de chá e cana de açúcar bagaço	Xilanase	KAR et al., 2013.
<i>Yamadazyma</i> <i>guilliermondii</i> ATCC 90197	Resíduos de trigo	Pigmentos	DURSUN; DALGIC, 2016.
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 24060			
<i>Xanthophyllomyces</i> <i>dendrorhous</i> ATCC 24202			
<i>Sporidiobolus</i> <i>salmonicolor</i> ATCC 24259			

### 3.3.1 Fungos

Os fungos são organismos diversificados, que podem ser encontrados como microscópicos e macroscópicos. Eles existem em formas unicelulares, conhecidas como leveduras, e em formas constituídas por filamentos denominadas hifas, como se observa entre os bolores. Esses organismos podem se desenvolver em diversos lugares: no solo, na água,

nas plantas, em animais, no ser humano e em detritos orgânicos. O corpo de um fungo filamentosos é formado por uma estrutura chamada micélio. Este é composto por filamentos individuais em forma de tubos, as hifas, que correspondem a células multinucleadas formas de reprodução (sexuada e assexuada), presentes no ciclo de vida da maioria das espécies de fungos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Os fungos são organismos muito importantes, não somente devido ao seu papel vital no ecossistema, mas também por causa da sua influência sobre os humanos e em atividades relacionadas. São seres eucarióticos heterotróficos, altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Sua nutrição é feita por absorção, graças a presença de enzimas, as quais são produzidas por ele e utilizadas para a degradação de nutrientes (LOPES, 2011).

É difícil generalizar características dos fungos devido a diversidade ecológica, fisiológica e morfológica dentro do Reino *Fungi*, no qual são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos. Constituem um reino heterogêneo. Muito dos fungos conhecidos tem um impacto negativo no bem estar humano como agentes que causam doenças em animais, humanos e plantas, na biodeterioração e como patógenos de animais, tanto como produtores de micotoxinas quanto causadores de micoses. Porém entre as espécies do gênero, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* são os mais conhecidos pelo seu impacto positivo para os humanos, além do gênero *Rhizopus* que em estudos mostram promissores resultados no aumento de compostos fitoquímicos (LOPES, 2011; SCHMIDT et al., 2014).

Assim como os bolores, as leveduras fazem parte do Reino *Fungi*, mas se diferenciam por apresentarem forma unicelular. Geralmente, sua reprodução se dá por gemulação ou brotamento. As leveduras crescem e se reproduzem mais rápido que os bolores por serem células simples e devido a sua maior relação área/volume, são mais eficientes numa base ponderal, na realização de alterações químicas. São diferenciadas facilmente das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas características morfológicas (BORTOLI et al. 2013).

#### 3.3.1.1 *Rhizopus oryzae*

O *Rhizopus* é um dos gêneros da classe *Zygomycetes*, da ordem *Mucorales*. As espécies desse gênero são encontradas nos mais variados ambientes, como florestas, solos, frutas e vegetais deteriorados. Morfológicamente são considerados fungos filamentosos, não

septados, com micélios cotonosos formando esporângioforos nos nódulos, onde se encontram os rizoides. Seus esporângios são, usualmente, grandes e negros e suas columelas são esféricas. A base dos esporângios tem a forma de taça. A reprodução sexuada requer dois talos de tipos diferentes que são designados com os sinais positivos e negativos, substituindo os adjetivos macho e fêmea (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

O grande interesse nos fungos deste gênero decorre de que ele não possui espécies toxigênicas, são consideradas *GRAS* (Geralmente reconhecido como seguro). São agentes deteriorantes comuns em alimentos de origem vegetal, com produção de enzimas pectinolíticas. Esta espécie caracteriza-se por produzir grande quantidade de ácido fumárico a partir de açúcares fermentáveis (PITT; HOCKING, 1997).

O *R. oryzae* é um importante microrganismo que apresenta também atividade enzimática aminolítica. Além disso, alguns fermentados de soja tornam-se mais digeríveis e nutritivos quando produzidos a partir da utilização deste fungo e também com a participação, com menor relevância, de bactérias e outros fungos (LIMA, 2011). Cabe salientar que estudos mostram que na utilização deste microrganismo em fermentações há uma ativação de fitases endógenas ocorrendo a diminuição do teor de fitatos e aumento no teor proteico do farelo de arroz, no seu conteúdo de fosfolipídios e de fitoquímicos, tornando assim, um potencial insumo ou ingrediente para a indústria alimentícia (OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA; FURLONG, 2007; CHRIST-RIBEIRO, 2017a).

### 3.3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura ascomicética gemulante típica, suas células são elípticas, com dimensões de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura, que se reproduzem de forma assexuada, por brotamento ou gemulação. No processo de brotamento, o núcleo se divide por constrição e uma porção dele penetra no broto juntamente com outras organelas. Em meio oxigenado, as leveduras convertem os açúcares em dióxido de carbono, gerando as “bolhas de ar” no pão. A *S. cerevisiae* é uma levedura de grande importância econômica para as áreas de panificação, cervejaria e de produção de etanol (BORTOLI et al., 2013).

Suas principais estruturas consistem em cápsula, na qual está o material extracelular limoso, viscoso e aderente formado por polissacarídeos que confere a célula proteção e adesão. A parede celular que é composta por glucanas (30-34%), manana (30%), proteína (6-8%), nas quais se enquadram algumas enzimas como invertase e hidrolases, além

de quitina (1-2%) e lipídios (8,5-13%), que também apresentam como função a rigidez e proteção à célula. Esta levedura destaca-se como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras, além de serem mencionados nas mais antigas referências bibliográficas (PENNINCKX, 2000).

Desde a antiguidade, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada em processos fermentativos diversos, como na panificação, cervejaria e fabricação de vinho e, seu uso foi possível desde então, devido sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico. A partir de então, as leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, passaram a ser os micro-organismos favoritos para estudos de biologia celular básica, o que a tornou um ponto central na evolução da microbiologia, bioquímica e genética. Existem diversas razões para isso: como a facilidade de seu isolamento e manutenção, pouca exigência nutricional, bom crescimento em meios constituídos por resíduos industriais, amplo uso em processos industriais e sua reconhecida capacidade de produzir enzimas extracitoplasmáticas (PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

### 3.4 NUTRIENTES E METABOLISMO HUMANO

Os indivíduos de uma espécie possuem poucos requisitos absolutos e tem como objetivo crescer em tamanho suficiente, sobreviver e funcionar por tempo suficiente para se reproduzir e elevar a próxima geração à independência. Como animais, os humanos não são capazes de extrair energia para atividade em função da luz do sol, portanto, os alimentos e especificamente os nutrientes que eles contêm, são vitais para permitir todas as funções das quais somos geneticamente capazes. Os nutrientes contribuem biologicamente depois de consumidos, após serem separados por digestão, absorção, transformação metabólica e distribuição no para atender suas funções (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011). Os nutrientes devem estar "disponíveis", sendo assim parcialmente metabolizados pelo intestino, ou apenas parcialmente absorvidos. Alguns alimentos contêm componentes não nutrientes que não são absorvidos, outros componentes, como metais inertes do solo, são absorvidos, mas não funcionam e são excretados inalterados. Também há nutrientes que não são absorvidos, mas ainda têm uma função. Este é o caso da maior parte da fibra alimentar, que fornece uma fonte de energia para a microbiota intestinal. Há mais células bacterianas no intestino do que células no corpo humano no corpo e estas geram produtos residuais, como os ácidos graxos voláteis, que são valiosos para a saúde intestinal e absorvidos como fonte de energia para os seres humanos (TUCKER, 2014; LEAN, 2015).

Os macronutrientes conhecidos como gorduras, proteínas e carboidratos (incluindo fibra alimentar) contribuem com energia (calorias) e são compostos de carbono, oxigênio, hidrogênio e pequenas quantidades de nitrogênio. Além deles, há moléculas orgânicas presentes em certos alimentos que são "essenciais", o que significa que eles são necessários para a função biológica, mas não podem ser sintetizados pelo organismo humano a partir de outros compostos. Estes compostos compreendem os aminoácidos essenciais e ácidos graxos que são necessários para construir todas as moléculas lipídicas e proteicas. Além desses, há as vitaminas, compostos fenólicos e minerais que são exemplos de componentes funcionais de alimentos, conhecidos como "micronutrientes". Adicioná-los como alimentos fortificados ou como suplementos fornecerão benefícios para os indivíduos que são deficientes ou que necessitam reestabelecer níveis baixos desses compostos acarretando em melhoria no sistema imunológico (LEAN, 2015; ÇEHRELI, 2018).

Desde a identificação dos nutrientes essenciais em nosso suprimento alimentar, o trabalho científico para entender as vias bioquímicas e interações complexas associadas a esses nutrientes foi intensificado. A ciência nutricional continua a estudar mecanismos cada vez mais complexos sobre como os nutrientes interagem com outros produtos químicos, enzimas, co-enzimas, hormônios e genes para permitir o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde ao longo da vida. Novas substâncias, incluindo diversos fitonutrientes, também continuam a emergir como fatores importantes nesses mecanismos (SLAVIN, 2014).

Para isso, as ciências ômicas auxiliam na busca da compreensão do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. A análise metabolômica consiste em estudar a presença ou alteração de metabólitos, em produtos intermediários ou finais do metabolismo, de baixa massa molecular (até 1500 Da) em uma amostra biológica. Com isso, GC-MS é uma das técnicas de análise mais empregadas nestes estudos, apresentando alta robustez e repetibilidade. Porém, grande parte dos metabólitos requerem derivatização, para que se tornem voláteis a baixas temperaturas, acarretando em um procedimento tedioso. Em contrapartida, o uso dessa técnica apresenta vantagens, resultante da construção de bibliotecas de espectros, oferecendo alta credibilidade na identificação dos metabólitos, aliado a informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação dos compostos em campo magnético (CANUTO et al., 2018).

### 3.5 DIGESTIBILIDADE *in vitro* X *in vivo*

A transformação dos alimentos ocorre no processo digestivo, sendo que as transformações químicas e as degradações enzimáticas permitem usufruir da maior quantidade e qualidade possível dos nutrientes contidos nos alimentos. O trato digestivo pode ser considerado como um tubo que se estende da boca ao ânus, compreendendo em boca, faringe, estômago e intestino delgado e grosso, cuja função é a de prensão, ingestão, trituração, digestão e absorção de alimentos, e a de eliminação de resíduos sólidos. A digestão é o processo de transformação, por hidrólise enzimática, de moléculas de elevada massa molar, em unidades de menor dimensão para que possam ser absorvidas e utilizadas pelas células (PESSOA, 2016).

O conhecimento da composição química dos alimentos e sua digestibilidade são fundamentais para avaliar um alimento. Para isso, alguns parâmetros digestivos dos alimentos podem ser realizados por métodos *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*. A técnica de digestibilidade *in vitro* tem como objetivo simular a digestão realizada pelos animais, levantando a necessidade de compreender essa mesma digestão, para que a sua reprodução seja o mais fidedigna possível. No método *in vivo*, os animais são mantidos em gaiolas metabólicas providas de comedouros, bebedouros e dispositivos para coleta de urina no caso dos estudos de balanço nitrogenado. Nos ensaios de digestibilidade, os animais são alimentados durante uma semana com quantidades conhecidas de alimento e a produção de fezes é medida pela coleta total de fezes com o auxílio de sacolas que são adaptadas aos animais evitando a contaminação com a urina. A estimativa da digestibilidade, consumo e desempenho animal por este método é a que apresenta o maior grau de confiança. No entanto estes ensaios demandam muito tempo, trabalho e um grande número de avaliações rotineiras de alimentos (FERNANDES et al., 2017).

O uso de animais gera diferentes problemas de ordem ética, ambiental e de custo dos experimentos. Portanto, o uso de insetos como modelos em ensaios nutricionais proporcionam uma alternativa inovadora. Os ensaios com insetos apresentam como principais vantagens a curta duração e baixo custo (CARMONA et al., 1998). Neste contexto, o uso de gorgulho de arroz (*Sitophilus oryzae*) tem sido proposto para avaliar a eficiência biológica de vários nutrientes e a toxicidade de compostos (GOMERO et al., 2010). Pérez-Navarrete et al. (2007) mostraram que a hidrólise do amido pela amilase do gorgulho é semelhante a catalisada pela enzima do pâncreas de mamíferos, que é frequentemente usado em estudos de digestibilidade *in vitro*.

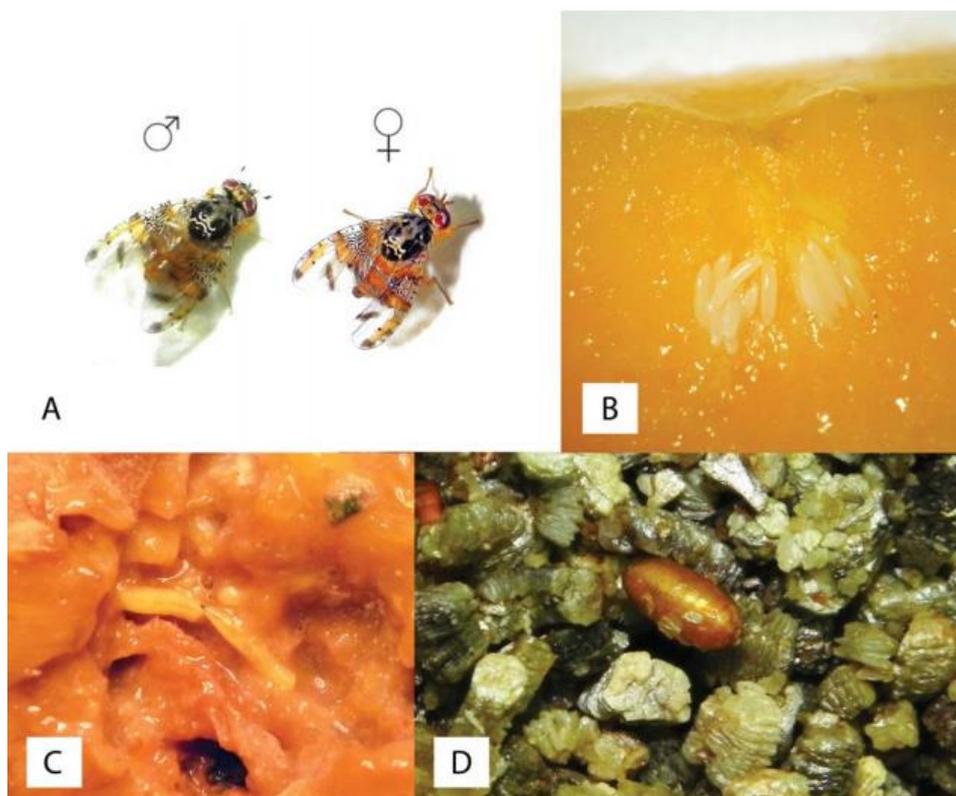
### 3.6 *Ceratitidis capitata* NA DIGESTIBILIDADE *in vivo*

O alimento é um dos fatores cruciais para o desenvolvimento de qualquer organismo. Assim, existe um complexo infundável de fatores que regulam não só o desenvolvimento dos insetos, mas a disponibilidade e abundância do alimento a ser utilizado pelo inseto e mesmo por outros organismos. A dieta diferenciada nas diversas fases do inseto permite uma maior fecundidade, longevidade, pois visa complementar a dieta da fase anterior com vitaminas, aminoácidos e açúcares não obtidos (RODRIGUES, 2004).

Uma nova abordagem para estudar a digestibilidade *in vivo* de alimentos é o uso de insetos (LOVERA; ELEVINA PÉREZ; LAURENTIN, 2017). Muitos insetos se alimentam de fontes amiláceas durante seus estágios larval e / ou adulto. Os carboidratos são nutrientes essenciais à produção de energia, necessários tanto para o crescimento larval ideal quanto para a manutenção da longevidade adulta para a maioria dos insetos (CANGUSSU; ZUCOLOTO, 1992). O processo de quebra de alimentos, a utilização de nutrientes e o armazenamento de reservas metabólicas são surpreendentemente semelhantes em insetos e vertebrados, no entanto, alguns órgãos distintos e processos metabólicos são encontrados apenas em insetos. O trato digestivo dos insetos pode ser dividido em três grandes regiões com base nas origens embrionárias e funções fisiológicas: anterior, médio e posterior. A maior parte da digestão ocorre no intestino médio, onde uma variedade de enzimas está disponível em abundância. A natureza das enzimas secretadas e o grau de especialização do trato digestivo está relacionado ao tipo particular de dieta que um inseto pode assimilar (KAUR; KAUR; GUPTA, 2014; KLOWDEN, 2013).

Desse modo, a mosca-da-fruta (*Ceratitidis capitata*), considerada uma praga nociva à fruticultura mundial que causa perdas na produção, possui alimentação baseada em carboidratos, proteínas e lipídeos (TRASSATO et al., 2017). O adulto desta praga mede de 4 mm a 5 mm de comprimento por 10 mm a 12 mm de envergadura com coloração amarela e olhos castanho-violáceos. O tórax é preto na face superior com desenhos brancos simétricos, o abdômen é amarelo com duas listras transversais acinzentadas e as asas são transparentes com listras amarelas, sombreadas. A duração da fase larval varia de 9 a 13 dias e, quando próximas ao período de pupa, as larvas dirigem-se ao solo onde permanecem no estágio de pupa até a emergência dos adultos. As pupas são envoltas pelos pupários que possuem forma de um pequeno barril de 5 milímetros de comprimento, de coloração escura (duração de 10 a 12 dias no verão e 20 dias no inverno). A duração do período de ovo-adulto é de 31 dias (Figura 3) (NAVA; BOTTON, 2010).

**Figura 2** - Fases do ciclo biológico de *Ceratitis capitata*. (A) Adultos – macho à esquerda e fêmea à direita); (B) ovo; (C) larva; (D) pupário.



Fonte: NAVA; BOTTON (2010).

Para a criação desse inseto, é utilizado na dieta larval, o germe de trigo cru como principal fonte proteica, além da levedura de cerveja. Por isso, produtos fermentados contêm nutrientes que podem alimentar humanos e animais, substituindo fontes convencionais e assim, avaliar a incorporação desses compostos no estágio larval de *Ceratitis capitata* (NUNES et al., 2013). Contudo, progressos substanciais na obtenção de um entendimento adicional sobre este tópico continuam a ocorrer, principalmente através da aplicação das técnicas de genética molecular, genômica funcional, proteômica, transcriptômica, metabolômica e biotecnologia a uma variedade de estudos focados no metabolismo dos insetos (MUTHUKRISHNAN et al., 2012).

### 3.7 SUPLEMENTAÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA.

A suplementação, enriquecimento ou simplesmente adição é um processo no qual é acrescido ao alimento, dentro dos parâmetros legais, de um ou mais nutrientes, contidos ou não naturalmente neste, com o objetivo de reforçar seu valor nutritivo e prevenir ou corrigir eventuais deficiências nutricionais apresentadas pela população em geral ou de grupos de indivíduos. A fortificação de alimentos vem sendo utilizada como um recurso de baixo custo na prevenção de carências nutricionais em muitos países, desenvolvidos e em desenvolvimento (MARQUES et al., 2012).

O farelo de arroz é rico em minerais, sendo o Fósforo um dos principais, principalmente na forma de fitatos, além de grande quantidade de zinco, cobre, ferro, magnésio e manganês, e menor quantidade de cálcio e sódio. Além destes micronutrientes, o farelo de arroz contém entre 12 a 16% de proteínas que apresentam maior conteúdo de lisina quando comparadas ao farelo de outros cereais e ao arroz integral. As principais proteínas deste farelo são as albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas. A qualidade da proteína do farelo de arroz só é inferior à da aveia, superando a do trigo e a do milho. Seu perfil de aminoácidos o torna ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis. O uso das proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado como ingrediente nutracêutico tem sido considerado favorável devido sua estabilidade térmica (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, a utilização do farelo de arroz como fonte de alimento torna interessante a aplicação deste coproduto da agroindústria do RS, pois possui vários micronutrientes que são essenciais à saúde humana.

Os alimentos fermentados são uma das 10 principais tendências alimentares nos últimos anos. Empresas estão respondendo a essa tendência crescente, seja comercializando alimentos fermentados tradicionais (kefir, kombucha, koji, tempeh, e queijo) ou desenvolver novos produtos fermentados à base dos tradicionais (Bionade, bebidas aromatizadas à base de malte fermentadas usando a cultura kombucha e Rythhem, à base de leite de coco e bebidas à base de suco de frutas fermentadas com grãos de kefir). Vários produtos probióticos à base de soja e cereais também estão no mercado em resposta à crescente prevalência de alergias a proteínas lácteas, lactose e intolerâncias ao glúten e escolhas de estilo de vida, como o veganismo. O futuro dos alimentos fermentados tem potencial, alimentado pelo crescente interesse dos consumidores em tudo o que é percebido como natural e promover a saúde e a longevidade. Os fabricantes de alimentos também estão redescobrimo a possibilidade de criar

sabor característico, textura, perfil nutricional e benefícios para a saúde, mantendo um rótulo 100% natural via fermentação, e estão aproveitando esta oportunidade como exemplificado pelos diversos produtos já existentes no mercado (HUGENHOLTZ, 2013; SONI; DEY, 2014).

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**



**ARTIGO I**  
**INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR *Rhizopus oryzae* SOBRE A  
DISPONIBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E  
DESENGORDURADO**

CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C. DA S.; CHIATTONI, L. M.; MASSAROLO, K. C.; DUARTE, F. A.; MELLADO, M. DE LAS S.; SOARES, L. A. DE S. Fermentation process in the availability of nutrients in rice bran. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 45-52, 2017.



## **INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR *Rhizopus oryzae* SOBRE A DISPONIBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E DESENGORDURADO**

### **RESUMO**

Processo fermentativo é uma das formas de aumentar a disponibilidade dos nutrientes em farelo de arroz, sendo este um subproduto com potencial para ser aproveitado na alimentação humana. O efeito da fermentação foi avaliado em estado sólido por *Rhizopus oryzae* sobre a disponibilização de nutrientes e compostos funcionais em farelo de arroz e sua possível utilização como fonte nutricional para alimentação humana. Para isso, farelos integral e desengordurado foram inoculados com *R. oryzae* ( $4 \times 10^6$  esporos.g<sup>-1</sup> de farelo) durante 5 dias, determinando-se a cada 24 h sua composição proximal, teor de compostos fenólicos e minerais, os quais foram comparados com a Ingestão Diária Recomendada. A fermentação aumentou teores de proteínas, fibras, lipídios e cinzas, e conseqüentemente, teores de minerais, além de aumentar a disponibilidade dos compostos fenólicos. Portanto, a fermentação do farelo de arroz contribui com a diminuição da incorreta deposição deste coproduto no meio ambiente, além de ser uma alternativa para nutrição humana.

Palavras-chaves: Biodisponibilidade. Composição nutricional. Minerais, Compostos fenólicos. Fermentação em estado sólido.



## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais de 50% da população mundial. A produção anual no país em 2014 foi de 12.181.998 toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, responsável por 67,8 % da mesma (IRGA, 2016). Das diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização resultam frações de casca, farelo e arroz polido.

O farelo representa de 8% a 11% do peso total do grão e é proveniente da cobertura externa logo abaixo da casca, sendo removido do arroz branco ou parboilizado, previamente descascado, durante o processo de polimento. O aproveitamento do farelo é bastante viável devido à sua disponibilidade em nível regional, aliado ao baixo consumo humano, por ser considerado um resíduo. Pesquisadores relatam sobre benefícios do farelo de arroz à saúde humana, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (AVILA; MARCHEZAN; WALTER, 2008).

Considerando-se que o Brasil é um grande produtor agrícola e que conseqüentemente há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais, que podem se tornar um problema ambiental, estudos sobre a reutilização destes produtos são extremamente importantes para o país. Uma destas formas de aproveitamento é a utilização destas matrizes como fonte energética em processos fermentativos, os quais implicam no emprego de micro-organismos a fim de se obter transformações resultantes da atividade metabólica dos mesmos (SCHMIDELL et al., 2001).

A limitação do uso de farelo de arroz em aplicações de alimentos é em grande parte devido à sua deterioração, que é causada por atividades enzimáticas. Ele pode ser estabilizado por uma variedade de métodos, como o aquecimento seco. Várias pesquisas têm sido realizadas na tentativa de aumentar a utilização do farelo de arroz como alimentos para humanos (BHANGER et al., 2008; GUL et al., 2015; TUNCEL et al., 2014).

Uma alternativa seria o uso do mesmo como substrato para processo fermentativo, de acordo com Feddern et al. (2007); Oliveira et al. (2007); Silveira e Furlong, (2007); Oliveira et al. (2010); Schmidt et al. (2014). A utilização do farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido pode aumentar a disponibilização de nutrientes, fitoquímicos e entre outros, o que pode vir a contribuir, através da fortificação de alimentos,

com outro problema de países em desenvolvimento – a carência nutricional. Conforme Vellozo e Fisberg (2010) a fortificação de alimentos constitui medida de baixo custo, rápida aplicação e alta efetividade e flexibilidade, sendo socialmente aceita, uma vez que não interfere no modelo alimentar da população, pois utiliza alimentos de uso corrente. Além disso, os riscos de efeitos colaterais e toxicidade são raros, pois as doses do produto usado para fortificação são mínimas e controladas.

Dentro deste contexto, o trabalho tem como objetivo principal obter uma fonte de nutrientes alternativa para a alimentação humana através da fermentação em estado sólido do farelo de arroz, um subproduto agroindustrial, por *Rhizopus oryzae* e, conseqüentemente, contribuir com a resolução de problemas ambientais e sociais do país.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Os farelos de arroz integral e desengordurado foram obtidos em indústria de beneficiamento de arroz localizada ao sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O fungo filamentosso *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foi adquirido do Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello.

### 2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As culturas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram mantidas em Ágar Batata-dextrose (BDA) a 4 °C e os esporos incubados durante 7 dias a 30 °C. Para a geração de biomassa foi utilizada a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2010), a qual consiste na adição de uma solução nutriente ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  em HCl) e suspensão de esporos na concentração inicial de  $4 \times 10^6$  esporos  $\text{g}^{-1}$  de farelo. Após, a umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% através da adição de água estéril, e as amostras foram incubadas a 30 °C, sendo retiradas alíquotas nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h para posteriores determinações.

## 2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS FARELOS

Os farelos (fermentados e não fermentados) foram caracterizados através da secagem a 105 °C (nr. 935.29) e incineração a 550 °C (nr. 923.03) as determinação dos teores de umidade e cinzas, respectivamente. Os lipídios foram extraídos com éter de petróleo (nr. 920.85) e as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl (nr. 920.87), AOAC (2000). As fibras foram determinadas por gravimetria através dos resíduos ácidos e básicos da digestão das amostras (CIENTEC, 1991). Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

Os farelos (fermentados e não fermentados) foram pesados (~300 mg) em triplicata e a digestão foi realizada em forno de micro-ondas modelo Speedwave four (Berghof, Alemanha), conforme programa descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.

Etapas	Rampa (min)	T (°C)	Tempo de permanência (min)	Pressão (bar)
1	20	170	10	35
2	5	200	25	35
3	5	50	20	35

Para a digestão, foram usados 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e bidestilado (Merck) e 0,5 mL de HF 40% (Merck). Após a digestão, as amostras foram diluídas entre 5 alíquotas em HNO<sub>3</sub> 5%, para posterior quantificação. As determinações foram feitas em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado Perkin Elmer (modelo Optima 4300 DV, Shelton, USA). A introdução das amostras no espectrômetro foi feita empregando um nebulizador GemCone e uma câmara de nebulização ciclônica. As demais condições de operação do equipamento estão descritas na Tabela 2. O plasma foi formado a partir de argônio (White Martins, São Paulo, Brasil), com pureza de 99,996% (AOAC, 2000).

**Tabela 2** - Condições operacionais do equipamento de ICP OES.

Parâmetro	Condição
Potência (W)	1400
Vazão do gás principal (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,2
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,7
Comprimento de onda (nm)	Ca 315.887
	Fe 238.204
	Mg 279.077
	Na 589.592
	P 214.914
	S 181.975
	Cr 267.717
	Cu 324.759
	Mn 259.374
Zn 213.857	

## 2.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio utilizando álcool metílico como solvente extrator, em uma proporção de 1:8 (p/v). A mistura foi homogeneizada em agitador horizontal, a 160 rpm, durante 2 h à temperatura ambiente. Após repouso de 15 min, foi realizada nova adição de 10 mL de solvente, seguida de agitação durante 1h.

Os extratos metanólicos foram secos em rotaevaporador e ressuspensos em água, logo após foram clarificados, centrifugados e filtrados para a obtenção dos compostos fenólicos. O conteúdo de fenóis totais foi quantificado através de método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocateau em comprimento de onda de 750 nm e empregando uma curva padrão de ácido gálico (2 a 30 µg.mL<sup>-1</sup>) (SOUZA et al., 2009).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média da triplicata. Para comparação entre médias foi realizado ANOVA e Teste de Tukey a 95% de confiança.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A Tabela 3 apresenta os resultados da composição centesimal dos farelos (fermentados e não fermentados). O fato do farelo de arroz ser um subproduto agroindustrial, sua composição química depende de fatores associados à variedade e aos aspectos agronômicos, como tipo de solo, clima, qualidade da matéria-prima utilizada, bem como o processo de beneficiamento. O nível de proteína bruta do farelo pode variar entre 10 a 15%, sendo superior à proteína do trigo e do milho (FREEMAN, 2006). De acordo com Silva, Sanches e Amante (2006), o farelo de arroz contém entre seus nutrientes, aproximadamente 11,5% de fibras, sendo ainda uma boa fonte de lipídios, podendo conter mais de 20% do seu peso em óleo (constituído dos ácidos graxos, linoléico e ésteres do ácido palmítico).

De acordo com os resultados da composição proximal das amostras de farelo de arroz integral e desengordurado, demonstrados na Tabela 3, pode-se observar que os teores de lipídios, proteínas, cinzas e fibras aumentaram com o decorrer das horas (h) de fermentação. Somente o carboidrato diminuiu ( $p < 0,05$ ), mostrando coerência nos resultados já que o mesmo tem função de nutrir o microrganismo por ser a principal fonte de carbono.

Para o farelo integral o teor de lipídios apresentou seu maior valor no tempo de 48 h de fermentação, não diferindo significativamente dos tempos de 72 h e 96 h. As proteínas aumentaram mais que o dobro comparando com os farelos NF e 0 h e as fibras apresentaram seu maior valor no tempo de 96 h de fermentação, indicando com isso, que a fermentação é uma boa ferramenta para aumentar estes teores. De acordo com Griffin (1993), nutrientes no substrato são utilizados para a produção da parede celular de fungos; consequentemente, existe uma diminuição em polissacáridos no substrato. Isto foi demonstrado pelo aumento do teor de fibras e proteínas na biomassa, durante a fermentação, que para o farelo integral aumentou em aproximadamente 400% e, para o desengordurado em 45% comparados com seus farelos de arroz não fermentado (OLIVEIRA et al., 2010).



**Tabela 3** – Composição proximal do farelo fermentado integral (FI) e farelo desengordurado (FD) durante a fermentação e não fermentado (NF).

Tempos de fermentação	Fibras (%)		Cinzas (%)		Lipídios (%)		Proteínas (%)		Carboidratos (%)	
	FI	FD	FI	FD	FI	FD	FI	FD	FI	FD
NF	3,30 <sup>e,B</sup>	9,25 <sup>c,A</sup>	10,40 <sup>e,A</sup>	11,53 <sup>a,A</sup>	21,53 <sup>b,A</sup>	7,93 <sup>d,B</sup>	11,00 <sup>d,A</sup>	12,88 <sup>b,A</sup>	44,70 <sup>a,A</sup>	35,41 <sup>a,B</sup>
0 h	3,30 <sup>e,B</sup>	9,27 <sup>c,A</sup>	12,80 <sup>d,A</sup>	6,25 <sup>e,B</sup>	21,50 <sup>b,A</sup>	8,71 <sup>d,B</sup>	12,00 <sup>d,B</sup>	14,49 <sup>a,b,A</sup>	40,40 <sup>a,A</sup>	40,96 <sup>a,A</sup>
24 h	4,60 <sup>d,B</sup>	10,85 <sup>c,A</sup>	15,00 <sup>c,A</sup>	7,01 <sup>d,B</sup>	22,00 <sup>b,A</sup>	17,97 <sup>c,B</sup>	15,20 <sup>c,A</sup>	15,29 <sup>a,b,A</sup>	34,70 <sup>b,A</sup>	31,36 <sup>a,b,B</sup>
48 h	7,00 <sup>c,B</sup>	16,57 <sup>a,A</sup>	16,40 <sup>b,A</sup>	8,19 <sup>c,B</sup>	29,00 <sup>a,A</sup>	16,36 <sup>c,B</sup>	20,50 <sup>b,A</sup>	20,12 <sup>a,A</sup>	11,90 <sup>c,B</sup>	16,36 <sup>b,c,A</sup>
72 h	8,00 <sup>b,B</sup>	13,96 <sup>b,A</sup>	18,90 <sup>a,A</sup>	9,55 <sup>b,B</sup>	25,70 <sup>a,b,A</sup>	15,88 <sup>b,c,B</sup>	20,70 <sup>b,A</sup>	17,91 <sup>a,b,B</sup>	10,30 <sup>c,B</sup>	27,20 <sup>a,b,A</sup>
96 h	16,00 <sup>a,A</sup>	13,45 <sup>b,B</sup>	10,40 <sup>e,A</sup>	11,69 <sup>a,A</sup>	24,40 <sup>a,b,A</sup>	25,57 <sup>a,A</sup>	29,00 <sup>a,A</sup>	19,32 <sup>a,B</sup>	3,00 <sup>d,B</sup>	8,15 <sup>c,A</sup>

Letras maiúsculas iguais na mesma linha (referindo-se a cada análise da composição) e letras minúsculas iguais na mesma coluna (para cada tempo de fermentação) indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Os resultados apresentam coeficiente de variação menor que 20%.

As cinzas apresentaram decréscimo no tempo de 96 h indicando assim, juntamente com os outros fatores como lipídios e carboidratos, a possibilidade da falta de nutrientes para o microrganismo continuar proliferando, explicando a diminuição destes valores.

Para o farelo desengordurado foi possível observar que o conteúdo de fibras apresentou-se menor no farelo não fermentado (NF) e nos tempos iniciais de fermentação, tendo uma maior quantidade no tempo de fermentação de 48 h, havendo uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) após esse período. Nos farelos fermentados ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no teor de cinzas com o decorrer da fermentação, resultado do teor de cinzas inerente provavelmente ao crescimento fúngico. O teor lipídico foi maior no tempo de fermentação de 96 h, não diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) nos tempos de 0 e 72 h, enquanto que o teor proteico não variou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos tempos 0, 24 e 72 h.

Entre os tipos de farelos estudados, quanto à composição proximal, destaca-se o farelo integral apresentando resultados promissores para fibras, cinzas, lipídios e proteínas nas 96 h. Além destes, há a diminuição dos carboidratos tornando o farelo menos calórico quando fermentado com o fungo *Rhizopus oryzae*.

Os resultados no conteúdo de cinzas nos farelos fermentados e *in natura* foram semelhantes aos relatados por Kupski et al. (2012), que em 96 h de fermentação com o microrganismo *Rhizopus oryzae* utilizando o farelo de arroz integral como substrato obteve 13,9% de cinzas, 11,7% de fibras e 22,1 % de proteínas. Segundo Silveira e Furlong (2007) os maiores aumentos nos teores proteicos dos farelos de arroz desengordurado e de trigo, submetidos à fermentação em estado sólido (pelos fungos *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae*), foram observados com o microrganismo *Rhizopus sp.* De acordo com Irakli, Katsantonis e Kleisari (2015) o farelo de arroz, é um importante subproduto e está ganhando o mundo por possuir muitos efeitos benéficos nutritivos e biológicos, contém fitoquímicos tal como  $\gamma$ -orizanol, tocoferóis, tocotrienóis e polifenóis, que previnem danos oxidativos dos tecidos do corpo e do DNA, além de funções de diminuir o colesterol, benefícios para a saúde cardiovascular e atividade anti-tumoral.

### 3.2. DISPONIBILIZAÇÃO DE MINERAIS

Na Tabela 4 estão os teores de minerais analisados durante a fermentação do farelo de arroz pelo fungo *Rhizopus oryzae*.

**Tabela 4** - Teor de minerais em farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação por 0, 24, 48, 72 e 96 h e farelo não fermentado (NF).

Minerais	FI					
	NF	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Ca	854±48 <sup>a</sup>	649±14 <sup>b</sup>	630±55 <sup>b</sup>	668±56 <sup>ab</sup>	782±82 <sup>a</sup>	725±36 <sup>a</sup>
Fe*	<39	<39	<39	<39	<39	<39
Mg	10287±707 <sup>b</sup>	9704±715 <sup>a</sup>	7140±504 <sup>c</sup>	12229±968 <sup>a</sup>	11164±1117 <sup>a</sup>	10948±694 <sup>a</sup>
Na*	101±6	<75	<75	115±4	104±13 <sup>ab</sup>	111±3 <sup>a</sup>
P	29326 1626 <sup>c</sup>	29532±657 <sup>c</sup>	30716±2147 <sup>c</sup>	34287±1258 <sup>b</sup>	38201±1521 <sup>a</sup>	40741±1764 <sup>a</sup>
S	1819±78 <sup>d</sup>	2129±201 <sup>c</sup>	2580±145 <sup>b</sup>	2941±219 <sup>b</sup>	3778±199 <sup>a</sup>	4036±480 <sup>a</sup>
Cr	1,81±0,20 <sup>b</sup>	1,72±0,32 <sup>b</sup>	2,12±0,20 <sup>ab</sup>	1,91±0,31 <sup>a</sup>	1,82±0,38 <sup>a</sup>	2,42±0,28 <sup>a</sup>
Cu	9,56±0,17 <sup>b</sup>	8,83±0,5 <sup>c</sup>	12,0±1,1 <sup>ab</sup>	10,4±1,1 <sup>b</sup>	12±1 <sup>ab</sup>	12,8±0,2 <sup>a</sup>
Mn	207±6 <sup>c</sup>	173±9 <sup>d</sup>	219±9 <sup>b</sup>	215±13 <sup>b</sup>	233±5 <sup>b</sup>	271±6 <sup>a</sup>
Zn	74,6±3,1 <sup>b</sup>	70,9±2,3 <sup>b</sup>	92,1±2,5 <sup>a</sup>	94,7±9,1 <sup>a</sup>	105±10 <sup>a</sup>	110±4 <sup>a</sup>
Minerais	FD					
	NF	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Ca	692±29 <sup>c</sup>	652±7 <sup>c</sup>	743±6 <sup>b</sup>	885±17 <sup>a</sup>	869±15 <sup>a</sup>	865±26 <sup>a</sup>
Fe	163±17 <sup>a</sup>	90±3 <sup>b</sup>	68±2 <sup>c</sup>	51±2 <sup>d</sup>	32±3 <sup>f</sup>	44±5 <sup>e</sup>
Mg	12724±1619 <sup>a</sup>	7196±488 <sup>b</sup>	6102±389 <sup>c</sup>	3596±166 <sup>d</sup>	2671±126 <sup>e</sup>	2472±135 <sup>f</sup>
Na	72,0±4,2 <sup>b</sup>	73,3±4,5 <sup>b</sup>	78,2±2,6 <sup>b</sup>	96,8±6,1 <sup>a</sup>	92,3±6,4 <sup>a</sup>	93,1±1,1 <sup>a</sup>
P	28548±163 <sup>d</sup>	28292±19 <sup>d</sup>	31993±214 <sup>c</sup>	36236±165 <sup>b</sup>	38251±593 <sup>a</sup>	39267±734 <sup>a</sup>
S	2703±18 <sup>d</sup>	2831±80 <sup>c</sup>	3123±17 <sup>b</sup>	3606±62 <sup>a</sup>	3749±119 <sup>a</sup>	3924±119 <sup>a</sup>
Cr	1,19±0,05 <sup>b</sup>	1,12±0,17 <sup>b</sup>	1,12±0,16 <sup>b</sup>	1,49±0,11 <sup>a</sup>	1,22±0,18 <sup>ab</sup>	1,30±0,23 <sup>a</sup>
Cu	8,44±0,08 <sup>d</sup>	8,51±0,05 <sup>d</sup>	10,0±0,2 <sup>c</sup>	11,8±0,4 <sup>a</sup>	10,8±0,1 <sup>b</sup>	12,3±0,1 <sup>a</sup>
Mn	211±2 <sup>d</sup>	207±3 <sup>d</sup>	229±2 <sup>c</sup>	248±2 <sup>b</sup>	257±1 <sup>a</sup>	253±9 <sup>ab</sup>
Zn	62,0±1,1 <sup>d</sup>	60,7±0,3 <sup>d</sup>	67,9±0,3 <sup>c</sup>	77,9±1,6 <sup>b</sup>	80,0±1,0 <sup>a</sup>	79,9±2,7 <sup>ab</sup>

Os resultados estão em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e representados como média  $\pm$  desvio padrão. \*Valores sem análise estatística.

Nos resultados referentes ao FI durante 0, 24, 48, 72 e 96 h verifica-se que, com exceção dos valores obtidos para cálcio e ferro, a fermentação com o fungo filamentosso *Rhizopus oryzae* CCT 7560 durante 72 h e 96 h aumentou ( $p<0,05$ ) o teor de minerais quando comparado antes do processo fermentativo. Os níveis de cálcio e ferro, apesar de não terem sido elevados, foram semelhantes aos presentes na matéria-prima. Em relação à parte inferior

da tabela 4 (FD) pode-se verificar que o teor de minerais, também com exceção dos obtidos para cálcio e ferro, foram aumentados após o processo fermentativo de 96 h, entretanto o teor de ferro diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) neste tempo. Os demais tempos de fermentação influenciaram de forma distinta nos níveis de cada mineral, tanto para o FI como para o FD.

Processos fermentativos são as transformações do material biológico ou de um meio sintético que o substitua, por agentes também biológicos, originando produtos desejados. Para a realização da fermentação é necessária adição da solução nutriente e do micro-organismo, o que provavelmente irá aumentar, conforme as substâncias acrescentadas, o teor de nutrientes até iniciar o seu consumo e conseqüentemente as transformações próprias do processo (REGULY, 1996). O tempo 0 h neste trabalho corresponde a esta etapa, na qual o substrato foi adicionado do material biológico e do micro-organismo necessário, entretanto sem fornecer tempo para a atividade metabólica, assim, comparar este tempo experimental com os demais é de extrema importância para o estudo dos benefícios do processo fermentativo na biodisponibilidade dos nutrientes.

Assim, comparando os tempos de fermentação 0 e 96 h, verifica-se que, tanto ao se utilizar o FI ou o FD como substrato, os teores de minerais, como exceção do ferro e magnésio, foram superiores no maior tempo de processo fermentativo ( $p < 0,05$ ). A presença de quantidade igual ou superior de magnésio no tempo 0 h pode ser explicada pela adição de  $MgSO_4$  da solução nutriente para a manutenção do micro-organismo. A diminuição às 24 h deste mineral pode ser explicada por o mesmo ser utilizado como cofatores de enzimas que o *R. oryzae* produz durante a fermentação. Para um estudo mais detalhado de qual a melhor fonte nutricional entre as analisadas construiu-se a Tabela 5, a qual reúne as melhores respostas para o perfil de minerais nos farelos expostos a 0 e 96 h de fermentação com os dados recomendados para ingestão diária pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2005).

O cálcio é um mineral essencial necessário para realização de diversas funções biológicas. Estudos demonstram a associação entre o baixo consumo de cálcio e doenças crônicas, como osteoporose, câncer de colón, hipertensão arterial e obesidade. No Brasil grande parte da população apresenta consumo de cálcio abaixo do recomendado (BRASIL, 2005). Conforme observado na Tabela 5, o FDF durante 96 h foi a amostra que apresentou maior teor deste mineral ( $p < 0,05$ ), seguida pelo FIF.

**Tabela 5** - Valores de minerais em farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação por 0h e 96 h em comparação com o índice de Ingestão Diária Recomendado.

Mineral	FI 0 h	FD 0 h	FIF 96 h	FDF 96 h	IDR <sup>1</sup>	IDR <sup>2</sup>
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$				$\mu\text{g}$	
<i>Macronutrientes</i>						
Ca	649±14 <sup>c</sup>	652±7 <sup>c</sup>	725±36 <sup>b</sup>	865±26 <sup>a</sup>	10 (x10 <sup>5</sup> )	5 – 7 (x10 <sup>5</sup> )
Na*	<75	73,3±4,5	111±3	93,1±1,1	5 (x10 <sup>5</sup> )	5 (x10 <sup>5</sup> )
Mg	9704±715 <sup>a</sup>	7196±488 <sup>b</sup>	10948±694 <sup>a</sup>	2472±135 <sup>c</sup>	2,6 (x10 <sup>5</sup> )	0,6 – 1 (x10 <sup>5</sup> )
P	29532±657 <sup>b</sup>	28292±19 <sup>c</sup>	40741±1764 <sup>a</sup>	39267±734 <sup>a</sup>	7 (x10 <sup>5</sup> )	4,6 – 12,5 (x10 <sup>5</sup> )
S	2129±201 <sup>c</sup>	2831±80 <sup>b</sup>	4036±480 <sup>a</sup>	3924±119 <sup>a</sup>	-	-
<i>Micronutrientes</i>						
Fe*	<39	90±3	<39	44±5	14000	6000 – 9000
Cr	1,72±0,32 <sup>b</sup>	1,12±0,17 <sup>b</sup>	2,42±0,28 <sup>a</sup>	1,30±0,23 <sup>b</sup>	35	11 – 15
Cu	8,83±0,5 <sup>b</sup>	8,51±0,05 <sup>b</sup>	12,8±0,2 <sup>a</sup>	12,3±0,1 <sup>a</sup>	900	340 - 440
Mn	173±9 <sup>c</sup>	207±3 <sup>b</sup>	271±6 <sup>a</sup>	253±9 <sup>a</sup>	2300	1200 – 1500
Zn	70,9±2,3 <sup>c</sup>	60,7±0,3 <sup>d</sup>	110±4 <sup>a</sup>	79,9±2,7 <sup>b</sup>	7000	4100 – 5600

\*Valores sem análise estatística. FIF=Farelo integral fermentado, FDF=Farelo desengordurado fermentado.

<sup>1</sup>Ingestão diária recomendada para adultos (BRASIL, 2005); <sup>2</sup>Ingestão diária recomendada para crianças entre 1 e 10 anos (BRASIL, 2005).

Normalmente encontrado nos alimentos sob a forma de sal (cloreto de sódio), o sódio, também é um mineral essencial às diversas funções vitais do organismo, como contração muscular, manutenção da pressão arterial, transmissão nervosa e equilíbrio de fluidos. O cloreto de sódio ou o “sal” ou ainda o “ouro branco” está associado com saúde e saudável, “*salus*” e “*salubris*”, derivadas de “sal”, entretanto, atualmente, se tem conhecimento de que um elevado consumo deste mineral pode desencadear diversas disfunções no organismo. Foram observadas evidências da associação entre o alto consumo de sódio e doença cardiovascular e acidente vascular cerebral, independentes ou associadas com aumento da pressão arterial (SARNO, 2010). Nas amostras estudadas pelo nosso grupo de pesquisa os valores mais elevados de cálcio foram encontrados no FDF e FIF, correspondendo, respectivamente, a 0,15 e 0,2 % da IDR para adultos.

Assim, como os macrominerais citados anteriormente, o magnésio, fósforo e enxofre são componentes vitais ao organismo do ser humano. O magnésio é constituinte de

muitas coenzimas e essencial para o funcionamento normal dos nervos e músculos; o fósforo participa da formação de energia para reações celulares na forma de ATP (Adenosina trifosfato), forma ossos e dentes, entre outras funções e o enxofre participa da estrutura de muitas proteínas (BRAGA; MENDONÇA, 2010). A utilização do fósforo dos alimentos de origem vegetal pelos animais monogástricos está diretamente relacionada com o conteúdo de fitato, já que o fósforo não é utilizado por esses animais, devido à ausência da enzima fitase no seu trato digestivo, com o processo fermentativo o fungo *Rhizopus oryzae* produz a enzima fitase (LENNARTSSON; TAHERZADEH, 2014; OLIVEIRA et al., 2010), a qual atua hidrolisando os fitatos presentes no farelo, e liberando o fósforo. O teor de magnésio foi significativamente mais elevado no farelo de arroz integral, tanto fermentado como não. Já os valores de fósforo e enxofre foram superiores ( $p < 0,05$ ) nos farelos fermentados (integral e desengordurado).

O ferro é um micronutriente essencial presente em diversos alimentos, sendo que 60 a 70% do ferro total presente em seres humanos encontra-se associado à hemoglobina. Existem vários alimentos ricos em ferro e entre eles, estão: germe de trigo, folha da salsa, aveia, espinafre, arroz, leguminosas em geral, cenoura, couve, repolho, entre outros. As concentrações de ferro encontradas em cereais e em grãos não diferem muito, sendo que a média comum entre eles é de 25 a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$  (VENEZUELA, 2001). Se tomarmos como referência alimentos conhecidos mundialmente como fonte de ferro, tais como fígado cru (56  $\mu\text{g de Fe g}^{-1}$ ); feijão rajado cru (18,6  $\mu\text{g de Fe g}^{-1}$ ) e açúcar mascavo (8,6  $\mu\text{g de Fe g}^{-1}$ ) (TACO, 2011) tem-se o farelo de arroz como uma fonte bem representativa do mineral, principalmente o FD estudado.

Nesta pesquisa, o FIF se mostrou uma excelente fonte de cromo (cada 1 g de biomassa é capaz de suprir 7% e 22% da IDR para adultos e para crianças, respectivamente) e de zinco (1,5% da IDR para adultos e 2,7% da IDR para crianças). O cromo está associado à manutenção do metabolismo da glicose, possivelmente pela potencialização da ação da insulina em nível da membrana celular e assim, influencia o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas; enquanto que o zinco, é um componente estrutural e/ou funcional de várias metaloenzimas e metaloproteínas, participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como função imune, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento (CASEY; WALRAVENS, 1988; VENEZUELA, 2001).

O cobre pode ser encontrado nos tecidos biológicos sob a forma de complexos orgânicos, como as metaloproteínas que possuem atividade enzimática. A utilização de oxigênio durante a respiração celular, utilização de energia e síntese de compostos essenciais

são exemplos de reações metabólicas intermediadas por enzimas que requerem a presença de cobre para apresentarem atividade catalítica. O manganês participa da formação de tecido conjuntivo e ósseo, crescimento e reprodução e metabolismo de carboidratos e lipídios (PREDRAZA et al., 2011). Desta forma, apesar de serem necessários em baixas concentrações, são considerados essenciais ao metabolismo humano. Os farelos fermentados integral (FI) e desengordurado (FD) se mostraram como excelentes fontes de cobre e manganês. Os teores de cobre nos farelos fermentados representam cerca de 1,5% e 3,5%; enquanto que o de manganês a cerca de 12 e 22% da IDR para adultos e crianças, respectivamente.

Conforme Chaud, Arruda e Felipe (2009), em relação à composição de minerais, o farelo de arroz é extremamente rico em fósforo, manganês, cobre, ferro e zinco; e, como outros farelos, deficiente em cálcio. Os farelos de arroz avaliados nesta pesquisa se mostraram ricos nestes minerais e, após a fermentação, tanto o farelo integral como o desengordurado, tiveram seus teores aumentados com o processo.

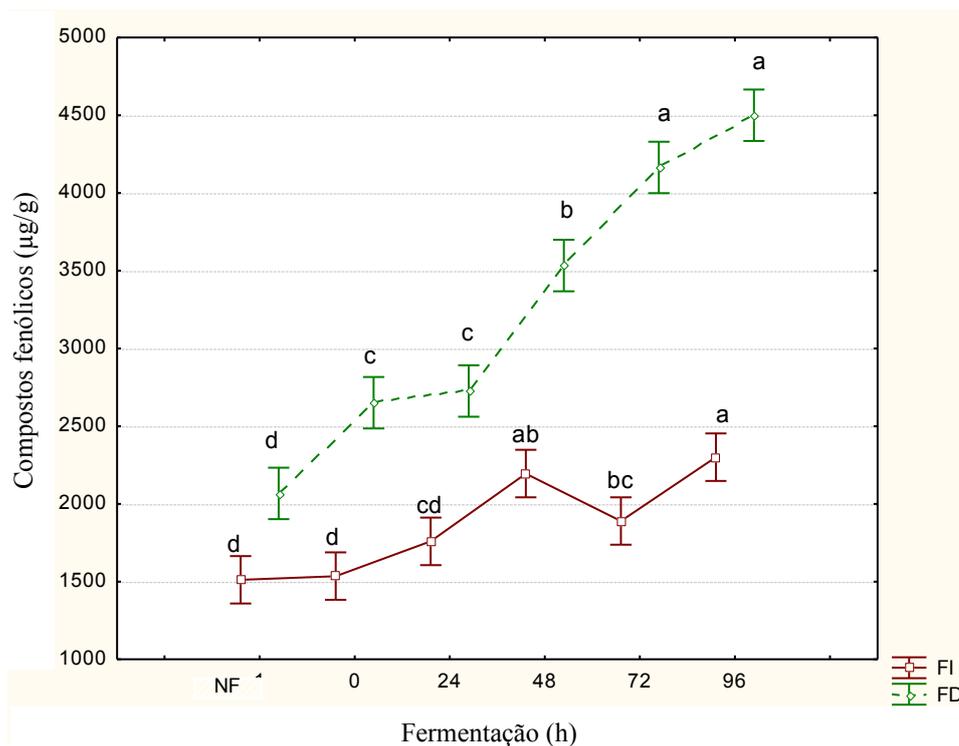
São poucos os estudos sobre a determinação de minerais em farelo de arroz; em geral o que ocorre é a determinação da fração de cinzas. Faria, Bassinello e Pentado (2012) determinaram alguns minerais em farelo de arroz integral submetido a diferentes tratamentos de conservação do subproduto, tais como micro-ondas e forno convencional. Foram encontrados valores superiores de cálcio ( $733 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e ferro ( $115 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) no farelo de arroz integral submetido à ação das micro-ondas, quando comparado aos demais tratamentos. Lacerda et al. (2010) determinaram os teores de cálcio, magnésio, potássio, fósforo, ferro, cobre, zinco e manganês em farelo de arroz integral cru, extrusado e parboilizado. Este último tratamento foi o que apresentou resultados mais elevados para os teores de minerais, com exceção de magnésio, potássio e ferro. Kraler et al. (2014) realizaram uma pesquisa para avaliar a biodisponibilidade *in vivo* de minerais em farelo de trigo fermentado extrusado e concluíram que estes métodos realmente exercem influência sobre a disponibilidade dos nutrientes.

De acordo com este estudo pode-se observar o potencial que o farelo de arroz possui, não somente para o consumo animal ou para extração de nutrientes de interesse, mas também como uma possível solução para a nutrição de seres humanos. Com o auxílio da fermentação teores de proteínas, fibras, lipídios e minerais aumentam, incorporando ainda mais o substrato e auxiliando para o enriquecimento do produto.

### 3.3. DISPONIBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Na Figura 1 esta demonstrada a extração dos compostos fenólicos durante a fermentação pelo fungo *Rhizopus oryzae*.

**Figura 1** - Compostos fenólicos de farelo de arroz integral (FI) e farelo de arroz desengordurado (FD) durante a fermentação e não fermentado (NF).



Foi verificado aumento significativo no conteúdo de fenóis após 48 h de fermentação tanto para o FI quanto para o FD, sendo que a biomassa fúngica com FD apresentou maior quantidade de fenóis (Figura 1). Esta diferença pode estar relacionada com o fato da utilização do farelo de arroz desengordurado como substrato (OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2007), já que alguns ácidos fenólicos derivados de grãos estão ligados a polissacarídeos, ligninas e suberina que são materiais da parede celular. Compostos fenólicos em farelo de arroz podem estar na forma livre solúvel, solúvel conjugado e insolúvel de forma ligada (MIRA et al., 2008), e há duas rotas para formação dos mesmos, da decomposição entre ligações da lignina, celulose e hemicelulose ou pela produção a parte do óleo de farelo de arroz (POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2010). O aumento dos fenóis durante a fermentação é causado principalmente pela clivagem dos compostos complexados com lignina (KUPSKI et al., 2012). Os compostos fenólicos

desempenham ações fisiológicas, tais efeitos estão relacionados, principalmente, ao combate à geração de espécies reativas de oxigênio, o que, por sua vez, contribui para a redução do estresse oxidativo, comum em doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Resultados semelhantes foram relatados de acordo com Kupski et al. (2012) e Schmidt et al. (2014) onde a fermentação em estado sólido do farelo de arroz integral por *Rhizopus oryzae* duplicou o teor de compostos fenólicos. Dey e Kuhad (2014) melhoraram a extração de compostos fenólicos por fermentação em estado sólido a partir de trigo por *Rhizopus oryzae* utilizando diferentes condições de extração. Razak et al. (2015) constataram o efeito da fermentação, com culturas únicas e mistas de dois tipos de fungos: *Rhizopus oligosporus* e *Monascus purpureus*, em estado sólido, utilizando vários tipos de fungos sobre o aumento do teor de ácido fenólico de farelo de arroz comparando com a não fermentada.

#### **4. CONCLUSÃO**

Foi possível verificar que o processo fermentativo por fungo filamentosos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 influenciou positivamente na composição proximal aumentando fibras, cinzas, proteínas e lipídios. O mesmo resultado foi observado quanto aos níveis de minerais, tanto no farelo integral quanto no desengordurado, em especial quando realizado durante 96 h. Ao analisar exclusivamente o tempo de 96 h, o farelo de arroz integral fermentado (BI) apresentou respostas mais elevadas, com exceção do teor de cálcio, respondendo melhor à IDR para adultos e crianças, quando comparado ao farelo de arroz desengordurado fermentado (BD). Os compostos fenólicos aumentaram para ambos os farelos com a fermentação, destacando o farelo desengordurado, acrescendo estes teores em mais de 100%. Com estes resultados, os farelos de arroz fermentados apresentam nutrientes interessantes para o consumo mostrando uma alternativa para alimentação humana.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao suporte da CAPES (processo nº 23038.029595/2009), do CNPq (processo nº 472562/2012-6) e da FAPERGS (processo nº 2485.271.13638.270202013).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, 14th ed. Washington, 2000.

AVILA, L. A. de; MARCHEZAN, E; WALTER, M. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1184-1192, 2008.

BRAGA, E. O.; MENDONÇA, L. G. Discussion of the rational use of human diets, with focus to its main constituents: linseed and quinoa. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2, n. 1, p. 32-43, 2010.

BHANGER, M. I.; IQBAL, S.; ANWAR, F.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.; ZIA-UL-HAQ, M. Antioxidant potential of rice bran extracts and its effects on stabilization of cookies under ambient storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, p. 779–786, 2008.

Brasil – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>

CASEY, C. E.; WALRAVENS, P. A. **Nutrition during infancy**. Philadelphia: Hanley E Belfus. 126 p., 1988.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**. v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

CIENTEC - Fundação de ciência e tecnologia. Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Diário Oficial da União: 1991.

CONTRERAS-CALDERON, J.; CALDERON-JAIMES, L.; GUERRA-HERNANDEZ, E.; GARCIA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, p. 2047–2053, 2011.

DEY, T. B.; KUHAD, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 120-127, 2014.

FARIA, S. A. dos S. C.; BASSINELLO, P. Z.; PENTEADO, M. V. C. Nutritional composition of rice bran submitted to different stabilization procedures. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 651-657, 2012.

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

FREEMAN, D.W. **Use of by-product and nontraditional feeds for horses**, 2006.

Disponível em: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>. Acesso em setembro 2015.

GRIFFIN DH. **Fungal physiology**. 2nd ed., 1993.

GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A.K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2015.

IRAKLI, M.; KATSANTONIS, D.; KLEISIARIS, F. Evaluation of quality attributes, nutraceutical components and antioxidant potential of wheat bread substituted with rice bran. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 74-80, 2015.

IRGA - Instituto Rio Grandense do Arroz (2016). Setor Produtivo: Plantio do arroz safra 2015/16.

KRALER, M.; SCHEDULE, K.; DOMIG, K. J.; HEINE, D.; MICHELMAYR, H.; KNEIFEL, W. Effects of fermented and extruded wheat bran on total tract apparent digestibility of nutrients, minerals and energy in growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 121–129, 2014.

KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E.; ROCHA, M. DA, OLIVEIRA; M. DOS, SOUZA-SOARES; L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Solid-State Fermentation for the Enrichment and Extraction of Proteins and Antioxidant Compounds in Rice Bran by *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 937-942, 2012.

LACERDA, D.B. C. L.; JUNIOR, M. S. S.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L.; SILVA-LOBO, V. L.; CAMPOS, M. R. H.; SIQUEIRA, B. S. Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, p. 521-530, 2010.

LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. **Rhizopus**. Encyclopedia of food microbiology, n. 2, p. 284-290, 2014.

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

OLIVEIRA, M. dos S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A. de; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, M. S; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, v. 8, n. 3, p. 7-11, 2010.

POURALI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 259-266, 2010.

PREDRAZA, D. F.; ROCHA, A.C. D.; QUEIROZ, E. O.; SOUSA, C. P. C. Zinc nutritional status in children attending public daycare centers in the state of Paraíba, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 4, 539-552, 2011.

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 33-38, 2015.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**, primeira ed. Pelotas, Rio Grande do Sul. 1996.

SANTOS, L. P.; MORAIS, D. R.; SOUZA, N. E.; COTTICA, S. M.; BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V. Compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. **Food Research International**, v. 44, p. 1414-1418, 2011.

SARNO, F. **Estimativas do consumo de sódio no Brasil, revisão dos benefícios relacionados à limitação do consumo deste nutriente na Síndrome Metabólica e avaliação do impacto de intervenção no local de trabalho**. Tese de doutorado (Nutrição em Saúde Pública). São Paulo, SP, Brasil. 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. Engenharia Bioquímica, Ed. Blucher, v. 2, p. 247-248, 2001.

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

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

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

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa L.*). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n.2, p. 192-200, 2009.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA Universidade Estadual de Campinas, quarta ed. 161 p. 2011.

TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N.; KOCABIYIK, H.; UYGUR, A. The effect of infrared stabilized rice bran substitution on physicochemical and sensory properties of pan breads: part I. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 155–161, 2014.

VELLOZO, E. P.; FISBERG M. O. Impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 2, p. 134-139, 2010.

VENEZUELA, T. C. **Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de Nova Friburgo**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 96, 2001.

**ARTIGO II**

**INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR *Saccharomyces cerevisiae*  
EM FARELO DE ARROZ INTEGRAL E DESENGORDURADO NOS TEORES DE  
NUTRIENTES**



**INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO POR *Saccharomyces cerevisiae*  
NA AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES EM FARELOS DE ARROZ INTEGRAL E  
DESENGORDURADO**

**RESUMO**

A fermentação em estado sólido tem sido aplicada em resíduos agroindustriais como forma de disponibilizar maior conteúdo de nutrientes e bioativos. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da aplicação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando os farelos de arroz integral e desengordurado como substratos, para estudo dos seus efeitos nos teores de proteínas, lipídeos, fibras, carboidratos, minerais e compostos fenólicos. Os farelos de arroz foram submetidos à fermentação em estado sólido utilizando a levedura (3% pp<sup>-1</sup>) e água (30%) por até 8 h a 30 °C. Nos farelos, e em suas biomassas, foram determinados os macro nutrientes, os minerais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplados, e compostos fenólicos, solúveis em metanol. A levedura promoveu o aumento de cinzas, proteínas e compostos fenólicos, em 5%, 62% e 10%, respectivamente no farelo de arroz integral fermentado por 6 h. Para o farelo desengordurado acarretou no aumento de lipídeos em 38% e fibras em 14%. Os minerais se alteraram com a fermentação em ambos os farelos fermentados. Os compostos fenólicos foram extraídos em maior proporção no farelo de arroz integral fermentado, alcançando níveis de 1165 µg g<sup>-1</sup> de farelo. Em vista disso, o farelo de arroz integral fermentado por 6 h se destacou na disponibilidade dos nutrientes e bioativos.

Palavras-chaves: Bioativos. Fermentação em estado-sólido. Levedura. Resíduos agroindustriais.



## 1. INTRODUÇÃO

O farelo de arroz, coproduto obtido pela indústria de moagem de arroz, está ganhando importância comercial no mundo por possuir efeitos nutritivos e biológicos. É uma fonte rica em fibras, vitaminas, proteínas, minerais, lipídeos e polifenóis (IRAKLI et al., 2015, POULEV et al., 2018), podendo ser incorporado nas dietas humanas para melhorar a saúde, particularmente nos países em desenvolvimento.

Os materiais celulósicos e hemicelulósicos, contendo glicose e xilose como principais componentes de açúcar, são considerados recursos de biomassa sustentáveis, e vários esforços têm sido realizados para produzir a partir desses, além de bioetanol, outros compostos usando leveduras e demais microrganismos (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009; CHRIST-RIBEIRO et al., 2017b; NAMBU-NISHIDA et al., 2018). A fermentação é uma biotecnologia essencial para a conversão de materiais lignocelulósicos, presentes em cascas e farelos, em compostos que apresentam potencial para fornecer soluções para problemas de nutrição, como a ingestão inadequada de proteínas, minerais, fibras e lipídeos. Isso também reduz o desperdício, a poluição ambiental e aumenta a qualidade dos subprodutos (CHRIST-RIBEIRO et al., 2017a). Produtos fermentados contêm nutrientes que podem alimentar humanos e animais, substituindo assim fontes convencionais. No entanto, é importante usar microrganismos que são "Geralmente considerados como seguros (GRAS)" na fermentação, para promover seu uso. *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente aceita devido à história de seu uso na fermentação tradicional e qualidade nutricional (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000; ARUNA et al., 2017; NASSERI et al., 2011).

Com o emprego da fermentação, a maioria dos minerais presentes em produtos ricos em lignina, como o farelo de arroz, tornam-se biodisponíveis e bioacessíveis (CHRIST-RIBEIRO et al., 2017a). Elementos essenciais, como os minerais, devem ser incorporados pela dieta, e são importantes para o funcionamento do corpo humano devido à sua interação em processos genéticos e fisiológicos, e, conseqüentemente, a deficiência dos mesmos poderia trazer anormalidades estruturais e fisiológicas (MIR-MARQUÉS et al., 2016).

Além desses nutrientes presentes no farelo de arroz, este ainda contém altos níveis de fitoquímicos como vitaminas,  $\gamma$ -orizanol, ácido fítico, tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, esqualeno, ácidos gordos insaturados, fitosteróis e compostos fenólicos (CHRIST-RIBEIRO et al., 2017b; MASSAROLO et al., 2017; POULEV et al., 2018). Dentre eles, os fenólicos têm sido amplamente investigados por possuírem uma gama diversificada de bioatividades, como antioxidantes, antimicrobianas, antivirais,

propriedades antiinflamatórias e, em geral, para a promoção da saúde humana. Essas propriedades bioativas tornam esses compostos com papel importante na prevenção de certas doenças crônicas como diabetes, inflamação crônica, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (CHRIST-RIBEIRO et al, 2017a; WANG et al., 2015.).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando farelos de arroz integral e desengordurado como substrato, e os teores de proteínas, lipídeos, fibras, carboidratos, minerais e compostos fenólicos após suas fermentações.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

Os farelos de arroz integral (FI) e desengordurado (FD) foram fornecidos por indústrias de beneficiamento do grão no Rio Grande do Sul, Brasil. A levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), foi adquirida no comércio local e utilizada como fonte das células.

### **2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

A fermentação em estado sólido foi realizada de acordo com Feddern et al. (2007), onde os farelos de arroz (integral e desengordurado) foram distribuídos em uma camada de 1 cm em biorreatores de bandeja (29 x 17 x 5,5 cm) e esterilizados. Após foi adicionada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, previamente hidratada (3% pp<sup>-1</sup>), e a umidade do meio foi ajustada para 30% com adição de água esterilizada. O processo foi realizado em estufa com circulação de ar a 30 °C, por 8 h. Alíquotas de biomassa foram retiradas a cada 2 h de fermentação, e congeladas, para posterior determinação.

### **2.3 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ**

A composição proximal dos farelos foi determinada de acordo com os métodos AOAC (2000) para umidade (n° 935.29), proteína (n° 920.87), lipídeos (n° 920.85) e cinzas (n° 923.03). O conteúdo de fibra foi determinado por gravimetria, através dos resíduos básicos

e ácidos utilizados na digestão das amostras (CIENTEC, 1991). Carboidratos foram estimados por diferença.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

O FI, FD e fermentados foram pesados (~ 300 mg) em triplicata e a digestão foi realizada em forno micro-ondas modelo Speedwave four (Berghof, Alemanha), de acordo com o programa descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** - Programa de aquecimento do micro-ondas.

Etapas	Rampa (min)	T (°C)	Tempo de permanência (min)	Pressão(bar)
1	20	170	10	35
2	5	200	25	35
3	5	50	20	35

**Tabela 2** - Condições de operações do ICP OES\*.

Paramêtros	Condições
Potência (W)	1400
Fluxo de gás principal (L min <sup>-1</sup> )	15
Fluxo de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0.2
Fluxo de gás de neutralização (L min <sup>-1</sup> )	0.7
Comprimento de onda (nm)	Ca 315.887
	Fe 238.204
	Mg 279.077
	Na 589.592
	P 214.914
	S 181.975
	Cr 267.717
Cu 324.759	
Mn 259.374	
Zn 213.857	

\* Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Para digestão foram utilizados 5 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado (Merck) e 0,5 ml de ácido fluorídrico (HF) 40% (Merck). Após a digestão, as amostras foram diluídas de 5 alíquotas em HNO<sub>3</sub> 5%, para posterior quantificação. As determinações foram feitas em espectrômetro de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente Perkin Elmer (modelo Optima 4300 DV, Shelton, EUA). A introdução das amostras no espectrômetro foi realizada empregando um nebulizador GemCone e um nebulizador de câmara ciclônica. Outras condições operacionais do equipamento estão descritas na Tabela 2. O plasma foi formado a partir de argônio, com pureza de 99,996% (AOAC, 2000).

## 2.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos foram extraídos a frio com metanol como solvente extrator na proporção de 1:8 (p / v). A mistura foi submetida a agitação orbital, 160 rpm à temperatura ambiente por 2 h. Após repouso por 15 min, foi feita nova adição de 10 mL de solvente, seguido de agitação durante 1 h. Os extratos metanólicos foram evaporados em rota-evaporador e os compostos fenólicos foram ressuspensos com água destilada. O extrato resultante foi clarificado, centrifugado e filtrado para obtenção de compostos fenólicos. O conteúdo total de compostos fenólicos foi quantificado por espectrofotômetro a 750 nm com reagente de Folin-Ciocalteu, usando ácido gálico (Sigma-Aldrich, Japão) como padrão (2 a 30 µg ml<sup>-1</sup>) (SOUZA et al., 2009).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados como média (Teste de Tukey) e o teste de Análise de Variância unidirecional (ANOVA) foram utilizados para determinar diferenças significativas entre as variáveis. Diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão os resultados de cinzas, proteínas, lipídeos, fibras e carboidratos nos FI, FD e fermentados por até 8 h.

De acordo com a Tabela 3 houve aumento dos teores de cinzas, proteínas, fibras e diminuição dos lipídeos e carboidratos com a aplicação de *S. cerevisiae* no farelo de arroz

integral durante 8 h de fermentação. Para o farelo de arroz desengordurado houve aumento dos teores de lipídeos e fibras e diminuição dos carboidratos. Mantiveram-se os valores de cinzas, durante o processo de fermentação e proteínas, quando comparado ao farelo não fermentado. Destaca-se a fermentação de 6 h que apresentaram os maiores níveis dos compostos analisados para ambos os farelos.

Durante a fermentação alcoólica, a via metabólica de *S. cerevisiae* é caracterizada por uma interação complexa entre acetilação, produção e degradação de aminoácidos (BENUCCI et al., 2017). Uma barreira para a produção de compostos a partir da biomassa é que, em materiais lignocelulósicos, a celulose está fortemente ligada às hemiceluloses e à lignina. Esta ligação resiste à degradação e confere estabilidade hidrolítica e robustez estrutural às paredes celulares das plantas. Para superar a resistência da lignocelulose, é necessário um tratamento, biotecnológico, para alterar a estrutura, bem como a sua composição química microscópica, de modo que a hidrólise enzimática da fração de carboidrato para os açúcares monoméricos possa ser alcançada com maior rapidez e com maiores rendimentos (DAS, 2013; OH; CHOI; KIM, 2017). Com isso, o crescimento do microrganismo sobre um substrato altera a composição química dele devido à produção de enzimas exocelulares, para a obtenção de nutrientes, além da produção de outros metabólitos próprios do agente fermentador. Esta metabolização pode enriquecer o substrato, dependendo dos componentes intrínsecos do agente fermentador, ou pela disponibilização de nutrientes presentes nele, que antes da ação microbiana se encontravam associados de forma não acessível aos processos extrativos químicos ou enzimáticos (OLIVEIRA et al, 2010).

Conforme a Tabela 3, os resultados estão de acordo com Feddern, Furlong e Soares (2007) que obtiverem aumento de cinzas e fibras em 13 e 2%, respectivamente, e diminuição de carboidratos em 4,8% no tempo de 6 h de fermentação por *S. cerevisiae*. De acordo com Aruna et al. (2017) a fermentação em estado sólido de cascas de inhame utilizando a mesma levedura por 96 h, apresentou aumento dos teores de proteína bruta, teor de proteínas, lipídeos e cinzas em 6,6%, 4,3%, 1,1% e 4,4% para 15,5%, 13,3%, 2,1% e 8,0%, respectivamente, quando a fermentação atingiu 96 h na presença de sulfato de amônio. Na Tabela 4 estão analisados os minerais Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Magnésio (Mg), Sódio (Na), Fósforo (P), Enxofre (S), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) e suas variações durante a fermentação.

**Tabela 3** - Composição proximal (%) de FI, FD fermentados e não fermentado (NF), submetidos a diversos tempos de fermentação.

	Cinzas		Proteínas		Lipídeos		Fibras		Carboidratos	
	FI	FD	FI	FD	FI	FD	FI	FD	FI	FD
<b>NF</b>	13,8 <sup>cA</sup>	12,6 <sup>aB</sup>	7,4 <sup>dB</sup>	29,7 <sup>aA</sup>	30,71 <sup>aA</sup>	2,4 <sup>dB</sup>	5,4 <sup>bA</sup>	4,8 <sup>bB</sup>	31,2 <sup>aB</sup>	39,7 <sup>aA</sup>
<b>0 h</b>	14,2 <sup>bA</sup>	12,2 <sup>aB</sup>	12,6 <sup>cB</sup>	24,2 <sup>cA</sup>	20,33 <sup>cA</sup>	2,8 <sup>cB</sup>	5,2 <sup>bB</sup>	5,5 <sup>aA</sup>	15,4 <sup>bB</sup>	22,6 <sup>bA</sup>
<b>2 h</b>	14,2 <sup>bA</sup>	12,2 <sup>aB</sup>	12,0 <sup>cB</sup>	21,7 <sup>dA</sup>	20,08 <sup>cA</sup>	3,1 <sup>cB</sup>	5,2 <sup>bB</sup>	5,6 <sup>aA</sup>	15,9 <sup>bB</sup>	25,1 <sup>bA</sup>
<b>4 h</b>	14,2 <sup>bA</sup>	12,1 <sup>aB</sup>	20,5 <sup>aB</sup>	26,3 <sup>bA</sup>	19,44 <sup>cA</sup>	3,5 <sup>bB</sup>	5,5 <sup>bA</sup>	5,2 <sup>bB</sup>	11,2 <sup>cB</sup>	21,3 <sup>cA</sup>
<b>6 h</b>	14,5 <sup>aA</sup>	12,4 <sup>aB</sup>	19,5 <sup>aB</sup>	29,1 <sup>aA</sup>	20,73 <sup>cA</sup>	4,0 <sup>aB</sup>	6,3 <sup>aA</sup>	5,6 <sup>aB</sup>	7,7 <sup>dB</sup>	17,5 <sup>dA</sup>
<b>8 h</b>	14,4 <sup>aA</sup>	12,2 <sup>aB</sup>	17,9 <sup>bB</sup>	27,2 <sup>bA</sup>	22,00 <sup>bA</sup>	3,6 <sup>bB</sup>	6,2 <sup>aA</sup>	4,4 <sup>bB</sup>	8,4 <sup>dB</sup>	20,3 <sup>cA</sup>

Os valores são expressos como médias e os resultados mostram coeficiente de variação menor que 20%. Valores em linhas com a mesma letra maiúscula (análise de composição) e valores em colunas com a mesma letra minúscula (tempo de fermentação) não indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os componentes alimentares considerados essenciais, que devem ser ingeridos regularmente, são Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu e Mn e são fundamentais para o bom funcionamento de numerosos processos bioquímicos que ocorrem no corpo humano (SILVA et al., 2018). Portanto, de acordo com a Tabela 4, os resultados apontam que o farelo de arroz é uma fonte rica destes compostos e com a fermentação estes níveis variam. Assim, o teor de Ca, aumentou em 8% e 18,5% para FI em 8 h de fermentação e FD em 6 h de fermentação, respectivamente. O alto teor de cálcio é desejável para a prevenção de doenças ósseas e para manter o papel biológico da transmissão do nervo. Essencial para ossos e dentes saudáveis, contração muscular, secreção glandular, liberação de insulina e coagulação sanguínea. Fe aumentou em 27% no FI em 6h, Na aumentou 42,5% e 49,3 % para o FI em 6h e FD em 8h de fermentação, respectivamente. S aumentou em 6,4% no FI em 8h e Cu aumentou 6,4% no FI em 6h de fermentação. Mg e P apesar de não sofrerem variações significativas, possuem altos níveis, e os mantém durante a fermentação. O Mg é responsável pela manutenção adequada e o crescimento dos ossos, é cofator de inúmeras enzimas, desempenha um papel vital no bom funcionamento dos nervos e músculos.

O Mn é abundante no FD, mas não apresentou variações durante o tempo de fermentação. Este mineral possui funções no desenvolvimento ósseo, constitui parte de muitas enzimas, é importante para o funcionamento normal do cérebro e atividade adequada do sistema nervoso (CAMPBELL, 2017; ITANKAR; TAUQEER; CHUNOTI, 2016; NOSRATPOUR; JAFARI, 2018).

Silva et al. (2018) verificou que o arroz integral contribuiu significativamente para as doses recomendadas de Mn (61%) e Mg (20%), arroz parboilizado com Cu (45%) e arroz branco com Mn (14%). Conforme Christ-Ribeiro et al. (2017a) os minerais do farelo de arroz, tanto integral quanto o desengordurado, quando sob a ação do microrganismo *R. oryzae*, aumentam seus teores, sendo o tempo de 96 h destacado pelos níveis mais altos. Materiais biológicos ou sintéticos podem ser transformados em produtos de interesse para a fermentação com agentes biológicos. A variação nos teores de minerais entre biomassa não fermentada e fermentada ocorre devido à sua utilização na síntese micelial (OLIVEIRA et al., 2010).

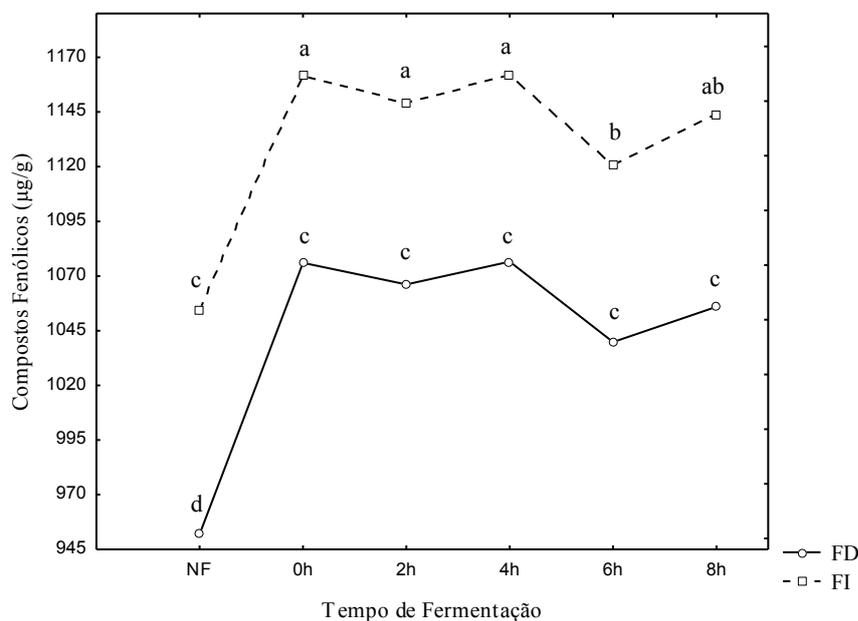
**Tabela 4** - Teor de minerais em farelo de arroz integral (FI), desengordurado (FD) fermentados e não fermentado (NF) durante a fermentação.

Analito ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	NF		0 h		2 h		4 h		6 h		8 h	
	FI	FD										
<b>Ca</b>	559 <sup>bB</sup>	858 <sup>bA</sup>	545 <sup>bB</sup>	746 <sup>dA</sup>	479 <sup>bB</sup>	794 <sup>cA</sup>	553 <sup>bB</sup>	784 <sup>cA</sup>	575 <sup>abB</sup>	1053 <sup>aA</sup>	607 <sup>aB</sup>	991 <sup>aA</sup>
<b>Fe</b>	134 <sup>bB</sup>	309 <sup>bA</sup>	251 <sup>aA</sup>	218 <sup>cA</sup>	161 <sup>bB</sup>	243 <sup>bA</sup>	271 <sup>aB</sup>	398 <sup>aA</sup>	184 <sup>bB</sup>	190 <sup>cA</sup>	189 <sup>bB</sup>	259 <sup>bA</sup>
<b>Mg</b>	14086 <sup>aA</sup>	13261 <sup>aA</sup>	13793 <sup>aA</sup>	12840 <sup>aB</sup>	13407 <sup>aA</sup>	13228 <sup>aA</sup>	13231 <sup>aB</sup>	13450 <sup>aA</sup>	13418 <sup>aA</sup>	13010 <sup>aA</sup>	13543 <sup>aA</sup>	13304 <sup>aA</sup>
<b>Na</b>	80,5 <sup>cB</sup>	116 <sup>cA</sup>	116 <sup>bB</sup>	144 <sup>bA</sup>	136 <sup>aA</sup>	125 <sup>cA</sup>	128 <sup>aA</sup>	131 <sup>bA</sup>	140 <sup>aA</sup>	145 <sup>bA</sup>	135 <sup>aB</sup>	229 <sup>aA</sup>
<b>P</b>	25569 <sup>aA</sup>	23427 <sup>aB</sup>	25607 <sup>aA</sup>	22846 <sup>aB</sup>	24456 <sup>aA</sup>	23661 <sup>aB</sup>	24396 <sup>aA</sup>	23500 <sup>aB</sup>	25443 <sup>aA</sup>	23020 <sup>aB</sup>	24555 <sup>aA</sup>	23966 <sup>aB</sup>
<b>S</b>	1889 <sup>cB</sup>	2142 <sup>bA</sup>	1777 <sup>dB</sup>	2151 <sup>bA</sup>	1893 <sup>cA</sup>	1966 <sup>cA</sup>	1973 <sup>bB</sup>	2227 <sup>aA</sup>	1923 <sup>bB</sup>	2047 <sup>bA</sup>	2018 <sup>aA</sup>	1938 <sup>cB</sup>
<b>Cr</b>	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46	< 0,46
<b>Cu</b>	7,49 <sup>bA</sup>	8,49 <sup>aA</sup>	8,02 <sup>aA</sup>	7,56 <sup>cB</sup>	7,45 <sup>bA</sup>	7,77 <sup>bA</sup>	7,20 <sup>cB</sup>	7,65 <sup>bcA</sup>	8,00 <sup>aA</sup>	7,60 <sup>cB</sup>	7,41 <sup>bB</sup>	7,89 <sup>bA</sup>
<b>Mn</b>	194 <sup>aB</sup>	276 <sup>aA</sup>	191 <sup>aB</sup>	258 <sup>aA</sup>	192 <sup>aB</sup>	260 <sup>aA</sup>	192 <sup>aB</sup>	262 <sup>aA</sup>	191 <sup>aB</sup>	260 <sup>aA</sup>	195 <sup>aB</sup>	264 <sup>aA</sup>
<b>Zn</b>	111 <sup>aA</sup>	117 <sup>bA</sup>	115 <sup>aA</sup>	111 <sup>bA</sup>	84,2 <sup>bB</sup>	106 <sup>bA</sup>	105 <sup>aB</sup>	121 <sup>aA</sup>	84,6 <sup>bB</sup>	136 <sup>aA</sup>	95,3 <sup>abB</sup>	116 <sup>bA</sup>

Resultados expressos como média. Valores em linhas com a mesma letra maiúscula (farelos analisados para cada tempo de fermentação) e valores em linhas com a mesma letra minúscula (tempo de fermentação para cada farelo) não indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Efeito semelhante a este estudo foi observado por Oduguwa, Edema e Ayeni (2008), quando cultivou *Rhizopus oligosporus* e *S. cerevisiae*, usando o substrato de farelo de arroz, cujo o conteúdo de cinzas aumentou 24,5% após 48 h de fermentação. Conforme Chaud e Sgarbieri (2006) a parede celular da *S. cerevisiae* possui 1,4 % de cinzas, 2 % de lipídeos totais e 3,8 % de fibras insolúveis. Além dos minerais, foi avaliada a extração de compostos fenólicos durante as 8h de fermentação e está apresentado na Figura 1.

**Figura 1** – Compostos fenólicos extraídos de FI e FD fermentados por *S. cerevisiae* durante 8h. Dados apresentados como média. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



O FI apresentou maior conteúdo (10%) de compostos fenólicos extraíveis que o FD em todos os tempos de fermentação. Este resultado pode ser explicado pelas maneiras que os compostos fenólicos podem ser formados, sendo a primeira a partir da decomposição das ligações entre a lignina, celulose e hemicelulose ou pela produção de uma parte de óleo de farelo de arroz (POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2010). No caso da fermentação do farelo de arroz, o aumento do teor de ácidos fenólicos é causado, principalmente, pela clivagem de compostos complexados com a lignina (SCHMIDT; FURLONG, 2012). A fermentação do FI de 0 h, 2 h e 4 h obtiveram as maiores concentrações de compostos fenólicos, alcançando valores aproximadamente de 1170  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

De acordo com Schmidt et al., (2014) a aplicação do fungo *R. oryzae* utilizando o farelo de arroz como substrato apresentou efeito sobre o teor de ácido fenólico aumentando

em mais de duas vezes com a fermentação em estado sólido. Christ-Ribeiro et al., (2017) também estudaram o mesmo efeito em farelos fermentados em estado sólido por *R. oryzae*, mas foi observado a extração em maior proporção de compostos fenólicos do farelo de arroz desengordurado fermentado ao atingir 96h (4.500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de farelo). Porém, com a utilização do fungo, o farelo desengordurado obteve níveis lipídicos semelhantes ao do integral.

Os fungos sintetizam lipídios para atender suas funções básicas e formação de membranas celulares, embora algumas espécies possam acumular lipídios gerando biomassa com até 20% deles (CHEIRSILP; KITCHA, 2015; DEY; BANERJEE; MAITI, 2011; LIN et al., 2010; RATLEDGE; WYNN, 2002). O aumento lipídico, nos substratos cultivados, pode ocorrer através de uma via direta de conversão da biomassa lignocelulósica, por um conjunto de enzimas celulolíticas, em açúcares e conseqüentemente lipídios podem ser desenvolvidos (CHEIRSILP; KITCHA, 2015). No estudo de Massarolo et al. (2016) com farelo de arroz integral cultivado com *R. oryzae* ocorreu aumento nos níveis de lipídios extraíveis pela mistura de clorofórmio:metanol, com maior conteúdo (19,0 %) em 60 h de cultivo, que representou um aumento de 17,3% em relação ao conteúdo lipídico do tempo zero.

#### 4. CONCLUSÃO

O processo de fermentação em estado sólido do farelo de arroz integral com levedura *S. cerevisiae* resultou em efeitos favoráveis para a recuperação de minerais, proteínas e fibras, apresentando aumento de 62% para proteínas, 14% para fibras e os minerais de Ca, Fe, Na, S e Cu na biomassa cultivada por 6 h. Este processo é promissor para o tratamento do farelo de arroz no que diz respeito a disponibilização de nutrientes e compostos bioativos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, 14th ed. Washington, 2000.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459–479, 2000.

ARUNA, T. E.; AWORH, O. C.; RAJI, A. O.; OLAGUNJU, A. I. Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743). **Annals of Agricultural Science**, v. 62, p. 33–37, 2017.

BENUCCI, I.; FIORELLI, V.; LOMBARDELLI, C.; LIBURDI, K.; ESTI, M. Kinetic characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, n. 1, p. 268-273, 2017.

CAMPBELL, I. Macronutrients, minerals, vitamins and energy - Review Article. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 18, n. 3, p. 141-146, 2017.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. DAS G. DE A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

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

CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73-80, 2015.

CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C. DA S.; CHIATTONI, L. M.; MASSAROLO, K. C.; DUARTE, F. A.; MELLADO, M. DE LAS S.; SOARES, L. A. DE S. Fermentation process in the availability of nutrients in rice bran. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 45-52, 2017a.

CHRIST-RIBEIRO, A.; BRETANHA, C. C.; LUZ, G. G.; SOUZA, M. M. DE; BADIALE-FURLONG, E. Antifungal compounds extracted from rice bran fermentation applied to bakery product conservation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, p. 263-268, 2017b.

CIENTEC - Fundação de ciência e tecnologia. Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Diário Oficial da União: 1991.

DAS, A.; PAUL, T.; JANA, A.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 217-225, 2013.

DEY, P.; BANERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates – *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5815-5823, 2011.

IRAKLI, M.; KATSANTONIS, D.; KLEISIARIS, F. Evaluation of quality attributes, nutraceutical components and antioxidant potential of wheat bread substituted with rice bran. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 74-80, 2015.

ITANKAR, P.; TAUQEER, M.; CHUNOTI, B. Cultivation, nutritional, antinutritional, and mineral analysis of organic and non-organic *Momordica charantia*: Comparative study. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 10, p. 136–144, 2016.

LIN, H.; CHEN, W.; DING, H. T.; CHEN, X. J.; ZHOU, Q. F.; ZHAO, Y. H. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556-7562, 2010.

MASSAROLO, K. C.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. DE S. Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 54-60, 2017.

MASSAROLO, K. C.; DE SOUZA, T. D.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; DE SOUZA SOARES, L. A. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: Fatty acids and phospholipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 204-208, 2016.

MIR-MARQUÉS, A.; CERVERA, M. L.; GUARDIA, M. DE L. A. Mineral analysis of human diets by spectrometry methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 457–467, 2016.

- NAMBU-NISHIDA, Y.; SAKIHAMA, Y.; ISHII, J.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.125, n. 1, p. 76-86, 2018.
- NASSERI, A.T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Single Cell Protein: Production and Process. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 103-116, 2011.
- NOSRATPOUR M.; JAFARI, S. M. Bioavailability of Minerals (Ca, Mg, Zn, K, Mn, Se) in Food Products. **Reference Module in Food Science**, p. 1-7. ISBN: 978-0-08-100596-5, 2018.
- ODUGUWA, O. O.; EDEMA, M. O.; AYENI, A. O. Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1816-1820, 2008.
- OH, S-J.; CHOI, G-G.; KIM, J.-S. Production of acetic acid-rich bio-oils from the fast pyrolysis of biomass and synthesis of calcium magnesium acetate deicer. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 124, p. 122-129, 2107.
- OLIVEIRA, M. DOS S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIÁLE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass, **CyTA - Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.
- POULEV, A.; CHEN, M. H.; CHERRAVURU, S.; RASKIN, I.; BELANGER, F. C. Variation in levels of the flavone triclin in bran from rice genotypes varying in pericarp color. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 226-232, 2018.
- POURALI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 259-266, 2010.
- RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p.1-52, 2002.

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

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

SILVA, I. J. S. DA; PAIM, A. P. S.; SILVA, M. J. DA. Composition and estimate of daily mineral intake from samples of Brazilian rice. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 131–138, 2018.

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n.2, p. 192-200, 2009.

WANG, W.; JUO, J.; ZHANG, J.; PENG, J.; LIU, T.; XIN, Z. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food Chemistry**, v. 171, p. 40–49, 2015.

**ARTIGO III****DIGESTIBILIDADE *in vitro* E *in vivo* DE FARELOS DE ARROZ FERMENTADOS**



## DIGESTIBILIDADE *in vitro* E *in vivo* DE FARELOS DE ARROZ FERMENTADOS

### RESUMO

O consumidor tem buscado cada vez mais por uma alimentação saudável, visando os benefícios e prevenindo as doenças. Por isso, o farelo de arroz se destaca, já que é considerado um importante recurso nutricional subutilizado que pode ser incorporado às dietas humanas para melhorar a saúde. O objetivo do trabalho foi avaliar a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* dos farelos integrais fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oryzae* utilizando insetos de larvas da mosca-da-fruta (*Ceratitis capitata*). Os farelos de arroz foram submetidos à fermentação em estado sólido utilizando a levedura (3% pp<sup>-1</sup>) e água (30%) por até 6 h a 30 °C e a fermentação do fungo sobre os farelos foi realizado adicionando soluções nutrientes e água (50%) e solução de esporos na concentração inicial foi a de 4 10<sup>6</sup> esporos. g de farelo do microrganismo<sup>-1</sup>. Por meio da análise metabolômica realizada por CG-EM juntamente da correlação de Pearson foi possível evidenciar a eficiência da análise de metabólitos originados da digestibilidade *in vitro* e *in vivo* tais como: glicídios, aminoácidos, ácidos, ácidos graxos e álcoois. Esses resultados contribuem para o conhecimento da absorção e o metabolismo de nutrientes.

Palavras-chaves: *Ceratitis capitata*. Metabolômica. Insetos.



## 1. INTRODUÇÃO

A alimentação e a nutrição estão intimamente associadas e estudos têm sido realizados para elucidar como os nutrientes e os ingredientes funcionais modulam a fisiologia e as respostas metabólicas (NA ZHANG; ZHONGJIE JU; TAO ZUO, 2018). Nos últimos anos nossa sociedade mudou e incorporou alimentos ricos em gordura e açúcar em sua dieta, o que acarreta, quando consumido em excesso, má ingestão alimentar, aumento de peso e gorduras que contribuem para origem de diversas doenças, incluindo as cardíacas e câncer (BEZERRA et al., 2017; FULKERSON, 2018).

Em contrapartida, devido a altos índices de obesidade e doenças associadas, o consumidor tem buscado por uma alimentação mais saudável, visando evitar os danos que ocorrem no corpo ao longo dos anos e os benefícios de uma alimentação balanceada e saudável (SICHIERI et al., 2000). Com isso, o farelo de arroz se destaca, já que é considerado um importante recurso nutricional subutilizado que pode ser incorporado às dietas humanas para melhorar a saúde, particularmente nos países em desenvolvimento. Os nutrientes encontrados no farelo incluem vitaminas B1, B2, B6 e E,  $\gamma$ -oryzanols, fenóis e flavonóides antioxidantes, fibras, minerais, entre outros (MASSAROLO et al., 2017, RIBEIRO et al., 2017).

No entanto, a aplicação de farelo de arroz na indústria alimentícia é limitada pela deterioração enzimática, palatabilidade e digestibilidade. Características essas que podem ser minimizadas por alguns métodos, sendo um deles, a fermentação. O uso do farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido, além de aumentar a disponibilidade de nutrientes, fitoquímicos e outros, contribui para sanar a deficiência nutricional nos países em desenvolvimento (FEDDERN et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2010; SCHMIDT et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017).

Dentre as limitações do farelo, destaca-se a digestibilidade, que pode ser avaliada tanto *in vitro* como *in vivo*. Uma nova abordagem para estudar a digestibilidade *in vivo* é o uso de insetos. Dentre eles, as espécies de *Sitophilus*, principalmente *S. oryzae*, e mosca-da-fruta (*Ceratitis capitata*) se destacam por ser consideradas pragas. O processo de quebra de alimentos, a utilização de nutrientes e o armazenamento de reservas metabólicas são surpreendentemente semelhantes em insetos e vertebrados. O trato digestivo dos insetos pode ser dividido em três grandes regiões com base nas origens embrionárias e funções fisiológicas: anterior, médio e posterior. A maior parte da digestão ocorre no intestino médio, onde uma variedade de enzimas está disponível em abundância. A natureza das enzimas

secretadas e o grau de especialização do trato digestivo estão relacionados ao tipo particular de dieta que um inseto pode assimilar (LOVERA; ELEVINA PÉREZ; LAURENTIN, 2017, TRASSATO et al., 2017).

Para isso, é importante entender, com o auxílio das ciências ômicas, o funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Com a aplicação da metabolômica global realiza-se uma análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo. Os metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica e a resposta medida a nível molecular é obtida a partir de uma visão integrada da bioquímica em organismos complexos. A metabolômica vem sendo aplicada em diferentes áreas do conhecimento, como por exemplo, alimentos e nutrição (CANUTO et al., 2018).

Contudo, o objetivo do trabalho foi avaliar a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* dos farelos integrais fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oryzae*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

O farelo de arroz integral foi obtido em indústria de beneficiamento de arroz localizada ao sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O fungo filamentosso *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foi adquirido do Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello. A levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi adquirida no comércio local e utilizada como fonte das células.

### 2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As culturas de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram mantidas em Ágar Batata-dextrose (BDA) a 4 °C e os esporos incubados durante 7 dias a 30 °C. Para a geração de biomassa foi utilizada a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2010), a qual consiste na adição de uma solução nutriente (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) e suspensão de esporos na concentração inicial de 4x10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup> de farelo. Após, a umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% através da adição de água estéril, e as amostras foram incubadas a 30 °C, sendo retirada a alíquota no tempo de 96 h para posterior utilização.

A fermentação com a levedura foi realizada de acordo com Feddern et al. (2007), onde o farelo de arroz foi distribuído em uma camada de 1 cm em biorreatores de bandeja (29 x 17 x 5,5 cm) e esterilizados. Após foi adicionada a *Saccharomyces cerevisiae* previamente hidratada (3% pp<sup>-1</sup>) e a umidade do meio foi ajustada para 30% com adição de água esterilizada. O processo foi realizado em estufa com circulação de ar a 30 °C. A alíquota de biomassa foi retirada em 6 h de fermentação para posterior utilização.

### 2.3 ELABORAÇÃO DAS DIETAS E DIGESTIBILIDADE *in vivo*

A criação de manutenção de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) foi mantida em sala climatizada a temperatura de 25±2 °C, umidade de 70±10% e fotofase de 12 h conforme metodologia descrita por Gonçalves et al. (2013). Para determinar o potencial de dietas artificiais, foram realizadas modificações na dieta proposta por Nunes et al. (2013) a qual é utilizada atualmente para a produção desta espécie no laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado. A composição das dietas avaliadas encontra-se descritas na Tabela 1. O preparo das dietas foi realizado conforme descrito por Ongaratto (2017).

**Tabela 1** - Composição das dietas artificiais avaliadas para a produção larval de *C. capitata*.

Ingredientes	Tratamentos		
	FRO 96 h	FSC 6 h	FI
Farelo de arroz fermentado por <i>R. oryzae</i> (96h)	60 g	-	-
Farelo de arroz fermentado por <i>S. cerevisiae</i> (6h)	-	60 g	-
Farelo de arroz integral	-	-	60 g
Levedura de cerveja	60 g	60 g	60 g
Açúcar refinado	60 g	60 g	60 g
Benzoato de sódio	1 g	1 g	1 g
Nipagin	9 mL	9 mL	9 mL
Ácido clorídrico (37%)	6 mL	6 mL	6 mL
Ágar	3 g	3 g	3 g
Água destilada	0,8 L	0,8 L	0,8 L

Composição para o preparo de 1 L de dieta. FRO 96 h= Farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* (96 h), FSC 6 h= Farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* (6 h), FI= Farelo de arroz integral.

Após a preparação das dietas, as mesmas foram distribuídas em recipientes plásticos (300 mL) com tampas cobertas por tecido voil para permitir aeração. Para cada tratamento foram preparadas cinco repetições, cada uma contendo 100 mL de dieta. Após 24h da preparação das dietas, as mesmas foram inoculadas com 0,3 mL da solução de ovos de *C. capitata* ( $\pm 6.900$  ovos) e mantidas em sala climatizada com temperatura a  $25\pm 2$  °C, umidade de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 h. Com o início da formação dos pupários (aproximadamente nove dias após a inoculação), as larvas foram retiradas das dietas por meio de lavagem em água corrente. Uma alíquota das larvas foi armazenada em frascos plásticos (80 mL) e congelada para avaliação metabólica.

#### 2.4 DIGESTIBILIDADE *in vitro*

O modelo de digestão *in vitro* foi utilizado para determinar a bioacessibilidade de compostos fornecidos pelos farelos de arroz fermentados. Para isso, foi utilizado o modelo de digestão *in vitro* desenvolvido pela RIVM (Bilthoven, Holanda) de acordo com Kabak e Ozbey (2012). O modelo de digestão consiste no processamento inicial da saliva por 5 min a 37 °C para simular o compartimento bucal e as condições gástricas por 2 h, seguido pelo compartimento simulado do intestino delgado por 2 h a 37 °C. Uma vez que a digestão dos alimentos *in vivo* e a absorção dos compostos ocorre, principalmente no intestino delgado, o trato intestinal grosso não foi levado em consideração (VERSANTVOORT et al., 2005).

No modelo de digestão, foram utilizados 4,5 g de farelos de arroz fermentado e farelo integral para simular as condições de alimentação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Foi utilizado o farelo de arroz integral no experimento como controle. A composição dos sucos digestivos é mostrada na Tabela 2. A digestão foi iniciada adicionando 6 mL de saliva aos tubos de digestão contendo 4,5 g de material alimentar e incubando por 5 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 12 mL de suco gástrico e a mistura foi agitada (60 rpm) durante 2 h.

O pH gástrico estava entre 2,5 e 3. Finalmente, 12 mL de suco duodenal, 6 mL de bile e 2 mL de solução de  $\text{NaHCO}_3$  (1 M) foram adicionados simultaneamente e a mistura foi agitada (60 rpm) por mais 2 h. O pH do quimo (sobrenadante) estava na faixa de 6,5 e 7. No final do processo de digestão *in vitro*, os tubos de digestão foram centrifugados por 5 min a 2750 g, produzindo o sobrenadante no qual foi liofilizado e submetido à análise metabólica.

**Tabela 2** - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão *in vitro*.

	Saliva	Suco gástrico	Suco duodenal	Suco biliar
Solução inorgânica	10 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	15,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	30 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL KSCN 20 g.L <sup>-1</sup>	3 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	68,3 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	9,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g.L <sup>-1</sup>	4,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaSO <sub>4</sub> 57 g.L <sup>-1</sup> 1,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup> 1	18 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup> 10 mL NH <sub>4</sub> Cl 30,6 g.L <sup>-1</sup>	6,3 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup> 10 mL MgCl <sub>2</sub> 5g.L <sup>-1</sup>	150 µL HCl 37% g/g
	20 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	6 mL HCl 37% g/g	180 µL HCl 37%g/g	
Solução orgânica	8 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL glicose 65g.L <sup>-1</sup> 10 mL ácido glucurônico 2 g.L <sup>-1</sup> 3,4mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup> 10 mL glicosamina hidrocloreto 33 g.L <sup>-1</sup>	4 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>
Adicionar à mistura orgânica + inorgânica	290 mg α-amilase 15 mg ácido úrico 25 mg mucina	1 g BSA 2,5 g pepsina 3 g mucina	9 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup> 1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipase	10 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup> 1,8 g BSA 30 g bile
pH	6,8±0,2	1,3±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 250 mL com água destilada. Após misturar a solução orgânica e inorgânica, alguns constituintes foram adicionados e dissolvidos. Quando necessário, o pH foi ajustado para o intervalo apropriado. Fonte: Adaptado de VERSANTVOORT et al. (2005).

## 2.5 METABOLÔMICA

A análise de perfil metabólico nos testes *in vitro* e *in vivo* ocorreu segundo Lisec et al. (2006). Para extração, pesou-se 30 mg de amostras liofilizadas em tubos de 2 mL e adicionou-se 1.400  $\mu\text{L}$  de metanol grau CLAE pré-resfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  de Ribitol ( $0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ -ultrapura), 10  $\mu\text{L}$  de Antrona ( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em clorofórmio grau HPLC) e aplicou-se agitação por vórtice durante 10 seg. Agitou-se em termomisturador por 10 min a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 900 rpm. As amostras foram centrifugadas por 10 min a  $11.000\text{ x g}$  e o sobrenadante foi coletado em tubos de 15 mL e adicionado de 1.500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura refrigerada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 750  $\mu\text{L}$  de clorofórmio grau CLAE pré-resfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e vórtice durante 10 seg. Centrifugou-se por 15 min a  $22.000\text{ x g}$ , transferiu-se 150  $\mu\text{L}$  da fração superior (metanol e água – fração polar A) para tubos de 1,5 mL e 650  $\mu\text{L}$  da fração inferior (clorofórmio – Fração polar B) para frascos de 1,5 mL.

No processo de derivatização, a fração A (150  $\mu\text{L}$ ) foi concentrada por arraste aplicando-se nitrogênio gasoso. Adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de reagente de metoxiaminação (cloridrato de metoxiamina a  $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em piridina) e agitou-se por 2 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  em termomisturador. Após, adicionou-se 70  $\mu\text{L}$  de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitou-se durante 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A reação foi transferida para frascos com inserts de 250  $\mu\text{L}$  e injetadas imediatamente no CG-EM.

Para análise de ambas as frações (A e B), utilizou-se equipamento Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas foram realizados segundo Lisec et al. (2006). Injetou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra com temperatura do injetor a  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com razão de split para injeção de 1:50 para a fração A e aplicação no modo splitless para a fração B. Utilizou-se hélio como gás carreador com fluxo de  $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30m x  $0,25\text{ mm}$  x  $0,25\mu\text{m}$ ), com programação isotérmica por 2 min à  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , rampa de temperatura de  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  por min até  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$  ao qual permaneceu por 6 min. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , faixa de massa de 70-600 m/z e 0,2 varreduras por segundo. O tempo de corte do solvente foi definido a partir de cada fração injetada. Para determinação do índice de tempo de retenção utilizou-se ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME C8-24), calculado automaticamente pelo software do equipamento.

## 2.6 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A composição proximal do inseto *C. capitata* foi determinada de acordo com os métodos AOAC (2000) para umidade (n° 935.29), proteína (n° 920.87; fator de conversão de 5.75), lipídeos (n° 920.85) e cinzas (n° 923.03). O conteúdo de fibra foi determinado por gravimetria através dos resíduos básicos e ácidos utilizados na digestão das amostras (CIENETEC, 1991). Carboidratos foram estimados por diferença.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados como média (teste de Tukey) e o teste de Análise de Variância unidirecional (ANOVA) foram utilizados para determinar diferenças significativas entre as variáveis. Diferenças com valor de  $p < 0,5$  foram consideradas significativas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão os resultados da composição proximal dos farelos estudados e da análise por metabolômica realizada para o sobrenadante da digestibilidade *in vitro* dos farelos (fração digerível).

Os glicídios (Tabela 3) foram os compostos que tiveram maior absorção pela digestibilidade *in vitro* e *in vivo*, destacando o do FSC 6 h e FRO 96h, respectivamente. As fermentações (FSC 6 h e FRO 96 h) apresentaram maior disponibilidade de glicídios quando comparados ao FI, o que sugere que os microrganismos utilizados durante a fermentação quebraram compostos para sua manutenção, como lignina, celulose e algumas hemiceluloses presentes no farelo de arroz, tornando-os mais digeríveis (RIBEIRO et al., 2017).

O maior teor de aminoácidos foi da digestibilidade *in vivo*, demonstrando assim que quanto maior a oferta de proteína em uma dieta, maior será a absorção da mesma. Entre os nutrientes naturalmente usados pelos insetos de *Ceratitis capitata*, as proteínas possuem um papel importante nos processos metabólicos, influenciando o crescimento e fecundidade, sendo ele um dos mais metabolizados (PLÁCIDO-SILVA; ZUCOLOTO; JOACHIM-BRAVO, 2005).

**Tabela 3** – Área ( $10^6$ ) dos metabólitos das digestibilidades.

		$\Sigma$	$\Sigma$ Ácidos	$\Sigma$	$\Sigma$ Ácidos	$\Sigma$
		Glicídios	graxos	Aminoácidos	orgânicos	Álcoois
Digestibilidade <i>in vitro</i>	FI	245,63 <sup>aB</sup>	0,16 <sup>cD</sup>	14,23 <sup>bE</sup>	15,87 <sup>bC</sup>	15,99 <sup>bE</sup>
	FRO 96 h	375,87 <sup>aC</sup>	1,17 <sup>cC</sup>	24,53 <sup>bD</sup>	24,06 <sup>bB</sup>	19,49 <sup>bE</sup>
	FSC 6 h	439,14 <sup>aA</sup>	0,20 <sup>dD</sup>	24,15 <sup>cD</sup>	20,01 <sup>cB</sup>	35,77 <sup>bC</sup>
Digestibilidade <i>in vivo</i>	FI	42,84 <sup>aF</sup>	2,82 <sup>eB</sup>	35,30 <sup>bC</sup>	17,49 <sup>dC</sup>	28,20 <sup>cD</sup>
	FRO 96 h	139,57 <sup>aD</sup>	5,23 <sup>dA</sup>	54,66 <sup>bA</sup>	29,96 <sup>cA</sup>	53,70 <sup>bA</sup>
	FSC 6 h	91,72 <sup>aE</sup>	5,73 <sup>dA</sup>	47,56 <sup>bB</sup>	30,25 <sup>cA</sup>	45,18 <sup>bB</sup>

FRO 96 h= Farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* (96 h), FSC 6 h= Farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* (6h), FI= Farelo de arroz integral. Letras minúsculas iguais na coluna (metabólitos) e letras maiúsculas iguais na mesma linha (dietas) indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os álcoois obtiveram maior disponibilidade na amostra de FSC 6 h no teste *in vitro*, este resultado era esperado já que a levedura *S. cerevisiae* se caracteriza por produzir estes compostos (MUTHINENI et al., 2016). Quanto aos ácidos orgânicos, a digestibilidade *in vivo* nutridas com os farelos fermentados apresentaram os maiores rendimentos. Os ácidos graxos apresentaram os menores rendimentos. Através de transformações decorrentes da atividade metabólica de microrganismos resultam em compostos de interesse como ácidos orgânicos, ácidos graxos poli-insaturados e outros (OLIVEIRA et al., 2010).

O farelo integral, independente da aplicação *in vitro* ou *in vivo*, apresentou as menores respostas para a digestibilidade. Este comportamento pode ser explicado pelo fato deste inseto utilizar essas fontes para o desenvolvimento e manutenção dos próprios processos fisiológicos (HANDKE et al., 2013). A digestibilidade *in vivo* apresentaram os melhores rendimentos, destacando a dieta elaborada com FRO 96 h. Na Tabela 2 estão apresentadas as correlações entre os modelos de digestibilidade *in vitro* e *in vivo*.

**Tabela 4** – Correlação de Pearson dos nutrientes identificados pela análise metabolômica.

	Glicídios <i>in vitro</i>	Glicídios <i>in vivo</i>	Aminoáci- dos <i>in vitro</i>	Aminoáci- dos <i>in vivo</i>	Ácidos <i>in vitro</i>	Ácidos <i>in vivo</i>	Ác. graxos <i>in vitro</i>	Ác. graxos <i>in vivo</i>	Álcoois <i>in vitro</i>	Álcoois <i>in vivo</i>
Glicídios <i>in vitro</i>		0,10	0,01	0,30	0,36	0,31	0,76	0,57	0,62	0,10
Glicídios <i>in vivo</i>	-0,95		0,20	0,10	0,10	0,10	0,95	0,39	0,44	0,35
Aminoácidos <i>in vitro</i>	-0,99	0,95		0,31	0,37	0,32	0,75	0,59	0,64	0,10
Aminoácidos <i>in vivo</i>	0,89	-0,98	-0,87		0,06	0,01	0,93	0,27	0,32	0,46
Ácidos <i>in vitro</i>	-0,84	0,96	0,83	-0,99		0,04	0,87	0,21	0,26	0,52
Ácidos <i>in vivo</i>	0,88	-0,97	-0,86	0,99	-0,99		0,91	0,26	0,31	0,47
Ác. graxos <i>in vitro</i>	0,35	-0,07	-0,37	-0,10	0,20	-0,13		0,65	0,60	0,60
Ác. graxos <i>in vivo</i>	0,61	-0,81	-0,59	0,90	-0,94	0,91	-0,51		0,04	0,74
Álcoois <i>in vitro</i>	0,55	-0,77	-0,53	0,87	-0,91	0,88	-0,58	0,99		0,79
Álcoois <i>in vivo</i>	0,96	-0,85	-0,97	0,74	-0,67	0,73	0,58	0,39	0,32	

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1 onde o valor 0 (zero) significa que não há relação linear e o valor 1 indica uma relação linear perfeita. O valor -1 também indica uma relação linear perfeita, porém inversa. Esta análise é aplicada para explicar a variabilidade dos resultados, além de mostrar a correlação entre as diferentes variáveis (VIRGILLITO, 2007).

Os compostos que possuem correlação positiva entre si, considerando  $p < 0,1$ , são os glicídios da digestibilidade *in vivo* e ácidos *in vitro* ( $R=0,96$ ), os aminoácidos *in vitro* e ácidos *in vitro* ( $R=0,83$ ), aminoácidos e ácidos *in vivo* ( $R=0,99$ ), ácidos graxos *in vivo* e álcoois *in vitro* ( $R=0,99$ ), glicídios *in vitro* e álcoois *in vivo* ( $R=0,96$ ), os ácidos *in vivo* e álcoois *in vitro* ( $R=0,88$ ). As correlações negativas ( $p < 0,1$ ) apresentaram entre os glicídios ( $R=-0,95$ ), glicídios e aminoácidos *in vitro* ( $R=-0,99$ ), glicídios e aminoácidos *in vivo* ( $R=-0,98$ ), aminoácidos *in vivo* e ácidos *in vitro* ( $R=-0,99$ ), entre os ácidos ( $R=-0,99$ ), álcoois *in vivo* e aminoácidos *in vitro* ( $R=-0,97$ ).

De acordo com a Tabela 2, a correlação de Pearson demonstrou que o modelo de digestibilidade *in vivo* pode ser usado para avaliar a digestibilidade de nutrientes visto que demonstra resultados similares ao *in vitro*. As digestibilidades *in vivo* são modelos adequados para analisar compostos como aminoácidos, ácidos graxos e orgânicos, já que os mesmos possuem absorção semelhante devido seu metabolismo (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Estes resultados estão de acordo com Carmona e Gómez-Sotillo (1997), cujos autores alimentaram gorgulhos de arroz durante 15 dias com dietas à base de amido de milho suplementadas com caseína, gelatina nutriente, glúten de milho e gelatina purificada em 0, 25, 0,5, 1, 2 e 4%. O consumo de caseína causou um aumento no peso dos gorgulhos e as respostas dos gorgulhos ao consumo de diferentes proteínas foram semelhantes àquelas observadas em outros animais da escala zoológica (ratos, aves, etc.), o que possibilita considerar o uso desses insetos para avaliar a qualidade proteica de uma dieta. Na Tabela 4 está demonstrado a absorção dos nutrientes pela análise da composição proximal de larvas de *C. capitata*.

Segundo a Tabela 4 as larvas de *C. capitata* apresentaram a maior absorção dos nutrientes de proteínas, destacando o FRO 96 h seguido do FSC 6 h, pois disponibiliza mais desses compostos devido o processo de fermentação sofrido pelo farelo (RIBEIRO et al., 2017). Os teores de cinzas e fibras foram semelhantes e não apresentaram diferença significativa na absorção entre as dietas. Os carboidratos apresentaram a mesma tendência das

**Tabela 5** – Composição proximal (%) de larvas de *C. capitata* nutridos com as diferentes dietas.

	<b>Lipídios</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Fibras</b>	<b>Carboidratos</b>
FI	30,15 <sup>a</sup>	43,5 <sup>c</sup>	11,84 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>	11,01 <sup>c</sup>
FRO 96 h	24,5 <sup>c</sup>	47,23 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	14,27 <sup>a</sup>
FSC 6 h	27,28 <sup>b</sup>	45,54 <sup>b</sup>	10,84 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>	12,94 <sup>b</sup>

FRO 96 h= Farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* (96 h), FSC 6 h= Farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* (6 h), FI= Farelo de arroz integral. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey.

proteínas. A dieta elaborada com FI apresentou maior conteúdo de lipídios no inseto, o que pode ser explicado por este composto ter sido sintetizado pela larva e constituir o exoesqueleto (GONÇALVES et al., 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

Por meio da análise metabolômica realizada por CG-EM juntamente da análise de componentes principais foi possível evidenciar a eficiência da análise de compostos entre os testes *in vitro* e *in vivo* estudados. Esses resultados contribuem para o conhecimento da absorção e o metabolismo de nutrientes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis of AOAC International, 14th ed. Washington, 2000.

BENUCCI, I.; FIORELLI, V.; LOMBARDELLI, C.; LIBURDI, K.; ESTI, M. Kinetic characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, n. 1, p. 268-273, 2017.

BEZERRA, I. N.; MOREIRA, T. M. V.; CAVALCANTE, J. B.; SOUZA, A DE M.; SICHIERI, R. Consumo de alimentos fora do lar no Brasil segundo locais de aquisição. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 15, 1-8, 2017.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. DA; CRUZA, P. L. R. DA; SOUZA, A. R. L. DE; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica:

definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARMONA, A.; GÓMEZ-SOTILLO, A. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. **Anales Venezolanos de Nutrición**, v. 10, p. 20–26, 1997.

CIENTEC - Fundação de ciência e tecnologia. **Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Diário Oficial da União: 1991.

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

FULKERSON, J. A. Fast food in the diet: Implications and solutions for families. **Physiology & Behavior**. *In press*, 2018.

GONÇALVES R.S.; NAVA D.E.; PEREIRA H.C.; LISBÔA H.; GRÜTZMACHER A.D.; VALGAS R.A. Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 791–798, 2013.

HANDKE, B.; POERNBACHER, I.; GOETZE, S.; AHRENS, C. H.; OMASITS, U.; MARTY, F.; SIMIGDALA, N.; MEYER, I.; WOLLSCHIED, B.; BRUNNER, E.; HAFEN, E.; LEHNER, C. F. The Hemolymph Proteome of Fed and Starved *Drosophila* Larvae. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013.

HILL, R.W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

KABAK, B.; OZBEY, F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an *in vitro* digestion model. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 338-344, 2012.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-396, 2006.

LOVERA, M.; ELEVINA PÉREZ, E.; LAURENTIN, A. Digestibility of starches isolated from stem and root tubers of arracacha, cassava, cush-cush yam, potato and taro. **Carbohydrate Polymers**, 176, 50-55, 2017.

MASSAROLO, K. C.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. de S. Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 54-60, 2017.

MUTHINENI, N.; ARNIPALLY, M. S.; BOJJA, S.; MESHARAM, H. M.; SRIVASTAVA, A. K.; ADARI, B. R. A Green approach towards the synthesis of chiral alcohols using

functionalized alginate immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, Part A, p. 233-237, 2016.

NAZHANG, M.D.; ZHONGJIE JU, B.D.; TAO ZUO, Ph. D. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. **Nutrition**, v. 51–52, p. 80-85, 2018.

NUNES, A. M.; COSTA, K. Z.; FAGGIONI, K. M.; COSTA, M. DE L. Z.; GONÇALVES, R. DA S.; WALDER, J. M. M.; GARCIA, M. S.; NAVA, D. E. Artificial diets for the rearing of adult and larvae of South-American fruit fly. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1309–1314, 2013.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, v. 8, n. 3, p. 7-11, 2010.

ONGARATTO, S. Avaliação de fontes proteicas no desenvolvimento de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) e na qualidade de *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação de mestrado em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, 2017.

PLÁCIDO-SILVA, M. do C.; ZUCOLOTO, F. S.; JOACHIM-BRAVO, I. S. Influence of Protein on Feeding Behavior of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae): Comparison between Immature Males and Females. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 539-545, 2005.

RIBEIRO, A. C.; GRAÇA, C. DA S.; CHIATTONI, L. M.; MASSAROLO, K. C.; DUARTE, F. A.; MELLADO, M. de las S.; SOARES, L. A. de S. Fermentation process in the availability of nutrients in rice bran. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 45-52, 2017.

SICHERI R.; COITINHO, D. C.; MONTEIRO, J. B., COUTINHO, W. F. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 227-232, 2000.

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

TRASSATO, L. B.; NETO, J. L. L. M.; LIMA, A. C. S.; SILVA, E. S. DA; RONCHI-TELES, B.; CARMO, I. L. G. DA S. Primeira ocorrência de *Ceratitis capitata* (Wied.) no Estado de Roraima, Brasil. **Revista Agro@ambiente**, v. 11, n. 1, p. 88-91, 2017.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. A. J. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 31-40, 2005.

VIRGILLITO, S. B. **Estatística Aplicada** - 3ª Ed. Editora Edicon. 2007.

**ARTIGO 4**  
**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E**  
**MICROBIOLÓGICA DE BISCOITOS TIPO COOKIE COM FARELO DE ARROZ**  
**FERMENTADO**



# ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DE BISCOITOS TIPO COOKIE COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

## RESUMO

A fermentação em estado sólido tem sido aplicada em resíduos agroindustriais como forma de disponibilizar maior conteúdo de nutrientes e bioativos. O objetivo do trabalho foi formular biscoitos tipo cookie, sem glúten, através da substituição da farinha de trigo por farinha de arroz e farelo de arroz fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oryzae*, bem como caracterizá-los quanto as suas propriedades físico-químicas e sensoriais. Inicialmente as formulações foram elaboradas com diferentes níveis de farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* (25%, 50% e 75%) e farelo de arroz integral, além de farinha de arroz e outros ingredientes. Após a caracterização sensorial dos biscoitos tipo cookie com farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae*, escolheu-se a formulação mais aceita pelo público consumidor como base para a elaboração de biscoitos com farelo de arroz fermentado por *R. oryzae*. Esses também foram avaliados quanto às características físico-químicas e sensoriais. Ambos os biscoitos foram estudados quanto a sua vida útil nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias. Os cookies elaborados com 25% de farelo de arroz fermentado apresentaram os melhores resultados. Destacando o cookie elaborado com farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* que obteve melhor avaliação global e aceitabilidade na análise sensorial, maior disponibilidade de nutrientes e atividade antioxidante, apresentando vida útil de 90 dias.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*. *Rhizopus oryzae*. Antioxidantes. Suplementação.



## 1. INTRODUÇÃO

A farinha de trigo é amplamente utilizada na produção de produtos panificados e conferindo capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade às massas devido às proteínas gliadina e glutelina, que compõem o glúten (VIEIRA et al., 2015). Este, por sua vez, pode causar uma enteropatia crônica autoimune caracterizada, principalmente, pela inflamação do intestino delgado, promovendo a intolerância ou alergia à ingestão de alimentos que o contenham. Portanto, a substituição parcial ou total do trigo em produtos de panificação tem sido estudada, não somente com o objetivo de melhorar qualidades nutricionais ou para atender os celíacos, mas também na busca por produtos mais saudáveis, que contenham maior teor de fibras e compostos bioativos em sua matriz (FEDDERN et al., 2011, MARIANI et al., 2015).

O farelo de arroz é um potencial substituto para a farinha de trigo, devido a sua composição diferenciada de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras insolúveis, vitaminas e sais minerais. Além disso, possui boa fonte de compostos antioxidantes, como polifenóis, tocoferóis, tocotrienóis e gama-orizanol, os quais auxiliam na prevenção da reação de oxidação de células, que acarretam danos aos tecidos e ao DNA. Apresentam propriedades redutoras de colesterol, benefícios cardiovasculares e atividade antitumoral. Deste modo, dado o baixo valor comercial que o caracteriza como um coproduto, várias pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de avaliar seu potencial para alimentação humana (CHRIST-RIBEIRO et al., 2017; MASSAROLO et al., 2017).

A fermentação em estado sólido é uma alternativa para aumentar teores de proteínas, fitoquímicos, fibras, melhorar a palatabilidade e digestibilidade do farelo de arroz e para minimizar problemas decorrentes da sua composição (CHRIST-RIBEIRO et al., 2017; FEDDERN et al., 2011; UTAMA-ANG, et al., 2017). A fermentação de cereais por leveduras e bolores, além de melhorar a textura e aumentar o prazo de validade, pode afetar positivamente a qualidade nutricional dos alimentos, retardando a digestibilidade do amido e diminuindo a resposta glicêmica, torna o complexo de fibra alimentar e fitoquímicos mais bioacessível e aumenta a absorção de minerais (VALLI et al., 2016).

Os biscoitos tipo cookie estão entre os produtos de panificação considerados desejáveis para todas as faixas etárias, devido à sua conveniência, vida útil longa e características sensoriais. A produção de biscoitos sem glúten de alta qualidade requer a formação de massa coesa a partir de componentes com propriedades funcionais semelhantes

às farinha de trigo (JAN; SAXENA; SINGH, 2016). Tentativas estão sendo realizadas para melhorar o valor nutritivo dos cookies com o intuito de modificar sua composição. A maioria dos produtos de panificação comercial é rico em carboidratos e gorduras, pobres em fibras e altamente calóricos, tornando os cookies um alimento de baixa densidade nutricional (ABDEL-MOEMIN, 2015).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi elaborar biscoitos tipo cookie, sem glúten, através da substituição da farinha de trigo por farinha de arroz e farelo de arroz fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oryzae*, bem como caracterizá-los quanto às suas propriedades físico-químicas, antioxidantes, sensoriais e microbiológicas (vida útil).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

O farelo de arroz integral foi fornecido por uma indústria de beneficiamento no Rio Grande do Sul, Brasil. O fungo filamentosso *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foi adquirido do Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello. A levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi adquirida no comércio local e utilizada como fonte das células.

### **2.2 PESQUISA DE MERCADO**

Para elaborar um produto panificado com fins especiais é importante verificar sua preferência a partir de um público alvo. Deste modo, foi realizado um questionário (Figura 1), o qual foi aplicado na 37ª Feira do Livro de Alegrete – Rio Grande do Sul no ano de 2016, em que 63 pessoas foram entrevistadas, aleatoriamente, nos turnos diurno e noturno. A realização da pesquisa de mercado e da análise sensorial ocorreu após parecer consubstanciado pelo Comitê de Ética e Pesquisa – Plataforma Brasil (protocolo nº 1.583.058).

**Figura 1** - Questionário formulado para avaliar o perfil do público consumidor de panificáveis na cidade de Alegrete, RS.

Nome: _____		Sexo: ( ) M ( ) F	
Faixa etária:			
( ) Menor de 16 anos	( ) 16 a 25 anos	( ) 26 a 35 anos	( ) 36 a 45 anos ( ) Maior de 45 anos
<b>I. Qual o produto de panificação/confeitaria você mais consome?</b>			
( ) cookies/biscoitos	( ) brownie/bolo	( ) massa pré-pronta para crepe/panqueca	( ) barra de cereal ( ) mistura para bolo ( ) mistura para pão
<b>II. Com que frequência você consome?</b>			
( ) diariamente	( ) 3 vezes ou mais por semana	( ) quinzenalmente	( ) mensalmente

### 2.3 FERMENTAÇÕES DO FARELO DE ARROZ

A fermentação em estado sólido foi realizada de acordo com FEDDERN; FURLONG; SOARES (2007), onde os farelos de arroz (integral e desengordurado) foram distribuídos em uma camada de 1 cm em biorreatores de bandeja (29 x 17 x 5,5 cm) e esterilizados. Após foi adicionada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* previamente hidratada (3% pp<sup>-1</sup>) e a umidade do meio foi ajustada para 30% com adição de água esterilizada. O processo foi realizado em estufa com circulação de ar a 30 °C por 8 h. A alíquota de biomassa foi retirada em 6 h de fermentação para posterior utilização.

A fermentação, com o fungo *Rhizopus oryzae* CCT 7560 ocorreu com utilização de culturas mantidas em Ágar Batata-dextrose (BDA) à 4 °C e incubação dos esporos por 7 dias à 30 °C. Para a geração de biomassa, utilizou-se a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2010), que consiste na adição de uma solução nutriente (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) e suspensão de esporos na concentração inicial de 4x10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup> de farelo. Após, a umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% através da adição de água estéril, e as amostras foram incubadas à 30 °C, com retirada de alíquota no após 96 h para posterior utilização.

## 2.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BISCOITOS TIPO COOKIE COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

A formulação e o método para obtenção do cookie controle foram adaptados em Moretto e Fett (1999). Inicialmente, fez-se um teste com a formulação controle (sem farelo de arroz fermentado – F0), após obtenção do produto iniciou-se o desenvolvimento das formulações experimentais – com farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* em diferentes concentrações, caracterizando as formulações F1, F2 e F3 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Formulações dos cookies padrão (F0) e com farelo fermentado (F1, F2, F3).

<b>Ingredientes (g)</b>	<b>F0</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
Farinha de arroz	100	100	100	100
Farelo de arroz integral	100	75	50	-
Farelo de arroz fermentado por <i>S. cerevisiae</i>	-	25	50	100
Margarina	43	43	43	43
Mel	25	25	25	25
Açúcar mascavo	50	50	50	50
Mix de cereais (sem glúten)	30	30	30	30
Canela em pó	2	2	2	2
Cacau em pó	3	3	3	3

F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*).

Para a elaboração dos cookies, primeiramente pesou-se todos os ingredientes (Tabela 1). Em seguida, os ingredientes secos (farinha de arroz, farelo de arroz integral, farelo de arroz fermentado, açúcar mascavo, canela em pó, cacau em pó e fermento em pó), foram misturados. Após, acrescentou-se o restante dos ingredientes, sendo misturados novamente, até a obtenção de uma massa lisa e homogênea. Foram obtidas massas no formato de esferas com diâmetro de aproximadamente 5 cm as quais foram dispostas em formas forradas com papel manteiga. Os cookies foram submetidos à uma temperatura em forno industrial de 150 °C por 18 min, retirados e resfriados a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Por fim, foram armazenados em embalagens plásticas para posterior análise. A partir das

formulações testadas, o melhor resultado obtido foi dos cookies elaborados com o farelo de arroz fermentado por *R. oryzae*.

#### 2.4.1 Análise sensorial dos cookies com farelo de arroz fermentado

A análise sensorial foi realizada por 2 testes afetivos em relação aos cookies elaborados com farelo de arroz fermentado: Teste de aceitação e Teste de intenção de consumo (Figura 2). No teste de aceitação foi utilizada uma escala estruturada de 7 pontos (7 – gostei muitíssimo, 6 – gostei muito, 5 – gostei, 4 - não gostei/nem desgostei, 3 - desgostei, 2 - desgostei muito, 1 - desgostei muitíssimo), para avaliar os atributos cor, crocância, doçura e avaliação global do produto (DUTCOSKY, 2013).

**Figura 2** - Ficha utilizada para os testes de aceitação de intenção de consumo dos cookies.

Nome: _____		Data: ____/____/____		
Faixa etária: ( ) Menor de 16 anos ( ) 16 a 25 anos ( ) 26 a 35 anos ( ) 36 a 45 anos ( ) Maior de 45 anos				
<p>Você está recebendo 4 amostras de cookies. Prove-as DA ESQUERDA para a DIREITA e avalie-as INDIVIDUALMENTE e, baseando-se na escala ao lado, expresse o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra de acordo com os atributos solicitados: COR, CROCANCIA, DOÇURA e AVALIAÇÃO GLOBAL.</p>		<p>7 – Gostei muitíssimo 6 – Gostei muito 5 – Gostei 4 – Não gostei / Nem desgostei 3 – Desgostei 2 – Desgostei muito 1 – Desgostei muitíssimo</p>		
Amostra	Cor	Crocância	Doçura	Avaliação global do produto**
101				
292				
341				
487				
<b>**Avaliação global refere-se ao quanto você gostou ou desgostou do produto como um todo.</b>				
<p>Agora, avalie cada uma de acordo com a sua intenção de consumo e, utilizando a escala ao lado, expresse a frequência com a qual você consumiria cada uma das amostras</p>		<p>7 – Comería sempre 6 – Comería muito frequentemente 5 – Comería frequentemente 4 – Comería ocasionalmente 3 – Comería raramente 2 – Comería muito raramente 1 – Nunca comería</p>		
Valor atribuído à amostra 101: _____				
Valor atribuído à amostra 292: _____				
Valor atribuído à amostra 341: _____				
Valor atribuído à amostra 487: _____				

No Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha – campus Alegrete, as amostras foram servidas simultaneamente e avaliadas por 101 provadores não treinados. Na mesma ocasião, os provadores foram orientados a indicar na ficha de avaliação a intenção de consumo através de uma escala estruturada de 7 pontos (7- comería sempre, 6 - comería muito frequentemente, 5 - comería frequentemente, 4 - comería ocasionalmente, 3 - comería raramente, 2 - comería muito raramente, 1 - nunca comería). As amostras foram servidas em escala monádica

sequencial, por sorteio, e em pratos plásticos brancos, codificados com números de três dígitos ao acaso, acompanhadas de um copo de água, ficha para avaliação e caneta. Foi utilizada luz branca para iluminação das cabines.

#### **2.4.2 Composição proximal dos cookies com farelo de arroz fermentado**

As composições proximais foram determinadas de acordo com os métodos AOAC (2000) para umidade (n° 935.29), proteína (n° 920.87; fator de conversão de 5.75), lipídeos (n° 920.85) e cinzas (n° 923.03). O conteúdo de fibra foi determinado por gravimetria através dos resíduos básicos e ácidos utilizados na digestão das amostras (CIENITEC, 1991) e os carboidratos foram estimados por diferença.

#### **2.4.3 Extração, quantificação e perfil dos compostos fenólicos extraídos dos cookies com farelo de arroz fermentado**

Os compostos fenólicos foram extraídos a frio com metanol como solvente extrator, na proporção de 1:8 (p / v). A mistura foi submetida a agitação orbital, 160 rpm à temperatura ambiente por 2 h. Após repouso por 15 min, adicionou-se novamente 10 mL de solvente, seguido de agitação durante 1 h. Os extratos colocados em rota-evaporador para a evaporação do metanol com posterior ressuspensão em água destilada. O extrato resultante foi clarificado, centrifugado e filtrado para obtenção de compostos fenólicos. O conteúdo total de compostos fenólicos foi quantificado em espectrofotômetro a 750 nm com reagente de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como padrão (2 a 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (SOUZA et al., 2009).

Para análise do perfil de compostos fenólicos, os extratos foram ressuspensos em água e metanol (1:1) e injetados em cromatógrafo CLAE-UV com volume de injeção de 20 mL a uma vazão de 0,7 mL / min a 35 °C. A separação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma coluna C18 (4,6 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Discovery™, USA) e um solvente constituído por metanol e água acidificada (1% v/v ácido acético) a uma razão de 20:80, durante 25 min, com detecção de UV a 280 nm até 15 min e 320 nm até 25 min. Os ácidos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com diferentes padrões de fenóis presentes nos diferentes cookies elaborados com farelo de arroz (caféico, clorogênico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecóico, siríngico e vanilina, obtidos da Sigma-Aldrich, EUA), conforme descrito na literatura (MIRA et al., 2008; POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2010). O limite de detecção (LOD) foi calculado pela razão

sinal:ruído (solução contendo os solventes utilizados na extração de compostos fenólicos) na proporção 3:1. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido em três vezes a quantidade do LOD (SCHMIDT et al., 2014; RIBANI et al., 2004).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Observou-se o comportamento dos compostos fenólicos extraídos dos cookies a partir das análises de DPPH e ABTS. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme Equação 1.

$$\%Inibição = \left( \frac{A_{Branco} - A_{Extrato}}{A_{Branco}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde  $A_{Branco}$  é a absorbância da solução do radical livre (ABTS ou DPPH) e  $A_{Extr}$  é a absorbância da amostra em solução.  $A_{Extr}$  foi calculada com base na diferença entre absorbância da solução de amostra em teste com o seu branco.

### 2.5.1 Atividade antioxidante por DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado padrão de DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila) na proporção p/v de (1:5000) dissolvidos em metanol, sob refrigeração. A partir desta solução, foram coletados 10 mL e diluídos com metanol em 100 mL para posterior armazenamento em frasco âmbar, sob refrigeração. Foi então avaliada a atividade antioxidante adicionando em tubos de ensaio (na proporção 1:1:6, v/v) extrato, metanol e solução de DPPH na concentração de  $5,2 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Foram então testados os tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min em espectrofotômetro a 515 nm sendo todo o experimento realizado na ausência de luz (SANTOS et al., 2011).

### 2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS

O padrão de ABTS (2,2' – azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio) foi dissolvido em água destilada na concentração de 7 mM e simultaneamente foi preparada uma solução de persulfato de potássio na concentração de 2,45 mM. Para a

avaliação da atividade antioxidante foi realizada a mistura destas 2 soluções e deixados em repouso por 12-16 h em temperatura ambiente (25 °C). Logo, foram diluídas as soluções de ABTS em etanol para alcançar a absorvância de  $0,7 \pm 0,02$  lidos à 734 nm. Para a reação em tubos de ensaio, foi usado 3 mL da solução diluída para 50 µL da solução do extrato. Os testes foram mantidos na ausência de luz para evitar a degradação do radical ABTS (RUFINO et al., 2007).

## 2.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Amostras obtidas em uma única produção foram coletadas, pesadas (cerca de 300 g cada) e armazenadas em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD) à temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) conforme a data a serem avaliadas: 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Foram realizadas as análises microbiológicas preconizadas pela RDC nº 12, de janeiro de 2001, como, contagem de Coliformes a 45 °C e Estaf. Coag. Positiva/g. A contagem de Bolores e leveduras também foi efetuada devido a possibilidade de alto crescimento destes microrganismos em produtos farináceos. A metodologia utilizada foi a descrita por Silva (2007).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos a Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) com a realização do teste de diferença de médias de Tukey a um nível de significância de 5%.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 PESQUISA DE MERCADO

Através da entrevista realizada na Feira do Livro de Alegrete-RS, no ano de 2016, constatou-se que a maior parte dos entrevistados diz consumir, entre os produtos do questionário, biscoitos tipo cookies (Tabela 2). Esta escolha se manteve estável por públicos de diferentes faixas etárias – menores de 16 anos à maiores de 45 anos, totalizando 49,5% das

escolhas. O produto escolhido em 2º lugar foi “mistura para bolo”, correspondendo à 41% das escolhas e os demais produtos juntos totalizaram 9,5% das escolhas.

Deste modo, os autores optaram estudar a obtenção e caracterização de cookies com substituição da farinha de trigo por farinha e farelo de arroz. Além da escolha do produto pelos entrevistados, verifica-se, em muitos estudos, a aceitação de biscoitos tipo cookies por crianças (FASOLIN et al., 2007; SOARES et al., 2016), bem como por adultos (MARIANI et al., 2015).

**Tabela 2** - Resultado do questionário formulado para avaliar o perfil do público consumidor.

<b>Panificios</b>	<b>Menor de 16 anos</b>	<b>16 a 25 anos</b>	<b>26 a 35 anos</b>	<b>36 a 45 anos</b>	<b>Maior de 45 anos</b>	<b>Total</b>
<i>Cookies/biscoitos</i>	6	8	2	7	8	31
Brownie/bolo	3	-	-	-	-	3
Massa pré-pronta de crepe/panqueca	-	1	-	-	1	2
Barra de cereal	-	-	-	1	-	1
Mistura para bolo	3	8	5	6	4	26
Mistura para pão	-	-	-	-	-	-
						63

### 3.2 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Os resultados do teste de aceitação encontram-se nas Tabelas 3 e 4. Na Tabela 3 é possível verificar que os atributos “cor” e “doçura” das formulações testes (F1, F2, F3) não apresentaram diferença significativa em relação à Controle (F0). A F1 apresentou respostas iguais à F0 em todos os atributos; a F2 foi diferente apenas quanto à crocância e a F3 diferiu significativamente da Controle (F0) em relação à crocância e avaliação global, recebendo menor nota da equipe julgadora. Verifica-se também que a amostra controle foi a que recebeu melhores notas nos atributos avaliados, sendo assim a amostra F1 (com substituição de 25% de farelo de arroz) possivelmente aceita pelo público consumidor.

**Tabela 3** - Atributos sensoriais avaliados nas formulações de cookies padrão (F0) e com farelo fermentado com *S. cerevisiae* (F1, F2, F3).

Atributos	F0	F1	F2	F3
Cor	5,04 <sup>a</sup> ± 1,01	4,80 <sup>a</sup> ± 1,05	4,87 <sup>a</sup> ± 1,25	5 <sup>a</sup> ± 1,27
Crocância	4,86 <sup>a</sup> ± 1,24	4,74 <sup>ab</sup> ± 1,13	4,07 <sup>c</sup> ± 1,28	4,35 <sup>bc</sup> ± 1,24
Doçura	4,56 <sup>a</sup> ± 1,23	4,88 <sup>a</sup> ± 1,12	4,46 <sup>a</sup> ± 1,32	4,50 <sup>a</sup> ± 1,26
Avaliação global	4,95 <sup>a</sup> ± 1,13	4,85 <sup>ab</sup> ± 1,17	4,57 <sup>ab</sup> ± 1,21	4,54 <sup>b</sup> ± 1,22

Dados apresentados como Médias ± Desvio Padrão. Médias na mesma linha e acompanhadas da mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si à 5% de significância. F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*).

Os resultados podem ser avaliados paralelamente ao Índice de Aceitabilidade (IA%), a qual expressa o grau de aceitação de uma amostra pela equipe de julgadores e deve ser maior ou igual a 70%. Como visto na Tabela 4, a formulação F1 obteve valores mais aproximados à controle (F0). No teste de intenção de consumo, verificou-se que os julgadores “comeriam ocasionalmente” (4,0) todas as formulações elaboradas.

**Tabela 4** - Índices de aceitabilidade e de intenção de consumo (%) dos cookies padrão (F0) e com farelo fermentado com *S. cerevisiae* (F1, F2, F3).

Atributos	F0	F1	F2	F3
Cor	72	68,5	70	71,5
Crocância	70	68	58	62
Doçura	65	70	64	64
Avaliação global	71	70	65	65
Intenção de consumo	4,39	4,47	4,09	4,00

F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*).

Após a elaboração e avaliação do índice de aceitabilidade e intenção de consumo dos biscoitos tipo cookie elaborado com farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* em diferentes concentrações (0, 25, 50 e 100%), os autores, em paralelo às demais caracterizações dos cookies já elaborados, desenvolveram cookies com 25% de farelo de arroz fermentado

por *R. oryzae* em substituição à farinha de trigo. Para tal, foram utilizadas a mesma formulação mencionada na Tabela 1, alterando somente o tipo de farelo fermentado. As análises físico-químicas, antioxidantes, sensoriais e microbiológicas foram as mesmas, porém realizadas apenas para uma amostra (RO). Na Tabela 5 estão expostos os atributos avaliados do cookie elaborado com farelo fermentado por *R. oryzae*.

**Tabela 5** - Atributos sensoriais avaliados e índice de aceitabilidade dos cookies com 25% de farelo fermentado por *R. oryzae* (RO).

Atributos	Média ± desvio	Índice de aceitabilidade (%)
Cor	4,82± 0,53	69
Crocância	4,95 ± 0,50	70,7
Doçura	5,13 ± 0,35	73,4
Avaliação global	5,27 ± 0,40	75,3

Os biscoitos tipo cookie elaborados com 25% de farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* tiveram média em torno de 5 para todos os atributos e uma boa aceitabilidade, principalmente quanto ao atributo “avaliação global” (Tabela 5).

Segundo Fasolin et al. (2007), outros trabalhos, realizados com diferentes tipos de biscoito, têm demonstrado forte tendência por parte das indústrias e de pesquisadores em promover o enriquecimento de biscoitos devido ao baixo custo e pela possibilidade de serem facilmente consumidos pelas classes sociais menos privilegiadas. Há cerca de dez anos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de produtos sem glúten e dentre os produtos economicamente viáveis, práticos e preferidos pela população estão os biscoitos cookies. As pesquisas publicadas demonstram boa aceitação dos produtos desenvolvidos com substituição da tradicional farinha de trigo por farinhas de arroz, de uva, de talos de vegetais, entre tantas outras farinhas alternativas (AQUINO et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; PIOVESANA, BUENO E KLAJN, 2013; QUEIROZ et al., 2017; SOARES et al., 2016).

### 3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Na Tabela 6, está apresentada a composição proximal das diferentes formulações utilizando o farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* aplicados em cookies.

**Tabela 6** – Composição proximal das diferentes formulações dos cookies.

<b>Formulações</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Lipídios</b>	<b>Fibras</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Carboidratos</b>
F0	8,8 <sup>c</sup> ±2,0	31,8 <sup>b</sup> ±3,1	9,1 <sup>b</sup> ± 0,5	4,6 <sup>a</sup> ±0,1	37,1 <sup>b</sup> ± 2,8
F1	10,9 <sup>b</sup> ±1,9	24,9 <sup>c</sup> ±3,4	7,5 <sup>c</sup> ± 0,3	4,35 <sup>b</sup> ±0,2	43,1 <sup>a</sup> ± 3,0
F2	12,8 <sup>b</sup> ±2,1	25,6 <sup>c</sup> ±4,6	8,3 <sup>c</sup> ± 0,5	4,2 <sup>b</sup> ±0,2	38,6 <sup>b</sup> ± 3,3
F3	15,3 <sup>a</sup> ±1,5	35,1 <sup>a</sup> ±2,1	10,6 <sup>a</sup> ± 0,6	4,8 <sup>a</sup> ±0,2	26,1 <sup>c</sup> ± 1,7
RO	14,3 <sup>a</sup> ±1,0	23,2 <sup>c</sup> ±2,8	10,5 <sup>a</sup> ± 1,9	4,8 <sup>a</sup> ±0,9	37,2 <sup>b</sup> ± 2,85

Dados apresentados como média±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (5% de significância). F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*); RO= formulação com 25% de farelo fermentado (*R. oryzae*).

A formulação F0, empregada como controle, apresentou os menores teores de nutrientes como mostra a Tabela 6, já a F3 e RO apresentaram os maiores teores, com exceção dos carboidratos, que mostrou o menor teor dentre as formulações. Comparando as formulações F1 e RO que possuem as mesmas porcentagens de farelo fermentado, a última se destaca pelo maior disponibilidade de nutrientes. Esses resultados são esperados, já que o farelo de arroz fermentado por *S. cerevisiae* conforme é concentrado nas formulações acarreta no aumento dos nutrientes de acordo com sua concentração nas formulações assim, como a fermentação por *R. oryzae*. Além disso, o farelo de arroz, quando fermentado por estes microrganismos, aumenta o teor de diversos compostos (FEDDERN et al., 2007, RIBEIRO et al., 2017).

### 3.4 EXTRAÇÃO, PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados o teor e perfil dos compostos fenólicos extraídos dos cookies elaborados com farelo de arroz fermentado e a atividades antioxidantes determinados pelos radicais DPPH e ABTS, respectivamente.

**Tabela 7** – Teor e perfil dos compostos fenólicos extraídos das diferentes formulações de cookies.

	<b>F0</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>RO</b>
Compostos fenólicos ( $\mu\text{g/g}$ )	704,03 <sup>c</sup>	746,58 <sup>b</sup>	684,8 <sup>d</sup>	634,2 <sup>d</sup>	865,08 <sup>a</sup>
<b>Ácidos</b>	<b>Perfil dos compostos fenólicos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>				
Gálico	10,07 <sup>b</sup>	10,21 <sup>b</sup>	8,54 <sup>c</sup>	7,37 <sup>c</sup>	23,17 <sup>a</sup>
Protocatecúico	36,74 <sup>b</sup>	36,85 <sup>b</sup>	33,80 <sup>c</sup>	30,72 <sup>d</sup>	56,85 <sup>a</sup>
Hidroxibenzóico	1,39 <sup>b</sup>	1,60 <sup>a</sup>	1,37 <sup>b</sup>	1,57 <sup>a</sup>	0,77 <sup>c</sup>
Vanilina	3,12 <sup>b</sup>	5,49 <sup>a</sup>	3,68 <sup>b</sup>	5,10 <sup>a</sup>	1,25 <sup>c</sup>
Cumárico	0,15 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>
Ferúlico	0,07 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (5% de significância). F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*); RO= formulação com 25% de farelo fermentado (*R. oryzae*).

**Tabela 8** - Atividade antioxidante dos compostos fenólicos (20 $\mu\text{L}$ ) extraídos das diferentes formulações de cookies.

<b>Atividade antioxidante por DPPH (%)</b>					
<b>Tempo (min)</b>	<b>F0</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>RO</b>
0	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
30	4,2 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	1,8 <sup>c</sup>	1,8 <sup>c</sup>	3,1 <sup>a</sup>
60	5,4 <sup>a</sup>	3,5 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>	2,1 <sup>c</sup>	4,1 <sup>a</sup>
90	5,7 <sup>a</sup>	3,9 <sup>b</sup>	2,9 <sup>b</sup>	4,2 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>
120	5,8 <sup>a</sup>	4,2 <sup>b</sup>	3,1 <sup>c</sup>	2,6 <sup>c</sup>	5,6 <sup>a</sup>
150	6,2 <sup>a</sup>	4,5 <sup>b</sup>	3,5 <sup>c</sup>	2,7 <sup>d</sup>	5,7 <sup>a</sup>
180	6,4 <sup>a</sup>	5,1 <sup>a</sup>	3,6 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>	6,6 <sup>a</sup>
<b>Atividade antioxidante por ABTS (%)</b>					
	11,4 <sup>a</sup>	12,5 <sup>a</sup>	9,1 <sup>b</sup>	11,1 <sup>a</sup>	9,4 <sup>b</sup>

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (5% de significância). F0=formulação sem farelo de arroz; F1=formulação com 25% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*); F2=formulação com 50% de farelo fermentado (*S. cerevisiae*);

F3=formulação com 100% de farelo de arroz fermentado (*S. cerevisiae*); RO= formulação com 25% de farelo fermentado (*R. oryzae*).

De acordo com a Tabela 7, o maior teor de compostos fenólicos foi extraído do cookie de RO, seguido do F1. O perfil dos compostos fenólicos se destacou com a presença majoritária dos ácidos gálico e protocatecólico nas formulações RO, F0 e F1. Este último apresentou vanilina superior às demais formulações. Com isso, a atividade antioxidante se destacou para as formulações RO, F0 e F1, respectivamente, na captura do radical DPPH. Para a captura do radical ABTS as formulações mais eficientes foram F0 e F1, conforme mostra a Tabela 8.

Em geral, a eficácia da atividade antioxidante de um composto fenólico aumenta a partir da ação de grupos substituintes no anel fenólico, que aumentam a capacidade de doar hidrogênio e/ou aumentam a estabilidade do radical livre sequestrado (PRAKASH et al., 2012). Portanto, estes resultados indicam maior funcionalidade quando comparados com as demais formulações, já que mostraram inibições dos radicais superiores.

Schmidt et al. (2014) avaliaram compostos fenólicos da fermentação de farelo de arroz por *Rhizopus oryzae* e verificaram aumento na inibição do radical DPPH e das enzimas peroxidase e polifenoxidase. Segundo Oliveira et al. (2012) compostos fenólicos produzidos a partir da biomassa de farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* em 96 horas, sequestraram 50% do radical livre em 15 min.

### 3.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE COOKIES COM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que a contagem de Coliformes a 45 °C está abaixo do limite determinado pela legislação vigente e que não houve crescimento para *Estafilococos coagulase positiva* (ECP). Nas amostras F1 a F3 não houve crescimento para bolores e leveduras. Em contra partida, a amostra F0 apresentou um crescimento, mas não ultrapassou o limite estabelecido pela Portaria 451 (BRASIL, 2001).

**Tabela 9** - Avaliação da vida de prateleira de cookies elaborados com farelo de arroz fermentado durante 90 dias.

Período (dias)	Determinação	*Ref.	F0	F1	F2	F3	RO
0	Bolors e leveduras (UFC/g)	10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>2</sup>	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
30			3,6 x 10 <sup>5</sup>	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
60			4 x 10 <sup>6</sup>	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
90			6,3 x 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	<10 (est)	<10 (est)
0	ECP (UFC/g)	5 x 10 <sup>2</sup>	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
30			<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
60			<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
90			<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)	<10 (est)
0	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	10 <sup>1</sup>	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<10 (est)
30			<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<10 (est)
60			<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<10 (est)
90			<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<0,3 (est)	<10 (est)

\* Referência = Padrões estabelecidos pela RDC n° 12, de janeiro de 2001. Est.= estimado.



A inserção de coprodutos como farelo de arroz na indústria alimentícia é uma ótima alternativa pelo seu baixo custo e sua elevada quantidade de nutrientes. Além disso, a fermentação em estado sólido por *S. cerevisiae* é uma possível alternativa para aumentar esses compostos, sem causar efeitos desfavoráveis à produção tecnológica de produtos panificáveis, como no caso dos cookies. As quatro formulações dos cookies elaborada com substituição por farelo de arroz fermentado no geral apresentaram boa aceitação, porém somente aquelas contendo farelo fermentado se mantiveram estáveis microbiologicamente, o que no futuro poderão ser direcionados para comercialização.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que todas as análises microbiológicas, durante os 90 dias de armazenamento dos biscoitos tipo cookie com farelo de arroz fermentado por *R. oryzae*, apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, valores inferiores aos limites estabelecidos pela Portaria 451 (BRASIL, 2001).

#### 4. CONCLUSÃO

Os cookies elaborados com 25% de farelo de arroz fermentado apresentaram os melhores resultados, em destaque, o cookie elaborado com farelo de arroz fermentado por *R. oryzae*, o qual obteve melhor avaliação global e aceitabilidade na análise sensorial, maior disponibilidade de nutrientes na composição proximal e na atividade antioxidante, com vida útil de 90 dias.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis of AOAC International, 14th ed. Washington, 2000.

ABDEL-MOEMIN, A. R. Healthy cookies from cooked fish bones. **Food Bioscience**, v. 12, p. 114-121, 2015.

AQUINO, A. C. M. S.; MÓES, R. S.; MLEÃO, K. M. M.; FIGUEIREDO, A. V. D.; CASTRO, A. A. Physical-chemical and sensory characteristics of cookies formulated with

acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residues flour. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 69, n. 3, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. 2001. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/publique/media/CONS\\_leg\\_resolucao12-01.pdf](http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_resolucao12-01.pdf)> Acesso em 29 de agosto de 2016.

CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C. DA S.; CHIATTONI, L. M.; MASSAROLO, K. C.; DUARTE, F. A.; MELLADO, M. DE LAS S.; SOARES, L. A. DE S. Fermentation process in the availability of nutrients in rice bran. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 45-52, 2017.

CIENTEC - Fundação de ciência e tecnologia. **Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Diário Oficial da União: 1991.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Ver. E ampl, - Curitiba: Champagnat, 2013.

FASOLIN, L. H.; ALMEIDA, G. C.; CASTANHO, P. S; NETTO-OLIVEIRA, E. R. Cookies produced with banana meal: chemical, physical and sensorial evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 524-9, 2007.

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

FEDDERN, V.; DURANTE, V. V. O.; MIRANDA, M. Z. DE; MELLADO, M. DE L. M. S. Avaliação física e sensorial de biscoitos tipo cookie adicionados de farelo de trigo e arroz. **Braz. J. Food Technol.**, v. 14, n. 4, p. 267-274, 2011.

FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; Burgarelli L. M. M.; RODRIGUES, F., AYALA, V.; PONTES THÉ, P. M.; PINTO, D., Villela, N. A. Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jabuticaba em biscoitos tipo cookie. **Brazilian Journal of Food & Nutrition / Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

JAN, R.; SAXENA, D. C.; SINGH, S. Physico-chemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten – Free cookies made from raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 281-287, 2016.

MARIANI, M.; OLIVEIRA, V. R.; FACCIN, R.; RIOS, A. O.; VENZKE, J. G. Elaboration and evaluation of gluten-free cookies made with rice bran and rice and soy flour. **Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 70-78, 2015.

MASSAROLO, K. C.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. de S. Effect of particle size of rice bran on gamma-oryzanol content and compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 54-60, 2017.

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

MORETTO, E.; FETT, R. **Processamento e análises de biscoitos**. São Paulo: Varela, 97 p. 1999.

OLIVEIRA, M. DOS S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA - Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

OLIVEIRA, M. dos S.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. de S. Compostos fenólicos e atividade antioxidante em farelo de arroz (*Oryza sativa*) fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 531-537, 2012.

PIOVESANA, A.; BUENO, M. M.; KLAJN, V. M. Elaboration and acceptability of cookies enhanced with oat and flour grape pomace. **Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 68-72, 2013.

POURALI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 259-266, 2010.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Research International**, v. 490, n. 1, p. 201-208, 2012.

QUEIROZ, A. M.; ROCHA, R. F. J.; GARRUTI, D. S.; SILVA, A. P. V.; ARAÚJO, I. M. S. Preparation and characterization of gluten-free cookies enriched with coconut flour: an alternative for celiacs. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**. Comunicado Técnico 128 – Embrapa. ISSN 1679-6535, 2007.

SANTOS, S. N.; CASTANHA, R. F.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; SCRAMIM, S.; MELO, I. S. **Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH**. Comunicado Técnico 50 – Embrapa. ISSN 1516-8638, 2011.

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

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**.3. Ed. São Paulo: Varela. 536p. 2007.

SOARES, J. M.; SANTOS, M. M. R.; CANDIDO, C. J.; SANTOS, E. F.; NOVELLO, D. Jatobá flour added to cookies: chemical composition and sensorial acceptance by children. **Revista Brasileira de Pesquisa e Saúde**, v. 18, n. 3, p. 74-82, 2016.

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa L.*). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

UTAMA-ANG, N.; PHAWATWIANGNAK, K.; NARUENARTWONGSAKUL, S.; RAJNIBHAS SAMAKRADHAMRONGTHAI, R. Antioxidative effect of Assam Tea (*Camellia sinensis* Var. *Assamica*) extract on rice bran oil and its application in breakfast cereal. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1733-1740, 2017.

VALLI, V.; DANESI, F.; GIANOTTI, A.; NUNZIO, M. DI; SAAA, D. L. T.; BORDONI, A. Antioxidative and anti-inflammatory effect of in vitro digested cookies baked using different types of flours and fermentation methods. **Food Research International**, v. 88, Part B, p. 256-262, 2016.

VIEIRA, T. DOS S.; FREITAS, F. V.; SILVA, L. A. A.; BARBOSA, W. M. Efeito da substituição da farinha de trigo no desenvolvimento de biscoitos sem glúten. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 285-292, 2015.



**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL**



#### 4. CONCLUSÃO

A fermentação utilizando os microrganismos *Rhizopus oryzae* utilizando o farelo de arroz integral e desengordurado como substrato aumentou os teores de lipídios, proteínas, cinzas e fibras durante as horas de fermentação. Os minerais, com exceção do cálcio e ferro, a fermentação aumentou o teor de minerais quando comparado antes do processo fermentativo. Quanto aos compostos fenólicos, o aumento significativo no conteúdo após 48 h de fermentação para ambos os farelos, principalmente o desengordurado, demonstra a eficácia do emprego dessa biotecnologia em coprodutos agroindustriais. Destacando-se o farelo integral, já que o mesmo apresenta os melhores resultados no tempo de 96 h.

A fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando os farelos de arroz como substrato, promoveu o aumento de cinzas, proteínas e compostos fenólicos, em 5%, 62% e 10%, respectivamente no farelo de arroz integral fermentado por 6h. Para o farelo desengordurado acarretou no aumento de lipídeos em 38% e fibras em 14%. Os compostos fenólicos foram extraídos em maior proporção no farelo de arroz integral fermentado. Em vista disso, o farelo de arroz integral fermentado por 6h se destacou na disponibilidade dos nutrientes e bioativos.

Por meio da análise metabolômica (CG-EM) juntamente da análise de componentes principais foi possível evidenciar a eficiência da análise de metabólitos originados da digestibilidade *in vitro* e *in vivo* estudados como os glicídios da digestibilidade *in vivo* de larvas e *in vitro*, os aminoácidos da digestibilidade *in vivo* e *in vitro*, os ácidos das digestibilidade *in vivo* de larvas e *in vitro*, os ácidos graxos da digestibilidade *in vivo*, os álcoois da digestibilidade *in vivo*. Os farelos não apresentaram toxicidade quando empregado como dieta de gorgulhos de arroz. Além disso, larvas de *C. capitata* apresentaram a maior absorção dos nutrientes de proteínas e carboidratos, destacando o FRO 96 h seguido do FSC 6 h.

Na aplicação tecnológica, os cookies elaborados com 25% de farelo de arroz fermentado apresentaram os melhores resultados. Destacando o cookie elaborado com farelo de arroz fermentado por *R. oryzae* que obteve melhor avaliação global e aceitabilidade na

análise sensorial, maior disponibilidade de nutrientes e atividade antioxidante, apresentando vida útil de 90 dias.

**CAPÍTULO V**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis, Washington, DC: AOAC (CDROM), 2000.

AVILA, L.A. DE; MARCHEZAN, E.; WALTER, M., 2008. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, 38, 1184-1192.

BORTOLI, D. A. da S.; SANTOS, F. dos; STOCCO, N. M.; ORELLI Jr., A.; TOM, A.; NEME, F. F.; NASCIMENTO, D. D. do. Leveduras e produção de cervejas – Revisão. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2013.

BURLANDO, B., CORNARA, L. Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (*Oryza sativa* L.): A review update. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 82-98, 2014.

CANGUSSU, J. A.; ZUCOLOTO, F. S. Nutritional value and selection of different diets by adult *Ceratitis capitata* flies (Diptera, Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 38, n. 7, p. 485-491, 1992.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. DA; CRUZA, P. L. R. DA; SOUZA, A. R. L. DE; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARMONA, A.; GÓMEZ, A.; CASOTTO, M. Toxicología nutricional: un enfoque antropocéntrico. **Memorias de el Instituto de Biología Experimental**, v. 1, p. 37-40, 1998.

CASTRO, E. da M. de; VIEIRA, N.R. de A.; RABELO, R.R.; SILVA, S.A. da. **Qualidade de grãos em arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**. 30p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 34). ISSN 1516-8476, 1999.

CASTRO, R.J.S. DE, SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

ÇEHRELI, R. Molecular nutritional immunology and cancer. **Journal of Oncological Sciences**, v. 4, p. 40-46, 2018.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**. v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C. DA S.; CHIATTONI, L. M.; MASSAROLO, K. C.; DUARTE, F. A.; MELLADO, M. DE LAS S.; SOARES, L. A. DE S. Fermentation process in the availability of nutrients in rice bran. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 45-52, 2017a.

CHRIST-RIBEIRO, A.; BRETANHA, C. C.; LUZ, G. G.; SOUZA, M. M. DE; BADIALE-FURLONG, E. Antifungal compounds extracted from rice bran fermentation applied to bakery product conservation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, p. 263-268, 2017b.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, maio 2017/18. – v. 5, n.8 (2018) – Brasília. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> ISSN 2318-6852.

DANTAS, E. M, AQUINO, L. C. L. DE. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DÍAZ, A. B.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 72-78, 2012.

DURSun, D.; DALGIC, A.C. Optimization of astaxanthin pigment bioprocessing by four different yeast species using wheat wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 1-6, 2016.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Utilização do farelo de arroz. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80497/1/arroz-farelo.pdf>. Acessado em 5 de abril de 2016.

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

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

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. DE C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

FERNANDES, R. A. A.; OLIVEIRA, I. de; FLUCK, A. C.; OLLÉ, M. de A. TURMINA, R. GEHLEN, J. C. Metodologias para estimar a digestibilidade de alimentos para ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 18, n. 11, 2017.

FORSTER, G. M.; RAINA, K.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; AGARWAL, R.; CHEN, M-H.; BAUER, J. E.; MCCLUNG, A. M.; RYANA, E. P. Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1545–1552, 2013.

GOMERO, M.; LAURENTIN, A.; BERNAL, C.; GALINDO, I.; DIEZ, N. Toxicidad in vivo y proteómica comparativa para el estudio de la expresión de proteínas con actividad insecticida presentes en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. RET. **Revista de Estudios Transdisciplinarios**, v. 2, n. 1, p. 101-109. Fundación Instituto de Estudios Avanzados Caracas, Venezuela, 2010.

GOMES, A. N. O novo consumidor de produtos naturais: Consumindo conceitos muito mais que produtos. 2009. Disponível em: <http://www2.espm.br/sites/default/files/novoconsumidorprodutosnaturais.pdf>

GROPPER, S. S.; SMITH, J. L.; GROFF, J. L. **Nutrição avançada e metabolismo humano**. São Paulo: Cengage Learning. 2011.

GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A.K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, p. 24–30, 2015.

HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 155–159, 2013.

KANNANA, A.; HETTIARACHCHYA, N. S.; LAYB, J. O.; LIYANAGE, R. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. **Peptides**, v. 31, p. 1629–1634, 2010.

KAR, S.; SONA GAURI, S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K. DAS; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUR, R.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Structural features, substrate specificity, kinetic properties of insect  $\alpha$ -amylase and specificity of plant  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 116, p. 83–93, 2014.

KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. (3rd ed.). San Diego: Academic Press, (Chapter 6), 2013.

KIM, D.; HAN, G. D. High hydrostatic pressure treatment combined with enzymes increases the extractability and bioactivity of fermented rice bran. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 191–197, 2012.

LACERDA, D. B. C. L.; JÚNIOR, M. S. S.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L. DE, SILVA-LOBO, V. L.; CAMPOS, M. R. H. SIQUEIRA, B. DOS S. Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n.4, 521-530, 2010.

LEAN, M. E. J. Principles of human nutrition. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 61-65, 2015.

LI, P.; XIA, J.; SHAN, Y.; NIE, Z. Comparative study of multi-enzyme production from typical agroindustrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 2013-2022, 2015.

LIMA, J. M. de N. **Produção do complexo quitosana-polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506 utilizando substratos agroindustriais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró reitoria acadêmica. Curso de mestrado em desenvolvimento de processos ambientais, 80 f. 2011.

LOPES, F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul. Programa de pós graduação em biologia celular e molecular, Porto Alegre, 2011.

LOVERA, M.; ELEVINA PÉREZ, E.; LAURENTIN, A. Digestibility of starches isolated from stem and root tubers of arracacha, cassava, cush-cush yam, potato and taro. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 50-55, 2017.

MALEKIAN, F.; RAO, R. M.; PRINYAWIWATKUL, W.; MARSHALL, W. E.; WINDHAUSER, M.; AHMEDNA, A. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. **Bulletin of the Louisiana Agricultural Experiment Station**, n. 870, p. 1-69, 2000.

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R.; GREGÓRIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista**, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2012.

MARTIN, N.; GUEZ, M A. U.; SETTE, L. D.; SILVA, R. DA, GOMES, E. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. **Microbiology**, v. 79, p. 306-313, 2010.

MESSIA, M. C.; REALE, A.; MAIURO, L.; CANDIGLIOTA T.; SORRENTINO, E.; MARCONI, E. Effects of pre-fermented wheat bran on dough and bread characteristics. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 138-144, 2016.

MORO, J. D.; ROSA, C. S. DA; HOELZEL, S. C. DA S. M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum Scientia, Série: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 33-44, 2004.

MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H.; ARAKANE, Y.; KRAMER, K. J. Chitin Metabolism in Insects. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, p. 193-235, 2012.

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitís capitata* em pessegueiro**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil. 29 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 315), 2010.

NUNES, A. M.; COSTA, K. Z.; FAGIONI, K. M.; COSTA, M. L. Z.; GONCALVES, R. S.; WALDER, J. M. M.; GARCIA, M. S.; NAVA, D. E. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 48, p. 1309-1314, 2013.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.18, n. 3, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, M. DOS S.; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; DE SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA - Journal of Food**, v. 8, n.3, p. 229-236, 2010.

OSADOLOR, O. A.; JABBARI, M.; NAIR, R. B.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Effect of media rheology and bioreactor hydrodynamics on filamentous fungi fermentation of lignocellulosic and starch-based substrates under pseudoplastic flow conditions. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 250-257, 2018.

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

PARK, H-Y; YU, A-R; CHOI, I-W, HONG,H-D; LEE, K-W; CHOI, H-D. Immunostimulatory effects and characterization of a glycoprotein fraction from rice bran. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 191–197, 2013.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Editora McGraw-Hill do Brasil, v. 1, p. 345-363, 1980.

PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 737-742, 2000.

PESSOA, M. F. M. **Digestibilidade *in vitro* vs digestibilidade *in vivo* – aplicação a regimes alimentares de monogástricos.** Dissertação de mestrado em engenharia zootécnica – produção animal. Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia. UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2016.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, 2008.

PEREIRA, Z. P. **Utilização do farelo de arroz na elaboração de biscoito.** Dissertação de conclusão de curso. Departamento de Farmácia. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. 2010.

PEREZ-NAVARRETE, C.; BETANCUR-ANCORA, D.; CASOTTO, M.; CARMONA, A.; TOVAR, J. Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 3, p. 278, 2007.

PITOL, L. O.; BIZ, A.; MALLMANN, E.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 1009-1018, 2016.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage.** 2<sup>a</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 593 p., 1997.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.728, 1996.

RAY, M.; GHOSH, K.; SINGH, S.N.; CHANDRA MONDAL, K. Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India. **Journal of Ethnic Foods**, v. 3, n. 1, p. 15-18, 2016.

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; KAHAR, A. A.; LONG, K. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 2, p. 127-134, 2017.

RODRIGUES, W. C. **Fatores que Influenciam no Desenvolvimento dos Insetos.** Info Insetos, v. 1, n. 4, p. 1-4, 2004. Disponível em: [www.entomologistasbrasil.cjb.net](http://www.entomologistasbrasil.cjb.net)

RUIZ, H.A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation columntray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

SABER, W. I. A.; EL-NAGGAR, N. E.; EL-HERSH, M. S.; EL-KHATEEB, A. Y. An innovative synergism between *Aspergillus oryzae* and *Azotobacter chroococcum* for bioconversion of cellulose biomass into organic acids under restricted nutritional conditions using multi-response surface optimization. **Biotechnology**, v. 14, p. 47-57, 2015.

SANTOS, A. B. dos; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. de A. (Ed.). A cultura do arroz no Brasil. 2.ed.rev.ampl. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 1000 p.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial. Engenharia Bioquímica, Ed. Blucher, v. 2, p. 247-248, 2001.

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

SHARMA, A.; VIVEKANAND, V.; SINGH, R. P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3444-3450, 2008.

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

SLAVIN, J. L. **Human Nutrition: Malnutrition and Diet**. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, p. 544-549, 2014.

SONI, S.; DEY, G. Perspectives on global fermented foods. **British Food Journal**, v. 116, n. 11, p. 1767-1787, 2014.

SOUZA, T. D. de. **Aplicação de compostos biologicamente ativos obtidos de resíduos da agroindústria em alimentos**. Tese de doutorado (Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande. 2018.

SURESH, S.; RADHA, K. V. Effect of a mixed substrate on phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 using solid state fermentation and determination of dephytinization activities in food grains. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 551-559, 2015.

TRASSATO, L. B.; NETO, J. L. L. M.; LIMA, A. C. S.; SILVA, E. S. DA; RONCHITELLES, B.; CARMO, I. L. G. DA S. Primeira ocorrência de *Ceratititis capitata* (Wied.) no Estado de Roraima, Brasil. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 11, n. 1, p. 88-91, 2017.

TUCKER, K. L. **Human nutrition**. Reference Module in Biomedical Research, 2014.

WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT, C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, v. 192, p. 156–162, 2016.

ANEXO



INSTITUTO FEDERAL DE  
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA FARROUPILHA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### 1. DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de alimentos para fins especiais e/ou funcionais

**Pesquisador:** Lidiane MoreiraChiattoni

### 2. Área Temática:

**Versão:** 1

**CAAE:** 55575716.0.0000.5574

**Instituição Proponente:** INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA

**Patrocinador Principal:** INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA

### 3. DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.583.058

### 4. Apresentação do Projeto:

Desenvolvimento de alimentos para fins especiais e/ou funcionais

### 5. Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver alimentos para fins especiais/ funcionais através da utilização de subprodutos de cereais com auxílio da tecnologia de panificação.

### 6. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os riscos não foram especificados. Conforme resolução nº. 466, de 12 de dezembro de 2012: “V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS -Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Logo, o TCLE deverá constar a explicitação dos

**Endereço:** Rua Esmeralda, 355

**Bairro:** CAMOBI

**UF:** RS

**Telefone:**

**Município:** SANTA MARIA

(55)3217-0352

**CEP:** 97.110-767

**E-mail:** cep@iffarroupilha.edu.br

Continuação do Parecer: 1.583.058

possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, bem como a garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa, de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma".

### 1. Recomendações:

Incluir riscos no TCLE e no projeto. Apresentar o questionário a ser aplicado.

### 2. Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendente

### 3. Considerações Finais a critério do CEP:

O Cep acata o parecer do relator.

### 4. Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_700311.pdf	28/04/2016 11:30:17		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CHIATTONI_TCLE.pdf	28/04/2016 11:28:34	Lidiane MoreiraChiattoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	LidianeChiattoni_PlataformaBrasil_Projeto.pdf	28/04/2016 09:49:04	Lidiane MoreiraChiattoni	Aceito
Folha de Rosto	cCHIATTONI_pLATAFORMAbRASIL.pdf	28/04/2016 09:44:26	Lidiane MoreiraChiattoni	Aceito

### 5. Situação do Parecer:

Pendente

**Endereço:** Rua Esmeralda, 355

**Bairro:** CAMOBI

**UF:** RS

**Telefone:**

**Município:** SANTA MARIA

(55)3217-0352

**CEP:** 97.110-767

**E-mail:** cep@iffarroupilha.edu.br

INSTITUTO FEDERAL DE  
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA FARROUPILHA



**5. Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 09 de Junho de 2016

---

**5. Assinado por:**

**GIANCARLO BAZARELE  
MACHADO BRUNO**

**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Esmeralda, 355

**Bairro:** CAMOBI

**UF:** RS

**Telefone:**

**Município:** SANTA MARIA

(55)3217-0352

**CEP:** 97.110-767

**E-mail:** cep@iffarroupilha.edu.br

