



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS - MCN



**ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE ALGAS DO GÊNERO
GRACILARIA SP. UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ATRAVÉS DE
CULTIVO SEMISSÓLIDO.**

FRANCISCA KELIA DUARTE DIAS

MOSSORÓ
2015

FRANCISCA KELIA DUARTE DIAS

**ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE ALGAS DO GÊNERO
GRACILARIA SP. UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ATRAVÉS DE
CULTIVO SEMISSÓLIDO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, área de concentração: Ciências Ambientais, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Naturais.

Orientador (a): Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias

Co-orientador (a): Prof. Dr. Carlos Henrique Catunda.

Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental

MOSSORÓ
2015

Catálogo da Publicação na Fonte.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

Dias, Francisca Kelia Duarte.

Enriquecimento nutricional de resíduos de algas do gênero *Gracilaria sp.* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* através de cultivo semissólido. / Francisca Kelia Duarte Dias. – Mossoró, RN, 2015.

78 f.

Orientador(a): *Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias*

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais

1. Aproveitamento de resíduos - Dissertação. 2. Fermentação semissólida. 3. Alimentação animal. I. *Matias, Luiz Gonzaga de Oliveira*. II. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III. Título.

UERN/BC

CDD 574

FRANCISCA KELIA DUARTE DIAS

**ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL DE RESÍDUOS DE ALGAS DO GÊNERO
GRACILARIA SP. UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ATRAVÉS DE
CULTIVO SEMISSÓLIDO.**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Naturais no ano de 2015.

Aprovado em ____ de _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias (UERN)
Orientador

Prof. Dr. Bergson da Cunha Rodrigues (UERN)
Examinador 1

Prof. Dr. Daniel Freitas Freire Martins (UFERSA)
Examinador 2

*Aos meus pais João e Lizete, irmã
Kelma, esposo Frank Werlly e nosso
filho Danilo, dedico...
À DEUS, ofereço...*

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus por me conceder a vida.

A minha mãe, Maria Lizete, que sempre valorizou e incentivou minha vida escolar, desde a pré-escola até hoje, sacrificando seus sonhos em prol dos meus.

Ao meu amado esposo Frank Werlly, pelo apoio na finalização deste curso, e pelo maior presente que Deus nos deu, nosso pequeno Danilo Willard. Você é companheiro para uma vida inteira.

Aos meus queridos amigos do laboratório da graduação Raiane Silva, José Luiz Barbalho e Alyne Amorim, obrigada pelos momentos de alegria, onde muito mais aprendi do que ensinei.

Aos amigos da pós- graduação Eleneide Gurgel, Bárbara Alessandra e toda equipe do Laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCTV) pela disponibilidade e ajuda.

Aos meus amigos Francisco Fábio Mesquita, técnico dos laboratórios do curso de Ciências biológicas e Thiago Martins Fernandes, aluno da pós-graduação da Universidade Federal do Ceará por disponibilizar seu tempo no laboratório, me ajudando com as análises que eram de minha responsabilidade, me dando dicas de novas técnicas para melhorar essa pesquisa. Agradeço imensamente o desprendimento e o apoio.

Aos técnicos do laboratório do curso de química Adriana Paula, Rodrigo Silva e Williane Simões. Vocês brilham ainda mais o laboratório, obrigada pelas dicas e a ajuda.

Ao projeto “Mulheres de Corpo e Alga” da praia da Barrinha, município de Icapuí, Ceará na pessoa de Aldeneide, seu Mundinho, Ana Paula e Rosinere pelo acolhimento e fornecimento dos resíduos das algas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias por disponibilizar seu tempo e participar ativamente na construção desse trabalho, pela sua paciência e estímulo para a conclusão.

A UERN e ao Departamento de Ciências Biológicas, na pessoa de Máisa Clari Mendonça que, como chefe, organizou meus horários para que pudesse pagar os créditos no primeiro semestre e, como amiga, me incentivou com palavras de apoio e perseverança na difícil tarefa de ser “mãe pós-graduanda”. A você minha eterna gratidão.

Ao IFRN, minha atual segunda “residência”, pela liberação parcial para terminar as disciplinas e concluir o curso.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão de mais essa etapa da minha vida. Sou muito grata.

"A mim, a imagem dos meus pecados me comove muito mais que essa imagem do Cristo crucificado. Diante dessa imagem do Cristo crucificado eu sou levado a ensoberbecer-me por ver o preço pelo qual Deus me comprou. Diante da imagem dos meus pecados é que eu me apequeno por ver o preço pelo qual eu me vendi. Por ver que Deus me compra com todo o seu sangue, eu sou levado a pensar que eu sou muito, que eu valho muito. Mas quando noto que eu me vendo pelos nada do mundo, aí eu vejo que eu sou nada. Eu valho nada."

("Trecho do Padre Antônio Vieira, conhecido como o Sermão do 4º domingo da Ascensão)

RESUMO

O ágar é extraído a partir das algas e serve como fonte de renda para a comunidade da Barrinha, no município de Icapuí-CE. Trata-se de um polissacarídeo bastante aproveitado na indústria de alimentos pelo seu alto teor de carboidratos. O resíduo gerado por essa extração é utilizado para adubar hortas caseiras ou simplesmente descartado quando há excesso de produção do mesmo. O trabalho tem como objetivo identificar os teores de proteínas totais, de carboidratos totais, umidade e cinzas em resíduos gerados a partir da extração do ágar em algas do gênero *Gracilaria sp.*, antes e depois de serem submetidos a diferentes concentrações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em diferentes tempos de exposição, investigando o tempo de fermentação adequado para promover um enriquecimento nutricional dos mesmos. O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, descongelou-se o resíduo, e o mesmo foi limpo e distribuído nos frascos com tampa de papel alumínio, respeitando o delineamento experimental nas concentrações de 0%, 5%, 10% e 15% e correlacionou-se com os tempos de 0h, 24h, 48h e 72h de exposição à levedura. Foi realizada a estatística e correlacionado os fatores concentração e tempo, utilizando a versão 7.7 do software *Assistat®*, montado em experimento fatorial, com três repetições. Observou-se que o melhor tempo foi 24h e a maior concentração foi a de 10% (C2). Na segunda etapa, pegou-se o tempo e a concentração ideal e a mesma foi fermentada utilizando três tipos de fonte de nitrogênio, o Sulfato de amônio 2,5%, a Ureia a 2,5%; e associação de sulfato de amônio e Ureia, cada um a 1,25% e, após a FSS foram feitos testes de proteínas totais e carboidratos solúveis totais novamente. A suplementação com ureia apresentou maior PT possível devido a uma maior disponibilidade de nitrogênio para formação de proteínas, comportamento parecido com os AST. A umidade mais adequada a legislação foi a amostra C3 atribuída a biomassa microbiana e as cinzas não apresentaram diferença significativa possivelmente devido ao consumo de AST e compostos nitrogenados para fabricação das proteínas. Desta forma, sendo mais estudado, pode servir como uma alternativa para o produtor rural, como ração animal.

Palavras Chaves: Aproveitamento de resíduos, fermentação semissólida, levedura, alimentação animal.

ABSTRACT

The agar is extracted starting algae and serves as a source of income for the community of Barrinha, in the municipality of Icapuí-CE. It is a polysaccharide quite tapped in the food industry for its high carbohydrate content. The waste generated by this extraction is used to fertilize home gardens or simply discarded when there is excess production of it. The study aims to identify the total protein content, total carbohydrates, moisture and ash waste generated from the agar extraction algae of the genus *Gracilaria sp.*, before and after being subjected to different concentrations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, at different times of exposure, adequate time for investigating the fermentation to provide nutritional enrichment thereof. The work was divided into two stages. In the first stage, the residue was thawed, and it was clean and distributed in bottles with foil cover respecting the experimental design in concentrations of 0%, 5%, 10% and 15% and correlated with the times of 0h, 24h, 48h and 72h of exposure to yeast. We conducted statistical and correlated factors concentration and time, using the 7.7 version of the software *Assistat*®, mounted in a factorial experiment with three replications. It was observed that the best time was 24h and the highest concentration was 10% (C2) in the second step, it took time and the optimal concentration, and it was fermented using three types of nitrogen source, the sulfate ammonium 2.5%, urea 2.5%; and ammonium sulfate and urea association, each to 1.25% and, after the FSS were made of total protein tests and total soluble carbohydrates again. The urea supplementation showed higher EN possible due to the increased availability of nitrogen for protein formation, a behavior similar to the AST. The most adequate moisture legislation was the sample C3 attributed to microbial biomass and ash showed no significant difference possibly due to consumption of AST and nitrogen compounds for the production of proteins. Thus, further study and may serve as an alternative to the farmer as animal feed.

Key words: Waste Utilization, semisolid fermentation, yeast, animal feed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Alga do gênero <i>Gracilaria sp.</i> , encontrada na praia da Barrinha, município de Icapuí-CE.....	21
FIGURA 2 – Comunidade da praia da Barrinha, local da sede PMCA, Icapuí-CE	22
FIGURA 3– Esquema da reação de glicólise seguida da fermentação alcoólica que ocorre na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
FIGURA 4 – Secadores utilizados para depositar as algas depois da colheita. PMCA, Icapuí-CE.....	34
FIGURA 5 – Primeira secagem das algas (Março/2003). PMCA, Icapuí-CE.....	34
FIGURA 6 – Distância e acesso entre os municípios de Mossoró-RN e Icapuí-CE.....	34
FIGURA 7 – Beneficiamento das Algas- limpeza com limão. PMCA, Icapuí-CE.....	35
FIGURA 8 – Beneficiamento das algas- Secagem nos secadores. PMCA, Icapuí-CE.....	35
FIGURA 9 – Beneficiamento das algas. Ágar extraído das algas, PMCA, Icapuí-CE.....	35
FIGURA 10 – Beneficiamento das algas- Resíduo produzido a partir da retirada do ágar.PMCA,IcapuíCE.....	35
FIGURA 11 – Beneficiamento das algas- produção dos <i>mousses</i> para merenda escolar. PMCA, Icapuí- CE.....	36
FIGURA 12 – Beneficiamento das algas- produção de produtos de higiene pessoal. PMCA, Icapuí- CE.....	36
FIGURA13–Delineamento experimental da etapa 1 da pesquisa.....	36
FIGURA 14 – Pesagem em balança semi analítica dos resíduos nos frascos para fermentação, LABBIO II, UERN.....	37
FIGURA 15 – Reações envolvidas no método de <i>Kjerdahl</i>	40
FIGURA 16– Distribuição das amostras da etapa 2 do projeto.....	42

FIGURA 17–Delineamento experimental da etapa 2 do projeto.....	42
FIGURA 18– Amostra para teste de umidade.....	44

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Percentual de proteínas totais no resíduo submetido a fermentação por diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes tempo de exposição na primeira etapa do projeto.....	47
TABELA 2 – Valores médios de proteínas solúveis totais (PT) em função da diferença de concentração de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
TABELA 3 – Valores médios do tempo de exposição do resíduo a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
TABELA 4 – Valores de carboidratos solúveis totais no resíduo submetido a fermentação a diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes tempos de exposição (mg/mL) para o teste de <i>Tukey</i> na primeira etapa do projeto.....	50
TABELA 5 – Valores médios dos carboidratos solúveis totais em função da diferença de concentração de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fator 1) na etapa 1.....	51
TABELA 6 – Valores médios de Carboidratos solúveis totais (AST) em função da diferença de tempo de exposição à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fator 1) na etapa 1.....	52
TABELA 7 – Percentual de Proteínas solúveis totais no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio.....	55
TABELA 8- Valor das médias das concentrações de proteínas solúveis totais entre os tratamentos suplementados com compostos nitrogenados na etapa 2.....	56
TABELA 9- Valores de Carboidratos solúveis totais (AST) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24 horas, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL).....	59
TABELA 10- Valores das médias das concentrações de Carboidratos solúveis totais (ATS) entre os tratamentos suplementados com compostos nitrogenados na etapa 2.....	60
TABELA 11- Valores das médias das umidades entre os tratamentos, em diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na etapa 1.....	63
TABELA 12- Valores das médias das umidades entre os tratamentos, em diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na etapa 2.....	64
TABELA 13- Valores das médias das cinzas entre os tratamentos, em diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , na etapa 1.....	64

TABELA 14- Valores das médias das cinzas entre os tratamentos, em diferentes concentrações de <i>saccharomyces cerevisiae</i> , na etapa 2.....	64
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Concentração percentual das proteínas totais utilizando diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para enriquecimento protéico em resíduos de algas.....	49
GRÁFICO 2 - Concentração de Carboidratos solúveis totais em mg/mL utilizando diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para enriquecimento protéico em resíduos de algas.....	53
GRÁFICO 3 - Concentração de Carboidratos solúveis totais e proteínas solúveis totais em mg/mL utilizando diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para enriquecimento protéico em resíduos de algas.....	53
GRÁFICO 4 - Concentração percentual das proteínas totais utilizando diferentes concentrações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para enriquecimento protéico em resíduos de alga.....	57
GRÁFICO 5 - Valores de Carboidratos solúveis totais (ATS) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL).....	61
GRÁFICO 6- Valores de Carboidratos solúveis totais (ATS) e proteínas solúveis totais (PT) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24h,suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL).....	62

ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Al	Alumínio
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>“The Association of Official Analytical Chemists”</i>
AQUASIS	Associação de pesquisa e preservação de ecossistemas aquáticos
Ar	Argônio
ASSISTAT	Assistente estatístico
ATS	Carboidratos solúveis totais
aW	Atividade de água
Ca	Cálcio
CAGECE	Companhia de água e esgoto do Ceará
Cd	Cádmio
Cl	Cloro
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de variação
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EUA	Estados Unidos da América
F	Flúor
FANAT	Faculdade de Ciências exatas e naturais
FBC	Fundação Brasil Cidadão
Fe	Ferro
FSS	Fermentação semissólida
g	Grama
GRAS	<i>“Generally Recognized as Safe”</i>
h	Hora
I	Iodo
IBAMA	Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
K	Potássio
LABBIO II	Laboratório de Biologia II
LCTV	Laboratório de Cultura de tecido vegetal
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mn	Manganês
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
Na	Sódio
P	Fósforo
p.a.	Para análise
PMCA	Projeto Mulheres de Corpo e Alga
S	Enxofre
UERN	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Distribuição e importância econômica das Algas no Brasil.....	17
2.2 Banco de Algas marinhas e fanerógamas de Icapuí-CE.....	19
2.2.1 Projeto Mulheres de Corpo e Alga (PMCA).....	21
2.3 Processos Fermentativos e Bioconversão em leveduras.....	23
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	30
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Materiais utilizados para as análises de proteínas totais, carboidratos totais, umidade e cinzas.....	30
4.1.1.Reagentes.....	30
4.1.2.Vidrarias.....	31
4.1.3.Equipamentos.....	31
4.2 Coleta, transporte e limpeza dos resíduos.....	31
4.3 ETAPA 1.....	36
4.3.1 Preparo dos resíduos.....	35
4.3.2.Inoculação das leveduras e preparo das farinhas.....	36
4.4 Caracterização do método de análise das proteínas solúveis totais.....	38
4.5 Caracterização do método de análise dos carboidratos solúveis totais.....	40
4.6 ETAPA 2:	41
4.6.1 Inoculação das leveduras adicionadas aos compostos nitrogenados.....	43
4.7 Caracterização do método de análise das proteínas solúveis totais.....	43
4.8 Caracterização do método de análise dos carboidratos solúveis totais.....	44
4.9 Caracterização do método de análise da umidade.....	44
4.9.1 Procedimento experimental.....	45
4.10 Caracterização do método de análise de cinzas.....	46

4.10.1 Procedimento experimental.....	44
4.11 Tratamento Estatístico.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande diversidade de macroalgas marinhas incluindo as pertencentes ao filo *Rhodophyta* com alguns gêneros de importância econômica, como a *Gracilaria*, *Gelidium* e *Hypnea* (CABRAL, 2010).

Apesar dessa diversidade e extensão litorânea, as algas são pouco exploradas comercialmente, sendo quase restrita a exploração de alguns gêneros de algas vermelhas. O consumo como alimento no ocidente é praticamente inexistente se comparado ao consumo dos países como Japão e China. As macroalgas são do ponto de vista econômico, constituintes importantes sendo utilizadas para alimentação de homens e animais, além de servirem como matéria-prima para indústrias de diversos setores, através dos ficocolóides como as ágaranas, carragenanas e alginatos (OLIVEIRA FILHO, 2001; McHUGH, 2003), como mostra a figura abaixo, usados na produção de alimentos, principalmente nas indústrias de laticínios (iogurtes, flans, sorvetes, achocolatados) na fabricação de gelatinas ou como espessante (PEREIRA, 2014 a e b; PEDROSO, 2006; NAGAI; YUKIMOTO, 2003).

Muitas rodofíceas são utilizadas comercialmente como alimento humano, na extração do ágar utilizado na fabricação de gomas, laxantes ou, ainda, como meio de cultura para microrganismos. Espécies de *Gracilaria* são comestíveis e cultivadas em várias partes do mundo. Seu consumo pode ser direto como massa alimentícia, para compor saladas e bolinhos de arroz e, indireto, na extração do ágar.

As algas do gênero *Gracilaria sp.*, quando frescas, são vendidas como salada de vegetais, muito apreciada no Havaí (EUA) por várias décadas, chegando a ser produzido até 6 (seis) toneladas de peso fresco para consumo por semana. Também na Indonésia, Malásia, Filipinas e Vietnã, espécies de *Gracilaria sp.* são recolhidas para alimentação. Nas Índias Ocidentais ela é vendida em mercados como "musgo marinho" e a comunidade acredita ter propriedades afrodisíacas, sendo ainda usada como base para bebidas não-alcoólica (McHUGH, 2003).

O resíduo gerado no processo de extração de compostos de interesse comercial é rico em celulose, nitrogênio, potássio e, em menor quantidade sódio e fósforo, originários do meio ambiente marinho onde é cultivada, e da matéria orgânica das células mortas da alga (REBOUÇAS, 2013). No entanto, os resíduos obtidos a partir do processo de extração não encontram ainda nenhuma aplicabilidade aparente. Um dos destinos desse material pode ser o consumo animal, que, por sua vez, deve ser criteriosamente pesquisado.

O enriquecimento protéico de produtos naturais por bioprocesso em meio semissólido permite a obtenção de ração animal com valor nutritivo diversificado e adequado à dieta do animal estudado. A diversificação de substratos utilizáveis na fermentação semissólida, incluindo resíduos agrícolas e industriais, contribui também para minimizar os problemas de poluição no meio ambiente (CAMPOS, 2003).

A produção de alimentos de origem animal, rico em proteínas, vitaminas e minerais, pode minimizar a carência alimentar em épocas críticas do ano (CAMPOS, 2005). Diversos produtos têm sido usados com sucesso para processamento protéico por fermentação microbiana: resíduos de batata-doce (YANG, 1988); bagaço de laranja (MENEZES et al., 1989); resíduos de mandioca (CANOILAS, 1991; MANILAL et al., 1991) e beterraba forrageira (GIBBONS et al., 1984).

Dentre os microrganismos utilizados no processo destacam-se em especial as leveduras, pela eficiência na bioconversão de produtos de menor valor nutricional a maior valor nutricional, reconhecidas como fonte protéica de alto valor e uma grande reserva natural de vitaminas do complexo B. As leveduras possuem valores nutritivos em termos de digestibilidade e valor biológico em torno de 87%, relativamente altos quando comparados aos totais do ovo de galinha, da ordem de 96% (PEPPLER, 1970).

Com base no exposto, a geração de proteína celular para consumo animal através do uso de leveduras, deve ser considerada como uma via de produção de alimentos alternativos, a qual elimina as restrições sazonais e de variações climáticas que existem em muitas safras agrícolas (SANTOS, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição e importância econômica das algas no Brasil

As macroalgas podem ser classificadas em três filios principais: Algas pardas, verdes e vermelhas (VAN DER HOECK, 1995 apud SILVA, 2009). As Algas pardas pertencentes ao filo *Phaeophyta*, incluem as algas marinhas bentônicas mais presentes nas águas temperadas, boreais e polares, existindo pelo menos 1500 espécies descritas deste tipo. Além das clorofilas *a* e *c*, os cloroplastos das algas pardas têm vários carotenóides, incluindo a fucoxantina, responsável pela cor característica dos membros desse filo (RAVEN et al., 2007).

As algas verdes (filio *Clorophyta*) incluem pelo menos 1700 espécies já descritas. Embora a maioria seja aquática, elas são encontradas em uma variedade de habitat, como tronco de árvores, solo e em associações simbióticas com fungos (liquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. Elas possuem clorofilas *a* e *b* (como as briófitas e plantas vasculares) e uma grande variedade de carotenóides. Assim como as plantas terrestres, estas algas são capazes de armazenar amido em seus cloroplastos (RAVEN et al., 2007).

As algas vermelhas que dominam o filo *Rodophyta*, dominam as águas tropicais e quentes, mas também podem ser encontradas nas regiões mais frias do mundo. São predominantemente marinhas. A cor verde da clorofila *a* é mascarada pelo pigmento acessório ficoeritrina, que fica localizado no cloroplasto, característico deste filo, que dá a cor vermelha.

As algas vermelhas possuem clorofila *a* e *d*, diversos carotenóides e o principal material de reserva é o amido, encontrado no citoplasma (RAVEN et al., 2007). Este filo representa as algas estudadas nesse trabalho, todas pertencentes ao gênero *Gracilaria*, predominantemente três macroalgas vermelhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* que apresentam a seguinte classificação biológica: divisão Rodophyceae, classe Florideophyceae e ordem Gracilariales.

Atualmente a principal fonte econômica relacionada a estas espécies é a exploração de ágar, um ficocolóide de alto valor econômico. Ficocolóide (*Ficos* = alga + colóide = gel) são moléculas de grande tamanho, constituídas por açúcares simples, que fazem parte das paredes celulares e espaços intercelulares de um grande número de algas, fundamentalmente castanhas e vermelhas (SOUZA & PAULA, 2010). Dentro das algas marinhas, as espécies estudadas são as que mais necessitam de estudos bioquímicos, uma vez que os critérios morfológicos têm sido insuficientes para a delimitação dos limites de separação entre as espécies. No entanto, poucos trabalhos se propõem ao uso das algas do gênero *Gracilaria* na alimentação

animal.

O Brasil apresenta uma extensa área costeira, sendo o mar uma importante fonte de alimento, emprego e energia. Isso justifica a constante preocupação em relação à qualidade e preservação dos oceanos. Os recursos ambientais marinhos estão diretamente associados com a sustentabilidade exploratória dos estoques pesqueiros, através da pesca artesanal, do turismo e através das atividades das comunidades tradicionais na orla marítima - folclore, tradições, estilo de vida (MEIRELES, 2006).

Entretanto, o equilíbrio desse patrimônio sócio-ambiental está ameaçado pela falta de planejamento na ocupação e nas ações das atividades humanas na zona costeira (REBOUÇAS, 2013).

Na Costa Brasileira ocorrem diversos tipos de habitat, formando uma diversidade de ecossistemas. Os bancos de algas marinhas destacam-se por serem áreas de reprodução, alimentação e habitat da fauna. A grande riqueza genética dos ecossistemas marinhos brasileiros representa um imenso potencial pesqueiro, biotecnológico, mineral e energético (OLIVEIRA e MIRANDA, 1998). Estes recursos não devem ser desperdiçados através da degradação ambiental e da exploração excessiva a ponto de comprometer a sustentabilidade a médio e longo prazo. Atualmente várias unidades de conservação foram estabelecidas no litoral e ajudam na preservação da biodiversidade marinha (REBOUÇAS, 2013).

Dentre os bancos de algas brasileiros podemos citar, com grande importância ecológica: Arquipélago de Abrolhos, na Bahia com suas algas coralinas, além de algas clorofíceas, rodofíceas e feofíceas, sendo duas das cinco ilhas do arquipélago proibidas a visitação; as algas marinhas bentônicas do arquipélago de Fernando de Noronha em Pernambuco; O Atol das Rocas, no Rio Grande do Norte que abriga uma diversificada fauna marinha com recifes de algas calcárias, invertebrados e peixes no meio do oceano; Ilha da Trindade, no Espírito Santo, que possui macro e microalgas em toda sua diversidade; e o banco de algas e fanerógamas de Icapuí - CE, que se concentram nas Praias da Barrinha, Barreiras e Requenguela (FBC, 2012 apud REBOUÇAS, 2013).

A exploração, exclusivamente de forma extrativista de algas, estava localizada principalmente na costa do Ceará, mais especificamente no município de Icapuí. Neste período, na mesma localidade, cerca de 85% da matéria prima processada era coletada mensalmente, o equivalente a 60 toneladas (REBOUÇAS, 2013).

As algas também são importantes fontes de compostos essenciais para a nutrição humana. Em muitos países a indústria alimentícia consome uma grande quantidade de algas, sendo estas bastante conhecidas, por fornecerem uma grande quantidade de fibras, vitaminas,

sais minerais e antioxidantes. Nas últimas décadas, observa-se um esforço no desenvolvimento do cultivo em larga escala, em detrimento da exploração indiscriminada e insustentável dos bancos naturais (CARDOZO et al., 2007 apud SILVA, 2009).

As algas são organismos pertencentes a uma imensa variedade de nichos ecológicos. Devido às mais diversas condições de ambientes, a biossíntese de metabólitos secundários, tornou-se uma estratégia de sobrevivência (CARDOZO et., al, 2007).

Inúmeras atividades biológicas de algas foram relatadas na literatura, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias, antivirais e antimicrobianas, entre outras, mostrando o potencial econômico destes organismos para serem usados como insumos na produção de remédios (SMIT, 2004).

2.2 Banco de Algas Marinhas e fanerógamas de Icapuí-CE

O Município de Icapuí com 429,3 Km² e 64 Km de praia, está situado no litoral leste do Estado do Ceará, na micro-região do baixo Jaguaribe, a 206 km de Fortaleza por via rodoviária. Limita-se ao norte com o Oceano Atlântico, ao sul e a oeste com o município de Aracati e ao leste com o estado do Rio Grande do Norte (IBGE, 2010).

A praia da Barrinha está localizada a aproximadamente 6 Km da sede do município e apresenta grandes valores naturais e paisagísticos. A região é caracterizada por um banco de algas e fanerógamas popularmente conhecido como banco natural, importante como uma cobertura natural contra a erosão costeira (AQUASIS, 2003).

Este ecossistema constitui-se de diversas espécies de crustáceos, moluscos, aves, peixes e até o mamífero aquático mais ameaçado de extinção: *Trichechus manatus*, conhecido popularmente por peixe-boi, sendo habitat e fonte de alimento para a fauna local e migratória (AQUASIS, 2003).

Localizado com maior diversidade na Praia da Barrinha, esse ecossistema abriga várias espécies de algas, desde rodofíceas (algas vermelhas), clorofíceas (algas verdes) até feofíceas (algas pardas). Além disso, neste local pode ser encontrada uma planta marinha (fanerógama) conhecida como —capim agulha, que alimenta o peixe-boi marinho. Para a comunidade da Barrinha, este ecossistema é importantíssimo, pois funciona como uma barreira de proteção contra a erosão marinha e sustenta toda a atividade pesqueira da região (REBOUÇAS, 2013).

A produção primária que consiste de matéria orgânica, algas e nutrientes, existente no banco de algas, deriva da desembocadura do complexo estuarino canal da Barra Grande, o

qual está vinculado ao lençol freático existente no sopé das falésias mortas (MEIRELES, 2006). Além da importância para a biodiversidade ameaçada, existem ambientes costeiros na região de grande importância para a manutenção do recrutamento da pesca costeira, especialmente estuários com manguezais, recifes costeiros, bancos de algas e bancos de fanerógamas, que se constituem em grandes berçários da vida marinha (AQUASIS, 2003).

Por representar um dos mais complexos ecossistemas marinhos, o banco de algas possui com as comunidades costeiras, uma relação de subsistência. Além disso, está totalmente relacionado com a dispersão de nutrientes para os demais ecossistemas marinhos do litoral leste (MEIRELES, 2006). Apesar disto, o banco de algas e fanerógamas está bastante ameaçado devido à extração indiscriminada e insustentável. Esta ação predatória, além de ameaçar o ecossistema, intimida todas as relações de subsistência que as populações costeiras possuem com este ambiente (FBC, 2012).

Na região têm ocorrido, segundo relatos dos comunitários locais, atividades insustentáveis, como, pescarias ilegais, principalmente o arrasto de fundo para camarão e a pesca de compressor. Tratando-se ainda das atividades insustentáveis, as mesmas têm ocorrido desde a década de 70, através da exploração de algas marinhas, provocando a degradação das algas economicamente rentáveis, por meio da coleta de arrancar o seu substrato, evitando que as algas possam se regenerar (REBOUÇAS, 2013).

A região concentra ainda uma quantidade significativa de embarcações pescando com compressores, que além de constituir-se em pescaria ilegal, de acordo com as normas em vigência do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), tem causado impactos nos fundos marinhos devido a colocação de milhares de “*marambais*” (atrativos artificiais para lagostas) (COSTA et al, 2012)

As ações degradativas vêm contribuindo para a diminuição e escassez dos recursos pesqueiros da região. Historicamente, as baixas inversões públicas na pesca artesanal, e as fragilidades existentes na implementação do ordenamento da pesca da lagosta e de outros recursos pesqueiros, têm colocado em risco a dinâmica dos espaços de relações entre os pescadores artesanais e a natureza. Soma-se a isto a intensidade de capturas de lagosta de forma exploratória e ao crescimento das atividades ilegais de pesca, resultando em crescentes conflitos entre os pescadores artesanais e as embarcações ilegais. (COSTA et al., 2012)

Diante da problemática da comunidade, a FBC desenvolveu em conjunto com a comunidade, uma alternativa de cultivo sustentável como forma de dar sustentabilidade à região e manutenção deste ecossistema marinho. O desenvolvimento do projeto tem como base, fomentar a atividade de cultivo de algas na comunidade da Barrinha, no município de

Icapuí, do Estado do Ceará, como uma alternativa tecnológica diferenciada de aquicultura sustentável, fortalecendo o desenvolvimento socioambiental, visando melhorar a qualidade de vida das populações locais.

A coleta e o cultivo sustentável de algas marinhas criaram oportunidade de ocupação e renda para um grupo de 12 famílias que garantem a qualidade de vida e preservação ambiental da comunidade, através da venda *in natura* e do beneficiamento da alga na produção de seus derivados. A figura abaixo mostra uma alga representante do gênero *Gracilaria* sp., muito encontrada na comunidade.

Figura. 1: Alga do gênero *Gracilaria* sp., encontrada na praia da Barrinha, município de Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2013).

2.2.1 Projeto Mulheres de Corpo e Alga (PMCA)

O projeto Mulheres de corpo e alga (PMCA) foi uma iniciativa das esposas de pescadores da comunidade de Barrinha, no município de Icapuí, Estado do Ceará. O projeto nasceu há quase 10 anos e hoje é meio de subsistência para as famílias que antes viviam da pesca da lagosta que hoje se encontra quase extinta. O projeto substituiu a prática do extrativismo predatório pelo cultivo sustentável de algas, contribui para o equilíbrio do bioma marinho e ainda encontrando um meio de gerar renda com baixo impacto ambiental.

Inicialmente, devido à falta de informação e até conhecimento acerca da importância das algas, tanto ecologicamente quanto economicamente, a comunidade realizava atividade extrativista e predatória, onde as pessoas colhiam essas algas e vendiam para grupos

japoneses, sem conhecer a sua importância social e ambiental. Vale salientar que as algas eram retiradas pelas mulheres que vendiam para empresas internacionais, os primeiros a encontrarem o tesouro. O material coletado com mão de obra baratíssima era a base de cosméticos comercializados no mundo inteiro. A figura abaixo ,mostra a entrada de acesso ao projeto.

Figura 2: Comunidade na praia da Barrinha, local da sede do PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2013).

O Projeto que foi desenvolvido pela FBC através do Projeto “De Olho na Água”, e atua na comunidade da Barrinha, em Icapuí, já ganhou diversos prêmios nacionais, entre eles, o Prêmio Fundação Banco do Brasil de Tecnologia Social 2009; o Selo Mercado Mata Atlântica, em 2012; tendo sido, naquele mesmo ano, selecionado pelo Ministério do Meio Ambiente para ser publicado no livro “Boas Práticas de Educação Ambiental na Agricultura Familiar”, sendo ele o único projeto que apresentou atividades voltadas para o bioma marinho (MACHADO,2014).

Com capacitações feitas, as mulheres da comunidade transformam algas marinhas em comida, sabonete líquido, sabonete em barra, xampu e hidratantes. Esses produtos são vendidos na própria sede do projeto e no comércio local, gerando renda para as famílias envolvidas (COSTA et al,2012).

As algas marinhas são a base de pratos servidos na merenda escolar nas escolas municipais de Icapuí. Segundo a coordenadora do projeto, Ana Paula Lima, este ano, serão cerca de 10 mil *mousses* produzidos somente para as escolas. O doce é vendido por R\$ 1,40,

sendo que uma parte fica para um fundo de operação e reserva da fundação e o restante vai para as famílias envolvidas (MACHADO, 2014).

Com o cultivo houve uma recuperação significativa do banco de algas e, conseqüentemente, de toda biodiversidade que dele dependia para sobreviver. A colheita em mar aberto é feita pelos homens, por ser uma atividade que requer grande esforço físico; enquanto as mulheres ficam responsáveis pelo beneficiamento das algas, o que inclui lavagem, secagem e preparo dos alimentos e produtos de higiene para então transformar a matéria-prima em produtos de consumo (MACHADO, 2014).

Para manter a produção, a coleta das algas é feita em maré baixa, amarrando-as em cordas para que elas procriem e, após 90 dias, ser feita a colheita. O processo de lavagem utiliza a água da chuva armazenada em cisternas, minimizando o uso da água da rede de abastecimento local (MACHADO, 2014).

Após processo de secagem é feito o cozimento das algas, de onde se extrai o Ágar, um polissacarídeo utilizado como estabilizante na preparação de alimentos, conservas e cosméticos (MACHADO, 2014). O que sobra desse processo é o resíduo que pode ser aproveitado na horta caseira desenvolvida no projeto ou seu excesso é descartado sem finalidade.

Os resíduos gerados a partir da extração do Ágar são predominantemente oriundos de três macroalgas vermelhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* que apresentam a seguinte classificação biológica: divisão Rodophyceae, classe Florideophyceae e ordem Gracilariales (REBOUÇAS, 2013).

2.3 Processos Fermentativos e bioconversão em leveduras

Os microrganismos apresentam uma velocidade de multiplicação celular de aproximadamente 500 vezes maior que as dos vegetais. Isto ocorre em função da grande área específica dos microrganismos que lhes proporcionam uma velocidade metabólica maior. Animais e vegetais necessitam de extensas áreas e de um ciclo longo para serem utilizados como alimento, enquanto os microrganismos podem produzir proteínas em poucas horas e em áreas restritas, o que os torna mais viáveis em termos de espaço (MENEZES, 1989).

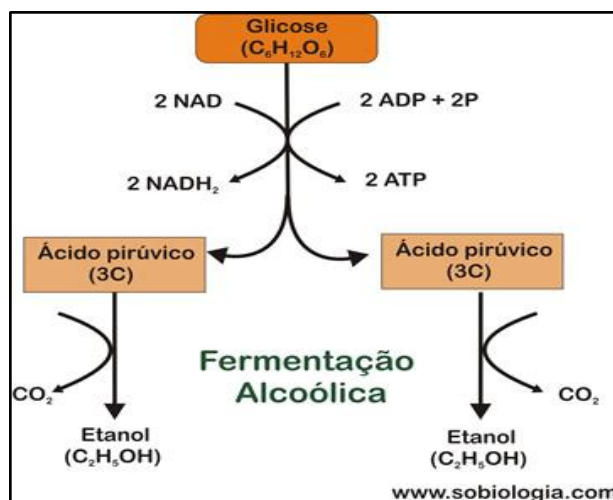
Pinheiro et al. (1979) cita as vantagens do uso de microrganismos na produção de alimentos: rápido crescimento do microrganismo, a exemplo de algumas espécies de leveduras e bactérias que podem se multiplicar em menos de 20 minutos; a possibilidade de

uso de um número diversificado de substratos, realizando a reciclagem e contribuindo com a preservação do meio ambiente; o efeito do clima é praticamente eliminado; o processo de produção pode ser contínuo. Já Luis Pasteur tentou associar fermentação com o desenvolvimento de organismos “... fermentação, longe de ser um fenômeno sem vida, é um processo vivo... todo fenômeno de fermentação é correlacionado com o desenvolvimento de células micodérmicas e plantas as quais preparei e estudei em estado puro e isolado.”(PASTEUR apud SCHWARTZ, 2001).

Atualmente o termo “fermentação” pode ter diferentes significados, dependendo do setor que o utiliza. O sentido geral do termo significa qualquer processo de cultivo microbiológico que ocorreu com ou sem ar. O significado bioquímico da fermentação é o processo metabólico onde o substrato orgânico atua como doador e como receptor final de elétrons, ocorrendo em condições anaeróbicas, mas sem a utilização de uma cadeia respiratória, como acontece na respiração anaeróbia, como mostra a figura 3 (TORTORA et al, 2010)

Antes de ser esclarecido o papel dos microrganismos na fermentação, ela era definida diferente do conceito aceito atualmente. Em 1839, Liebig definiu o termo fermentação como sendo “...a putrefação de substâncias vegetais que se realiza sem que haja a liberação de nenhum odor ou pelo o menos nenhum desagradável...”

Figura 3: Esquema da reação da glicólise seguida da fermentação alcoólica que ocorre na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Lehninger, Nelson & Cox (2006)

Frazier & Westhoff (1993) cita as seguintes vantagens, quanto ao uso da proteína microbiana: possibilidade de utilizar alimentos não consumidos pelo homem como substrato para produzir proteína microbiana; apresenta elevado teor de proteína proveniente de microrganismos, que podem chegar de 60 a 70% do conteúdo microbiano dissecado; rápido aumento do número de células, como consequência da extraordinária capacidade de reprodução em curto espaço de tempo; continuidade do processo de produção de proteína microbiana independentemente de fatores climáticos; aproveitamento de resíduos agroindustriais como palhas, cascas, grãos, frutas, tubérculos, soro lácteo utilizados como substratos para a produção de proteína unicelular.

Pelczar, Chan & Krieg (2003) referem-se ao uso de microrganismos como alimentos e fontes atrativas de alimento, porque podem ser cultivados em despejos ou subprodutos industriais, com produção de grandes quantidades de células ricas em proteína.

Araújo et al. (2009) relaciona as seguintes vantagens em utilizar a proteína de célula única como suplemento ou substituto alimentar: os microrganismos crescem muito rapidamente e são produzidos em grandes quantidades; o conteúdo de proteína das células microbianas é muito alto, a porcentagem nas células leveduriformes varia de 40 a 50%, enquanto a carne e a soja apresentam 20 a 35% de proteína, respectivamente.

As proteínas de microrganismos selecionados apresentam todos os aminoácidos essenciais; alguns microrganismos, em particular as leveduras, têm alto conteúdo de vitaminas; o meio de cultivo dos microrganismos é bastante diversificado, entre eles os dejetos ou subprodutos industriais, tais como: hidrocarbonetos de refinaria de óleo, líquidos com enxofre, hidrolisados de madeira (ARAÚJO et al., 2009).

A eficiência da conversão protéica por leveduras depende de fatores como: temperatura, suprimento de oxigênio, disponibilidade de nutrientes. O tempo médio para dobrar o teor de proteína é de 5 horas em sistemas de fermentação por batelada (BURROWS, 1970 apud ARAÚJO, 2009).

Segundo Park & Ramirez (1989), as leveduras de panificação *Saccharomyces cerevisiae* são organismos atrativos para a produção comercial de proteína em virtude de fácil propagação e de não terem relação patogênica com o homem. O uso de microrganismos como alimento ou como suplemento protéico tem atraído grande interesse, pois estes são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana (PARAJÓ et al., 1995).

A biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico natural contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (VILLAS BÔAS E ESPOSITO,

2000). Enquanto um boi de 450 kg ganha em média 0,45 kg de proteína por dia; em contraste, 450 kg de levedura produzirão diversas toneladas de proteínas em apenas um dia (ARAÚJO et al., 2009). O conteúdo de proteína das células microbianas é muito alto e essas proteínas, na maioria das vezes, contêm todos os aminoácidos (PELCZAR, CHAN & KRIEG, 2003).

Dentro deste contexto tem-se realizado trabalhos utilizando-se diversos microrganismos e várias matérias orgânicas visando-se à obtenção de proteínas que venham minimizar a desnutrição que assola o mundo. Segundo Rocha (2002), a levedura é o mais utilizado microrganismo na indústria, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida cientificamente. Esta espécie possui organismo microscópico de célula única, viva e tem as mesmas funções de qualquer outro ser vivo, respira, alimenta-se, excreta, dentre outras funções vitais (PELCZAR; CHAN & KRIEG, 2003).

A *Saccharomyces cerevisiae* apresenta membrana celular definida, pouco espessa em células jovens e rígidas em células adultas. Possui constituinte variável, com predominância de carboidratos e menor quantidade de proteínas e gorduras. Internamente delimitando o citoplasma, existe a membrana citoplasmática muito evidente em células adultas (DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO, 2010).

As leveduras são microrganismos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento desenvolvendo-se na fermentação alcoólica. A fermentação é um processo de liberação de energia que ocorre sem a participação do oxigênio (processo anaeróbio), compreende um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, liberando energia. A glicose é uma das substâncias mais empregadas pelos microrganismos como ponto de partida na fermentação, através da glicólise (TORTORA, 2010).

O processo fermentativo pode ser conduzido por processos descontínuos, descontínuos alimentados ou contínuos, ou ainda as variações desses processos. Os processos fermentativos descontínuos podem ser considerados sistemas fechados, exceto pela aeração e controle de pH e todo substrato é fornecido no início da fermentação. Uma das desvantagens da fermentação descontínua é que a formação de bioprodutos só ocorre em um determinado ciclo de fermentação o que diminui a produtividade se comparado com os outros tipos de processos que conseguem prolongar esse ciclo.

A bioconversão (ou biotransformação) refere-se a um conjunto de reações químicas através dos quais microrganismos convertem determinados compostos noutros produtos através da utilização de microrganismos que realizam reações químicas específicas, tipicamente usadas na transformação de biomassa (CORTEZ, 2005 apud PEREIRA JR; BON;

FERRARA 2008). Esse processo envolve uma ou mais reações enzimáticas nas quais microrganismos, no caso os fungos, transformam determinados compostos químicos em produtos com estruturas semelhantes. A bioconversão compreende processos como hidroxilação, desidrogenação, epoxidação, isomerização e transformações ao nível das ligações duplas (MOLINA, 2010).

Os processos de bioconversão mais usados são para a produção de esteróides, como, por exemplo, corticosteróides para o tratamento da artrite reumatóide, progesterona e estrogênio para a produção de contraceptivos, cortisona como anti-inflamatório bastante potente e síntese de vitaminas. A bioconversão apresenta inúmeras vantagens, sendo algumas delas de maior espectro de ação, por exemplo, por parte de antibióticos e redução das reações alérgicas (PEREIRA JR; BON; FERRARA, 2008).

A FSS também chamada de fermentação sólida ou em estado sólido tem se destacado nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento de diversos resíduos, principalmente na indústria de alimentos. De um modo geral, a FSS é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Estes materiais sólidos podem ser biodegradáveis ou não. Para a FSS, é necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface líquido-sólido (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997).

A FSS é definida por PANDEY (2003) apud GIONGO (2013) como um processo de fermentação que envolve matriz sólida realizada na ausência ou quase ausência de água livre, utilizando substratos úmidos o suficiente para suportar o crescimento de microrganismos.

Segundo processos no estado semissólido possuem algumas vantagens como:

- ✓ Menor necessidade de energia;
- ✓ Menor volume de águas residuais;
- ✓ Menor disponibilidade de atividade de água para possíveis contaminantes;
- ✓ O meio é geralmente simples, consistindo de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo;
- ✓ Baixo custo de esterilização devido a pouca água disponível;
- ✓ Como a maioria das bactérias requer altos níveis de mistura líquida, a FSS exclui, ou reduz, sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana;

- ✓ Geralmente, o único componente necessário a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de nitrogênio ou minerais possam ser adicionados.

Entretanto, esses sistemas possuem uma grande e principal desvantagem referente à dificuldade de ampliação do processo, em grande parte devido à transferência de calor e problemas de homogeneidade de cultura (SINGHANIA et al., 2009; MARTINS et al., 2011). Os tipos de microrganismos que podem ser usados são limitados, em função das condições do processo, tais como: baixa concentração de água livre. Os mais utilizados são fungos filamentosos e algumas leveduras (SANTOS, 2006).

Bolores e leveduras constituem a classe de microrganismos adequados para a FSS de acordo com a atividade de água requerida de 40% a 60%, sendo considerada estes teores inadequados para o crescimento de bactérias (SINGHANIA et al., 2009). Esses processos têm sido muito empregados na tecnologia de alimentos, e utilizam o metabolismo de microrganismos, ou produtos do metabolismo, para obtenção das transformações desejadas no substrato utilizado.

O emprego de resíduos agroindustriais como meio de cultura, tem sido valiosos substratos para FSS. Tais resíduos incluem polpa e casca de café, bagaço de cana, polpas e cascas de frutas, sabugo de milho e resíduos de processamentos industriais, como a Okara (MARTINS et al., 2011).

Rashad et al. (2010) usaram okara, resíduo que fica do processo de confecção de leite de soja, ou de outros leites vegetais, como substrato para FSS usando seis diferentes linhagens de leveduras GRAS (*Candida albicans* NRRL Y-12, *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281, *Pichia pinus* e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632). Todas as amostras fermentadas com cada uma das leveduras apresentaram maiores teores de proteínas e resíduo mineral, enquanto que o conteúdo de carboidratos, fibra bruta e lipídeos foram reduzidos.

Por outro lado, cabe salientar que quando se deseja direcionar os produtos da fermentação para a produção de alimentos, além do microrganismo utilizado possuir elevada atividade de β -glicosidase, o mesmo deve ser reconhecido como seguro (GRAS), livre de produção de toxinas, essa não é uma característica atribuída à muitas espécies de fungos filamentosos daí a escolha por leveduras ser mais freqüente entre as pesquisas.

A principal função requerida à um microrganismo envolvido no processo de fermentação aplicado à bioconversão é a síntese de enzimas que hidrolisam os componentes

alimentares. No entanto, segundo Nout e Kiers (2005) a fermentação ainda diminui fatores antinutricionais, bem como melhora a qualidade nutricional e digestibilidade do produto, atividade antioxidante e fatores sensoriais.

Diversos autores têm reportado diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como produtoras de enzimas β -glicosidase, cepas selvagens isoladas de mostos e de vinhos sicilianos (SPAGNA et al., 2002), cepas selvagens isoladas de processo de vinificação (HERNANDÉZ et al., 2003), *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de fermentos biológicos comerciais (MOORE et al., 2007), *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 (RASHAD et al., 2010).

A enzima β -glicosidase catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas formada entre o grupo hemiacetal (átomo de carbono que contém o átomo de oxigênio que promove a ligação de junção das duas moléculas) de uma aldose ou glicose, e o grupo hemiacetal do composto vizinho (BHATIA; MISHRA; BISARIA 2002 apud GIONGO 2013). A clivagem no terminal não redutor β -D-glicose promove a liberação de β -D-glicose (SUN et al., 2010 apud GIONGO, 2013). A β -glicosidase é obtida através do metabolismo de bactérias, fungos, plantas e animais e desempenham um papel central em muitos processos biológicos (HSIEH; GRAHAM, 2001). Entre suas diversas aplicações a β -30 glicosidase têm sido usada para hidrolisar compostos fenólicos e glicosídeos de fitoestrógenos para melhora da atividade biológica (YANG et al., 2009 apud GIONGO, 2013).

Em termos de digestibilidade, GIONGO (2013) observou em seu trabalho que a FSS possivelmente causou a melhora da qualidade sensorial do produto, apresentando contribuições para o desenvolvimento de uma desejável textura, sabor e aroma do produto, fornecendo ao okara, resíduo oriundo da indústria de leite de soja, uma potencial característica de matéria-prima para a fabricação em alimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os resíduos resultantes do beneficiamento das algas produzidos pela atividade econômica da cooperativa Mulheres de Corpo e Alga, antes e depois da utilização de processos fermentativos semissólidos com o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, em diferentes tempos e concentrações, com diferentes complementos nitrogenados, visando o melhoramento nutricional do mesmo.

3.2 Específico

- ✓ Identificar os teores de proteínas totais, carboidratos totais, umidade e cinzas em resíduos gerados a partir da extração do Ágar antes e depois de serem submetidos a diferentes tempos e concentrações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Adicionar compostos nitrogenados aos resíduos no intuito de promover enriquecimento nutricional dos mesmos, visando um aumento na concentração de proteínas;
- ✓ Avaliar a eficiência do resíduo modificado, em tempo de conservação, e um possível aumento dos minerais para o desenvolvimento de uma possível ração animal.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES DE PROTEÍNAS TOTAIS, CARBOIDRATOS TOTAIS, UMIDADE E CINZAS

4.1.1 Reagentes

- ✓ 500g de levedura de pão (fungo *Saccharomyces cerevisiae*);
- ✓ 2 L Ácido sulfúrico p.a.;
- ✓ 222 g do catalisador (sulfato de potássio (200g), sulfato de cobre pentahidratado (20g), selênio metálico (2g));
- ✓ 26,8g de fosfato de sódio dibásico p.a.;
- ✓ 50g de Tartarato de sódio e potássio p.a.;
- ✓ 40g de Hidróxido de sódio p.a.;
- ✓ 20 L de Água deionizada;
- ✓ 150g de Salicilato de sódio;
- ✓ 0,3g de Nitroprussiato de sódio;
- ✓ 500 mL de Hipoclorito de sódio;
- ✓ Sulfato de amônio
- ✓ 3 L de Etanol 80%

4.1.2 Vidrarias

- ✓ 2 Bandeja plástica grande;
- ✓ 1 Pinça;
- ✓ 4 Colheres;
- ✓ 10 bastões de vidro autoclavados;
- ✓ 2 Rolos de papel alumínio;
- ✓ 100 Frascos descartáveis com tampa;
- ✓ 1 Marca texto para identificação;
- ✓ 40 tubos para digestão;
- ✓ 3 Espátulas;
- ✓ 30 Balões volumétrico de 50 mL;
- ✓ 3 Balões volumétrico de 1000 mL;
- ✓ 50 Tubos de ensaio de 10mL;
- ✓ 5 Funis de vidro;
- ✓ 100 Papéis de filtro;
- ✓ 1 Pipeta automática de 1000 μ L;
- ✓ 5 Pipetas volumétrica de 5mL;
- ✓ 5 Pipetas graduada de 25mL;
- ✓ 1 Dessecador com sílica gel;
- ✓ 50 Cápsulas de porcelana de 8,5 cm de diâmetro;
- ✓ 1 Pinça para mufla.

4.1.3 Equipamentos

- ✓ 1 Luz branca (tipo para leitura);
- ✓ 1 Balança semi-analítica;
- ✓ 1 Autoclave vertical;
- ✓ 1 Câmara de fluxo laminar;
- ✓ 1 Estufa bacteriológica;
- ✓ 1 Estufa de secagem;
- ✓ 1 Liquidificador Walita;
- ✓ 1 Agitador Vórtex;
- ✓ 1 Bloco digestor com controle de temperatura;

- ✓ 1 Capela de exaustão;
- ✓ 1 Banho-maria;
- ✓ 1 Espectrofotômetro;
- ✓ 1 Mufla;
- ✓ 1 Chapa elétrica;

4.2 Coleta, transporte e limpeza dos resíduos

A metodologia de coleta usada pela (AMBA) basicamente utiliza-se estruturas flutuantes do tipo “long-lines”, onde o material consiste de cordas de polietileno e bóias flutuantes, sendo estas colocadas em mar aberto em áreas previamente delimitadas e estudadas (há aproximadamente 2 km da praia). O cultivo das algas marinhas com objetivos econômicos tem sido realizado com sucesso para várias espécies, seguindo metodologias com o tipo básico de cordas instaladas diretamente sobre o mar. Para este método de cultivo são utilizadas mudas (propagação vegetativa) que são inseridas em cordas e colocadas no mar para crescer.

As mudas mais volumosas e naturalmente limpas são coletadas do banco natural (de forma sustentável, ou seja, sempre deixando parte da alga em seu substrato para que a mesma possa crescer continuamente) no mesmo dia em que serão plantadas. Sendo levadas até o cultivo onde são amarradas de forma segura, ou então as mudas podem ser amarradas nas cordas antes de serem levadas até o cultivo (devendo ser hidratada sempre com água salina e mantida na sombra até que seja plantada). Elas podem ser colocadas nas cordas de duas maneiras: uma, é usando o fitilho (espécie de cordão resistente); e a outra é entre as extremidades da corda.

O manejo do cultivo acontece quinzenalmente em épocas de marés altas, estas marés são mais viáveis para realizar os trabalhos do cultivo, tornando mais fácil o acesso ao plantio. A manutenção se dá com a reposição de mudas que forem perdidas devido à ação das correntes marítimas ou de embarcações que trafegam descuidadamente; verificação do estado das bóias e cordas, para evitar a poluição do mar; limpeza manual de mudas, cordas, estacas e bóias para retirada de plantas e animais incrustados, além de sedimentos que se depositam no talo das algas; correção do posicionamento das estruturas que se deslocam com a ação da dinâmica da maré.

As mudas são plantadas com um peso aproximado de 50g (a padronização o peso é importante para se obter uma produção mais rápida e homogeneia), sendo colhidas entre 60 a 90 dias.

Depois de colhidas, as algas são lavadas postas para serem secadas, em um tipo de secador solar artesanal (giral, feito a partir de estacas, ripas e cobertos por telas). Quando já estão secas, elas devem ser “batidas” para a retirada de outras algas ou lama que geralmente enrolam-se entre elas. Seguindo esse processo, as algas são ensacadas e armazenadas em lugar seco, até o momento da comercialização ou de seu aproveitamento para fabricação de seus derivados, como cosméticos e alimentos (ver figuras 11 e 12).

Após a coleta da alga no mar, em maré baixa, essas foram transportadas até a estação de beneficiamento, localizada na comunidade da Barrinha, onde foram retiradas as impurezas, como partículas sólidas, capim agulha entre outros detritos e essas são lavadas com água de chuva estocada (quando disponível) ou água da rede de abastecimento (CAGECE).

Após serem lavadas, as algas foram imersas em suco de limão (três limões para cada 8 Kg de alga) deixado agir por três minutos para que o ácido cítrico consiga descolorir, limpar e facilitar a retirada do Ágar pelo calor (ver figura 7 a seguir). Só então foi colocada para secar ao sol em tanques de secagem por 24 horas, quando ela muda de cor, de vermelha para amarela esbranquiçada (ver figura 8).

Ao secarem as algas foram colocadas em grandes panelas de alumínio e adicionada água e posta no fogão para fervura. Durante o processo de fervura, o Ágar se desprende da alga, subindo junto com a água que, ao esfriar, endurece como gelatina (ver figura 9). As figuras mostram os secadores construídos no laboratório de beneficiamento das algas e a secagem feita durante o curso ofertado às mulheres da comunidade pela Fundação Brasil Cidadão, logo após a coleta.

Figura. 4- Secadores utilizados para depositar as algas assim que chegam da colheita. PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2013).

Figura. 5-Primeira secagem das algas (Março/2003). PMCA, Icapuí-CE.

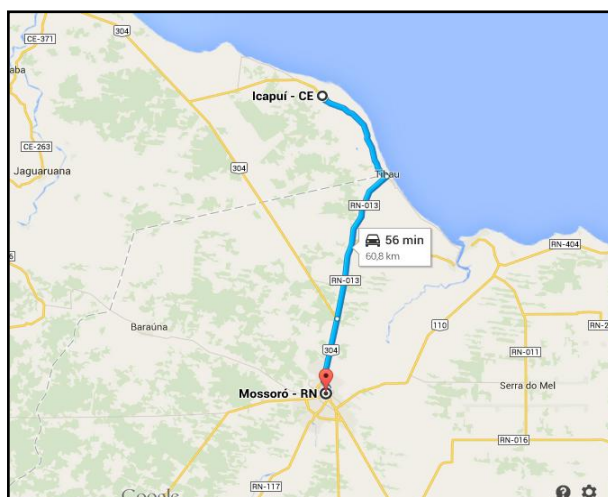


Fonte: Arquivos do PMCA, Icapuí-CE.

Desse procedimento, o que sobra na panela é o resíduo (figura 10). Para cada 100g de algas, utilizou-se 10 litros de água gerando 25 g de Ágar.

Após a fabricação do resíduo ele foi imediatamente congelado sob o risco de degradação por microrganismos, pois ainda apresenta uma considerável quantidade de carboidratos. Em seguida foram trazidos para a UERN, LABBIO-II, em Mossoró-RN, a 66,2 Km de Icapuí-CE (ver figura 6 abaixo).

Figura 6: Distância e acesso entre os municípios de Mossoró-RN e Icapuí-CE.



Fonte: Google maps (2014).

Figura 7- Beneficiamento das algas-limpeza com limão. PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2014).

Figura 8- Beneficiamento das algas- secagem nos secadores. PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2014).

Figura 9- Beneficiamento das algas - ágar extraído das algas.PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2014).

Figura 10- Beneficiamento das algas- resíduo produzido a partir da retirada do ágar. PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2014).

Figura 11- Beneficiamento das algas- produção dos mousses para merenda escolar. PMCA, Icapuí-CE.



Fonte: O autor (2014).

Figura 12- Beneficiamento das algas- produção de produtos de higiene pessoal. PMCA, Icapuí-CE.



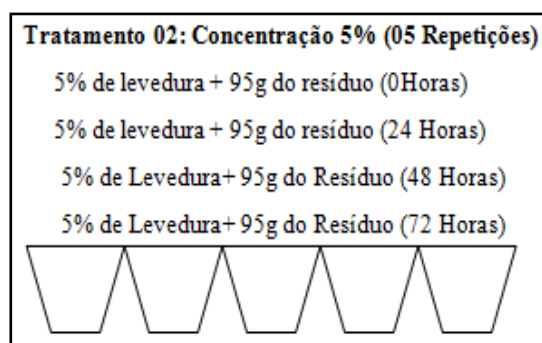
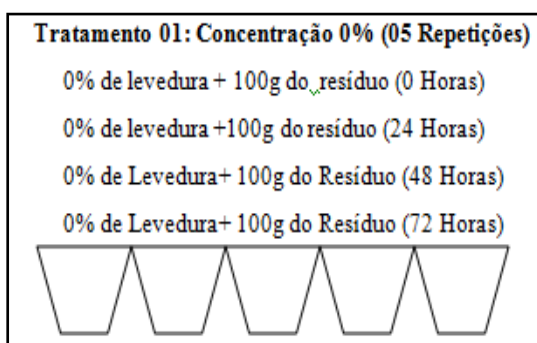
Fonte: O autor (2014).

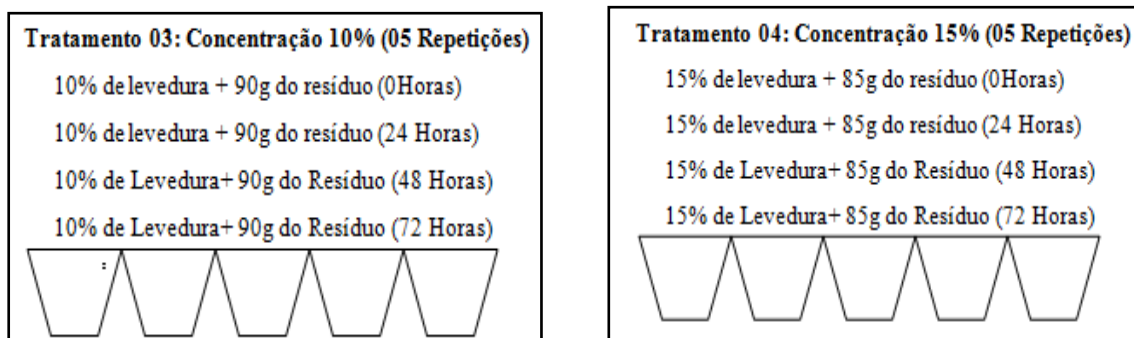
4.3 ETAPA 1

4.3.1 Preparo dos resíduos

Os resíduos foram levados até o LCTV, na FANAT, onde foram descongelados e feito uma triagem de todas as impurezas visíveis (capim agulha, sementes de limão, pedaços de algas, cabelo, etc.), com ajuda de uma pinça. O resíduo foi pesado em balança semi-analítica modelo QUIMIS (Figura 14) em frascos cobertos com papel alumínio devidamente identificados de acordo com a concentração de leveduras determinadas no modelo de delineamento experimental proposto (Figura 13). Foram postas para a esterilização em autoclave vertical, modelo TECNAL a 121° C por 15 minutos para eliminação de qualquer agente microbiano contaminante. Após a autoclavagem, os frascos foram retirados do aparelho e expostos para atingir a temperatura ambiente (25° C).

Figura 13- Delineamento experimental da etapa 1 da pesquisa.





Fonte: O autor (2015).

Figura 14- Pesagem em balança semi analítica dos resíduos nos frascos para fermentação. LABBIO II, UERN.



Fonte: O autor (2013).

4.3.2 Inoculação das leveduras e preparo da farinha

Após os frascos atingirem temperatura ambiente, foram colocados em câmara de fluxo laminar onde foram adicionadas as leveduras. O microrganismo utilizado para o processo de bioconversão do resíduo de alga foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, prensada, do tipo comercial fermento biológico fresco, com umidade de 53,54% (base úmida) e teor médio de proteína bruta de 31,44% (base seca).

Misturou-se bem o conteúdo com auxílio de um bastão de vidro também esterilizado até formar uma massa homogênea de cor uniforme. Foram 20 frascos com 95g do resíduo autoclavado+5g da levedura, 20 frascos com 90g do resíduo autoclavado+10g de levedura, 20

frascos com 85% do resíduo autoclavado+15g de levedura e, como grupo controle, 20 frascos contendo somente 100g do resíduo autoclavado. Os frascos foram tampados novamente com o papel alumínio e postos em estufa bacteriológica à 36°C. Dos 20 frascos de cada tratamento, 5 foram colocados na estufa de secagem, a uma temperatura de 100° C, já sem a tampa de alumínio, logo após a homogeneização; 15 foram para a estufa bacteriológica à 36°C. Com 24h, foram retirados 5 frascos, com 48h foram retirados mais 5 frascos e, finalmente com 72h foram retirados os 5 últimos frascos e foram colocados em estufa de secagem sem a tampa de alumínio até a secagem completa do produto.

Quando estavam bem secas, as amostras foram processadas em liquidificador até formar um pó fino que foi empregado na análise de proteínas e carboidratos. Essa etapa tem o objetivo de determinar qual o melhor tempo de exposição e a melhor concentração de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) necessários para aumentar o percentual de proteína total da amostra.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

A digestão das proteínas foi feita através do método de *Kjeldahl*, (AOAC,1996), e convertido em porcentagem de proteína em base seca, empregando-se o fator de conversão 6,25 *Kjeldahl* (AOAC, 1996). Essa técnica ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações (VOGEL & TODARO, 1997) e possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional (YASUHARA E NOKIHARA, 2001 apud GALVANI E GAERTNER, 2006).

O método de caracterização das proteínas é representado em duas etapas: mineralização (método *Kjeldahl*) e fotolorimetria (método de Baethgen e Alley (1989)). Na mineralização ou digestão ocorre a conversão do nitrogênio orgânico em íon amônio e na fotolorimetria esse íon amônio é quantificado.

Para a digestão foram pesados 0,02 g da amostra e 1,1g do catalisador. Com o bloco digestor dentro da capela de exaustão, foram encaixados os tubos de ensaio e adicionado 1,5 mL do ácido sulfúrico concentrado e a capela foi ligada e fechada. O tempo de digestão é

muito relativo, podendo variar de acordo com o aparelho e a natureza da amostra, porém a digestão aconteceu entre 40 e 45 minutos quando a amostra apresentou-se verde translúcida.

Foram marcados 15 minutos e desligado o bloco, deixando as amostras esfriarem. Em seguida, o balão volumétrico foi utilizado para aferir as amostras digeridas com água deionizada. Primeiro colocou-se um pouco da água deionizada no balão volumétrico para amenizar a temperatura e evitar que o balão volumétrico trinque, pois o nitrogênio dissolvido no ácido sulfúrico atinge uma temperatura extremamente alta. Transferiu-se a amostra digerida para o balão volumétrico com a água e aferiu-se com água. Homogeneizou-se a amostra até ficar translúcida. A amostra com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador acelera a oxidação da matéria orgânica (GALVANI & GAERTNER, 2006).

Na fotocolorimetria, foram preparadas três soluções A, B e C. A solução A é composta por fosfato de sódio dibásico (26,8g), tartarato de sódio e potássio (50g), hidróxido de sódio (40g) e água deionizada até completar 1000 mL. A solução B é feita com salicilato de sódio (150g) e nitroprussiato de sódio (0,3g) e água deionizada até completar 1000 mL.

A solução C é uma diluição feita a partir de uma solução de hipoclorito de sódio 5,25%. Pegou-se 10 mL dessa solução e diluiu-se em água deionizada até completar 100 mL.

Vale salientar que a solução C só deverá ser preparada na hora do uso. A curva padrão foi construída com uma solução padrão de sulfato de amônio (0,11798g) diluída em solução diluente (composto por 22 g de catalisador ; 61,1 mL do ácido sulfúrico e água deionizada até completar 1000mL). Os tubos de ensaio foram agitados com ajuda do vórtex. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e contabilizados 15 minutos em banho-maria 37° C.

A leitura foi feita em espectrofotômetro a 650nm com cubeta de plástico. A quantidade de nitrogênio nas soluções é calculada sabendo que em 1g de sulfato de nitrogênio existe 212mg de nitrogênio. Logo, em 0,11798g de sulfato de amônio diluídos em 100 mL do diluente existem 25,012mg de nitrogênio. Então, em cada 10µg de solução padrão temos 0,0025mg ou 2,5016µg/µL. Para calcular a porcentagem de proteína total, calculou-se antecipadamente o fator de correção a partir do gráfico de linha de tendência, utilizou-se a fórmula:

$$F = \frac{\Delta x}{\Delta y}$$

A partir daí, calculou-se o percentual de proteína da amostra:

$$P\% = \frac{A.F.Vd(mL).6,25}{Ve(\mu L).Pa(g).10}$$

Onde:

A= Absorbância

Ve=Volume do digerido utilizado no ensaio (geralmente 50 ou 100µL)

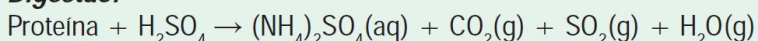
Vd=Volume de diluição do digerido (10, 50,100 ou 250 mL)

Pa= Peso da amostra(g)

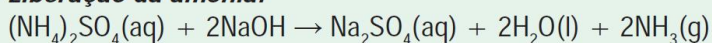
As reações químicas que se passam durante o processo da determinação dos compostos nitrogenados podem ser assim resumidas (Silva, 1990):

Figura 15- Reações envolvidas no método de *Kjerdahl*.

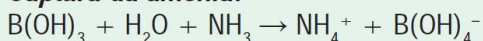
Digestão:



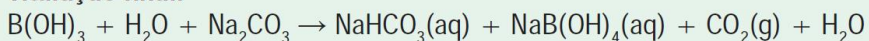
Liberação da amônia:



Captura da amônia:



Titulação final:



Fonte: <http://www.quimica.com.br>. Acesso em: 12/12/14.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS (AST)

As análises foram feitas de acordo com Dubois et al.(1956) e baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres

com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável.

Pesou-se 0,5 g da farinha do fermentado e macerou-se o material em etanol a 80% aquecido previamente a 65°C durante 10 minutos. Colocou-se o macerado para filtração em papel, com ajuda de um funil colocado dentro de um balão volumétrico de 50 mL. Filtrou-se e aferiu-se o balão com o etanol à 80%, aquecido à 65°C.

Dessa solução 1, retirou-se 500 µL que foi transferido para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Logo após, agitou-se a amostra em vórtex e, em seguida, manteve-se em repouso durante 45 a 60 minutos, foi observado a separação de fases, compostas por pigmentos no fundo do tubo e carboidratos dissolvidos em meio aquoso na parte superior. Realizou-se a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 485 nm. Os resultados foram relacionados à equação da curva padrão de sacarose a 1%.

De acordo com os rendimentos previamente obtidos calculou-se a concentração de carboidratos solúveis totais em mg.g^{-1} de matéria seca.

4.6 ETAPA 2:

Os resíduos foram novamente descongelados, desta vez já limpos, foram então pesados em balança semi-analítica modelo QUIMIS em frascos cobertos com papel alumínio devidamente identificados de acordo com a melhor concentração de leveduras e o melhor tempo obtido na etapa 1.

Após a pesagem foi feita a esterilização, para eliminação de qualquer agente microbiano contaminante respeitando os tratamentos propostos na pesquisa através do delineamento experimental descrito na figura 17 (Ver adiante).

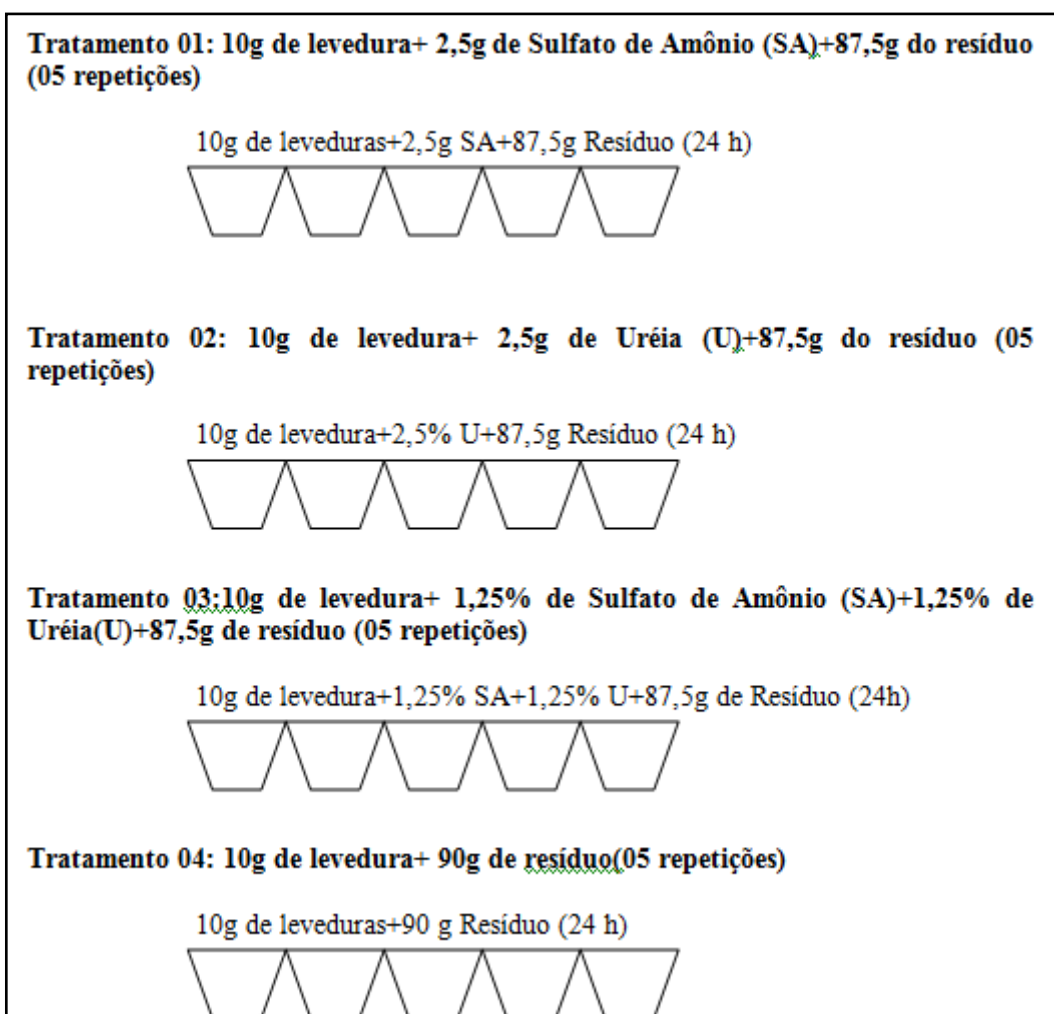
Após a pesagem, os frascos foram tampados com papel alumínio, identificados e levados a autoclave vertical modelo TECNAL a 121° C por 15 minutos. Após a autoclavagem, os frascos foram retirados e deixados esfriar a temperatura ambiente (25° C). O delineamento experimental e o esquema de distribuição dos suplementos nitrogenados segue a organização da figura adiante:

Figura 16- Distribuição das amostras da etapa 2 do projeto.



Fonte: o autor (2014).

Figura 17- Delineamento experimental da etapa 2 do projeto.



Fonte: O autor (2014).

4.6.1 Inoculação das leveduras associadas a compostos nitrogenados

Após os frascos atingirem temperatura ambiente, foram colocados em câmara de fluxo laminar onde foram adicionadas as leveduras. Misturou-se bem o conteúdo com auxílio de um bastão de vidro também esterilizado até formar uma massa homogênea e de cor uniforme.

Foram 25(vinte e cinco) frascos de vidro com tampa de papel alumínio ao todo, foram feitos em quintuplicata sendo que, em 5 (cinco) foram colocados 100g do resíduo autoclavado, esse é o grupo controle (Co); em 5(cinco) foram colocados 90g do resíduo autoclavado+10g da levedura (controle comparativo sem suplemento nitrogenado), 5 (cinco) frascos com 87,5g do resíduo autoclavado+10g de levedura+2,5g de sulfato de amônio p.a.; 5 (cinco) frascos com 87,5g do resíduo autoclavado+10g de levedura+2,5g de Ureia e, por último, 5(cinco) frascos contendo somente 87,5g do resíduo autoclavado+ 1,25g de sulfato de amônio+ 1,25g de ureia.

Dos 25(vinte e cinco) frascos de cada tratamento, 5 (cinco) que só continha o resíduo (Co) foram colocados na estufa de secagem, já sem a tampa de alumínio, logo após a homogeneização, os demais foram para a estufa bacteriológica calibrada em 36°C. Com 24h, foram retirados os 20 (vinte) frascos da estufa bacteriologia, tirados a tampa de alumínio e levados para a estufa de secagem a 100°C até a secagem completa do produto.

Após secagem, as amostras foram processadas em liquidificador, até formar um pó fino que foi empregado na análise de proteínas e carboidratos, além das análises de umidade e cinzas. Essa etapa tem o objetivo de determinar se a suplementação nitrogenada ajuda no processo de enriquecimento protéico e qual o melhor suplemento nitrogenado entre os que foram testados.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

A digestão de proteínas totais foi feita pelo método de *Kjerdhal* (AOAC, 1985) e a quantificação pelo método de Baethgen e Alley (1989). foi desenvolvida semelhante à primeira etapa, utilizando os mesmos materiais e equipamentos e o mesmo procedimento experimental no intuito de avaliar as proteínas totais resultante do processo fermentativo associado a suplementos nitrogenados.

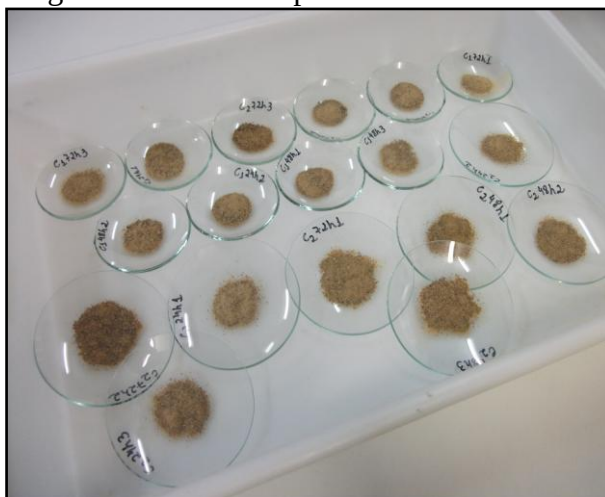
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS

A análise de carboidratos totais, pelo método de *Dubois* foi desenvolvida semelhante à primeira etapa, utilizando os mesmos materiais e equipamentos e o mesmo procedimento experimental no intuito de observar o teor de carboidratos que existe nesse resíduo, antes e após a fermentação.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE UMIDADE

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. Geralmente, a umidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em: Umidade de superfície, que refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada, e umidade adsorvida, referente à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo (ADOLF LUTZ, 1985). Na figura abaixo, a distribuição da farinha, em vidro de relógio para ser colocada em estufa de secagem.

Figura 18- Amostras para teste de umidade



Fonte: O autor (2014).

A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Na realidade, não é somente a água a ser removida, mas outras substâncias que se volatilizam nessas condições (ADOLF LUTZ, 1985).

O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual. Amostras de alimentos que se decompõem ou iniciam transformações a esta temperatura, devem ser aquecidas em estufas a vácuo, onde se reduz a pressão e se mantém a temperatura de 70°C (ADOLF LUTZ, 1985).

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar a estocagem, pois alimentos estocados com alta umidade irão deteriorar mais rapidamente que os que possuem baixa umidade, além de danificar a embalagem e expor com o tempo o alimento. O conhecimento do teor de umidade das matérias primas é de fundamental importância na conservação e armazenamento, na manutenção da sua qualidade e no processo de comercialização (ANTONIO, 2002).

Segundo Rocha (2010), para que aja uma atividade ótima do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e dessa forma o processo de bioconversão seja otimizado o resíduo deverá estar com uma umidade entre 75% e 95%.

4.9.1 Procedimento experimental

Pesou-se de 2g da amostra em cápsula de porcelana, previamente tarada. Essa foi aquecida durante 3 horas. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e depois pesou-se. Repetiu-se esse procedimento de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo:

$$\frac{100 \cdot N}{P}$$

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra

4.10 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE CINZAS

O método consiste em tratar o resíduo por incineração e transformá-lo em cinzas. Cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a (550-570)°C. Cinzas de um alimento é o nome dado ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, entre 550 – 570°C, a qual é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, assim sendo, a cinza de um material é o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Estes minerais são analisados tanto para fins nutricionais como também para segurança (ADOLF LUTZ, 1985).

A cinza é constituída principalmente de macronutrientes como: K, Na, Ca, P, S, Cl e Mg; micronutrientes como: Al, Fe, Cu, Mn e Zn; e elementos traços: Ar, I, F, Cr, Co, Cd entre outros (SILVEIRA, 2013).

Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento. Geralmente, as cinzas são obtidas por ignição de quantidade conhecida da amostra. Muitas vezes, é vantajoso combinar a determinação direta de umidade e a determinação de cinzas, incinerando o resíduo obtido na determinação de umidade (ADOLF LUTZ, 1985).

4.10.1 Procedimento experimental

Foram pesadas 5g da amostra em uma cápsula de porcelana previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente, pesada e anotado o valor. As cápsulas foram levadas a mufla em uma temperatura de 550° C durante 2 horas.

As cinzas devem ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente foi pesado. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo:

$$\frac{100 \cdot N}{P}$$

N = nº de g de cinzas

P = nº de g da amostra

4.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Na etapa 1, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e a diferença entre as médias de cinco repetições experimentais foi determinada através do Teste de *Tukey*, em esquema fatorial ao nível de significância de $p < 0,01$. O software utilizado foi o ASSISTAT® versão 7.7.

Na etapa 2, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e a diferença entre as médias de cinco repetições experimentais foi determinada através do Teste de *Tukey*, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) ao nível de significância de $p < 0,01$. O software utilizado foi o ASSISTAT® versão 7.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa foram feitas as análises de proteínas totais pelo método de *Kjedahl* no resíduo *in natura* e após FSS, nas quatro diferentes concentrações (0% (C0); 5% (C1); 10% (C2) e 15% (C3)) submetidas à quantidade de tempo diferente de exposição (0 h; 24h; 48h e 72h). Cruzando os fatores estatisticamente observamos que houve diferença entre as concentrações C0 (grupo controle), C1 (5%) em relação a C2(10%) e C3 (15%), pois o fator 1 (concentração) apresentou-se significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Porém, estatisticamente não houve diferença entre os tempos propostos e não houve significância também em relação à interação fator concentração e fator tempo.

Os dados percentuais de proteínas totais das amostras da primeira etapa apresentam-se na tabela abaixo:

Tabela 1: Percentual de proteínas totais no resíduo submetido à fermentação por diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*, em diferentes tempos de exposição.

	0h	24h	48h	72h
C0	16, 89c	16, 97c	14, 84c	17, 31c
C1	16, 36b	53, 15b	56, 30b	54, 42b
C2	16, 85a	71, 57a	71, 74a	66, 88a
C3	16, 85a	67, 31a	66, 88a	68, 59a

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2014).

Observou-se que houve aumento do percentual protéico, que, estatisticamente apresentou diferença entre as concentrações Co (sem a levedura), as concentrações C1 (com 5% da levedura) e as concentrações C2 (10%) e C3 (15%) que, estatisticamente não apresentou diferença entre si.

A tabela 2 apresenta os valores das médias para o fator concentração, de acordo com o teste de Tukey para $p < 0,01$:

Tabela 2: Valores médios de Proteínas totais em função da diferença de concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (fator 1) na etapa 1.

<i>S. cerevisiae</i> m/m	PT mg g ⁻¹ MS
0	16,38 c
5	54,62 b
10	70,07 a
15	67,88 a
CV(%)	5,61

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2014).

Pode-se afirmar que, numericamente, entre as concentrações trabalhadas, os maiores percentuais de proteínas foram nas C2 e C3. Estatisticamente, as duas maiores concentrações não apresentaram significativa diferença, portanto, priorizou-se a menor concentração, pois menos material fúngico seria utilizado para a realização da segunda etapa da pesquisa. Para a segunda etapa, todas as amostras tiveram uma concentração de *Saccharomyces cerevisiae* à 10%.

Já quando se trata do tempo de fermentação, este não apresentou diferença significativa estatisticamente, o que nos fez escolher o menor tempo de fermentação, o de 24 horas, ou, de acordo com a tabela 3, o tempo 1, pois o mesmo apresentou resultados mais rápidos, com menos gasto de energia elétrica (menor tempo de estufa).

Tabela 3: Valores médios do tempo de exposição do resíduo à *Saccharomyces cerevisiae* na etapa 1 .

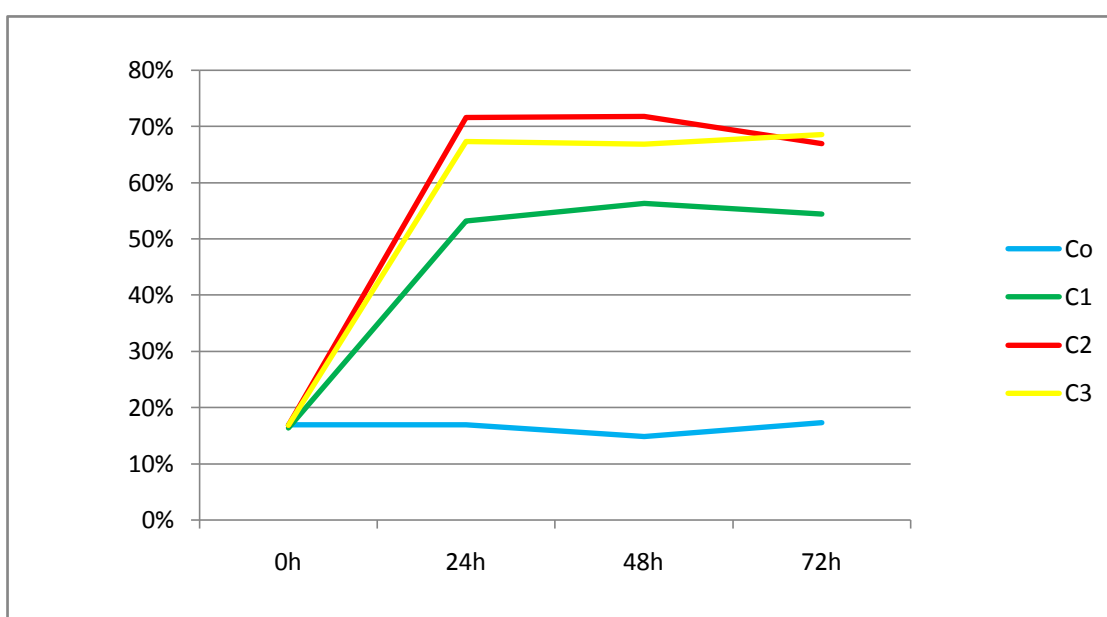
Tempo (h)	PT mg g ⁻¹ MS
24h	52.25391 a
48h	52. 65913 a
72h	51.80601 a
CV(%)	5,61

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2014).

O gráfico 1 mostrou o comportamento entre as concentrações das proteínas totais das amostras em diferentes concentrações de levedura, no decorrer dos tempos de exposição à levedura.

Gráfico 01: Concentração percentual das proteínas totais utilizando diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* para enriquecimento protéico em resíduos de algas



Fonte: O autor (2014).

Observou-se que, em todas as concentrações, mesmo que discretamente o pico maior de concentração das proteínas encontra-se no tempo de 24 horas e que a concentração de 10% (C2) da *Saccharomyces cerevisiae* foi a que apresentou um maior percentual de proteínas totais, sendo que, considerando o tempo de 24 horas houve um aumento de 4 vezes o valor inicial (em comparação ao resíduo *in natura*) da proteína na concentração de 10% (C2). Desta forma foi escolhido o tempo de 24h e a concentração de 10%(C2) para o enriquecimento com compostos nitrogenados na etapa 2.

Observou-se que na primeira etapa, os valores das proteínas totais, a concentração e o tempo de maior teor protéico apresentou-se condizente com o trabalho de Holanda et al. (1998), que fez a FSS utilizando pedúnculo de caju e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com uma inoculação de até 10% na pasta úmida do caju (suco + bagaço) e períodos de fermentação de até 72 horas. Estes concluíram que o tempo ideal para a fermentação foi de 24 horas e proporcionou um teor protéico acima de 20% no material fermentado, viabilizando um concentrado protéico similar à torta de algodão.

Campos et al. (2003) estudaram o enriquecimento protéico utilizando apenas o bagaço do pedúnculo do caju por FSS verificaram que o tempo de fermentação necessário para a máxima conversão dos carboidratos solúveis do bagaço foi em torno de 24 horas, corroborando com o trabalho de Holanda et al. (1998) e com o presente trabalho. Eles obtiveram aumento protéico, depois do processo fermentativo, de 2,5 vezes o bagaço de caju “*in natura*”, já o aumento protéico do presente trabalho foi de 4,0 vezes o valor inicial de proteína do resíduo das algas “*in natura*”.

Nessa primeira etapa, além do comparativo dos valores de proteínas, foram feitas também as análises de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) no resíduo *in natura* e após ser fermentado. Os carboidratos totais foram feitos nas mesmas variações de concentração e tempo de exposição à levedura para proteínas totais: (0% (C0); 5% (C1); 10% (C2) e 15% (C3)) e submetidas à quantidade de tempo diferente de exposição (0 h; 24h; 48h e 72h). Os dados numéricos em percentuais de carboidratos estão na tabela 4:

Tabela 4: Valores de carboidratos solúveis totais no resíduo submetido à fermentação por diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes tempos de exposição (mg/mL).

	0 h	24h	48h	72h
C0	71,12ab	70,45ab	70,56ab	71,87ab

C1	282,37c	21,33c	36,62c	31,62c
C2	307,25bc	47,45bc	22,91bc	54,08bc
C3	353,50a	71,62a	50,62a	86,37a

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2014).

Cruzando os fatores estatisticamente observou-se que houve diferença entre as concentrações C0 (grupo controle), C1 (5%), C2(10%) em relação a C3 (15%), pois o fator concentração apresentou-se significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). Numericamente e estatisticamente pode-se observar que a quantidade inicial de carboidratos solúveis total (AST) apresenta-se alta em relação às concentrações C1 e C2. Porém, em relação a C3 ela é estatisticamente irrelevante. A grande concentração de carboidratos solúveis totais na amostra controle (Co), mesmo após a retirada do ágar se dá devido a grande concentração de carboidratos encontrados naturalmente nessa espécie de alga. No entanto, devido a bioconversão de carboidratos para proteínas devido ao aumento da biomassa fúngica, essa concentração diminuiu nas concentrações C1 e C2.

Ao comparar com a concentração C3, o teor de carboidratos aumenta novamente, corroborando a ideia de que a massa fúngica tenha chegado ao seu ápice de crescimento microbiano (fase log) na concentração C2 e, portanto pode estar havendo competição por nutrientes, por espaço ou deficiência nutricional fazendo com que a cultura fúngica entre na fase estacionária e, posteriormente, a fase de morte celular ou declínio.

Já entre C1 e C2 foi observado que, numericamente, houve um discreto aumento do valor das médias, como pode ser observado na tabela a seguir:

Tabela 5: Valores médios de AST em função da diferença de concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (Fator 1) na etapa 1.

<i>S. cerevisiae</i> m/m	AST mg g ⁻¹ MS
0	11,45 ab
5	5,96 c
10	8,29 bc
15	13,90 a
CV(%)	18,11

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras.

A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2014)

Para o tempo de exposição à levedura, observou-se estatisticamente que os mesmos não apresentaram significância entre eles quando considerado o teste de Tukey, com $p < 0,01$ como observou-se as médias. Diante disso, o melhor tempo para o teor de carboidratos solúveis totais é 72h. Isso pode ser explicado devido à fase na qual se encontra o cultivo fúngico. Possivelmente com esse tempo a cultura fúngica esteja em declínio por competição, por escassez nutricional ou por limitação espacial, o que pode justificar o aumento na concentração de carboidratos solúveis do meio residual sendo “confundido” com os carboidratos solúveis totais advindos da própria massa fúngica.

Segundo Rose & Harrison, (1970) apud Pádua (1996) e Scarinci et al. (1990), os carboidratos representam de 15 a 60 % do peso seco das leveduras, sendo representados em média por, 27 % de glucanas, 21 % de mananas, localizados na parede celular, 12 % de glicogênio e, 33 % de trealose, carboidratos de reserva energética. A tabela 6 a seguir mostra os valores das médias encontradas para concentração de carboidratos solúveis totais (AST) em mg.g^{-1} de amostra, nos diferentes tempos propostos e nas diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 6: Valores médios de AST em função dos diferentes tempo de exposição à *Saccharomyces cerevisiae* (Fator 1) na etapa 1.

Tempo h	AST mg g^{-1} MS
24	3,05 a
48	2,82 a
72	3,29 a
CV(%)	18,11

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras.
A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2014)

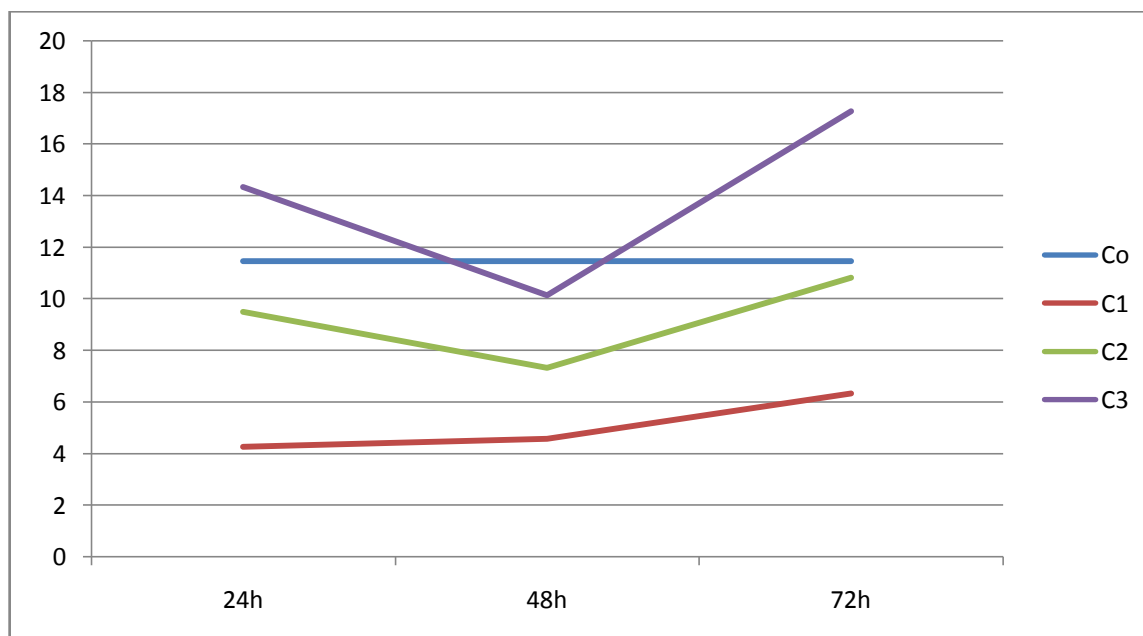
O maior valor da concentração de carboidratos em 72h pode ser comparado com o valor protéico do mesmo resíduo que apresentou-se inferior no que diz respeito ao teor de

proteínas da concentração, caracterizando um declínio. Esse resultado pode ser atribuído ao decréscimo na produção de proteínas totais através da bioconversão pelas leveduras. Com 72 horas, o cultivo fúngico pode estar em declínio e os fungos podem não estar mais convertendo carboidratos em biomassa fúngica e, o aumento da concentração de carboidratos pode ser consequência de morte celular fúngica devido às condições limitantes do meio de cultivo, podendo ser desde uma limitação espacial até a escassez de algum componente essencial para a sobrevivência das leveduras (TORTORA, 2010).

O gráfico 2 mostra as diferentes concentrações de carboidratos totais entre as diferentes concentrações das amostras. Observou-se que houve diminuição na concentração dos carboidratos, e todas as concentrações tiveram uma diminuição numérica com 48 horas.

Foi observado que todas as concentrações estudadas apresentaram um gráfico semelhante, em termos de concentração de carboidratos solúveis totais por tempo de exposição à levedura.

Gráfico 02: Concentração de Carboidratos solúveis totais (AST) em mg/mL utilizando diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* para enriquecimento protéico em resíduos de algas.



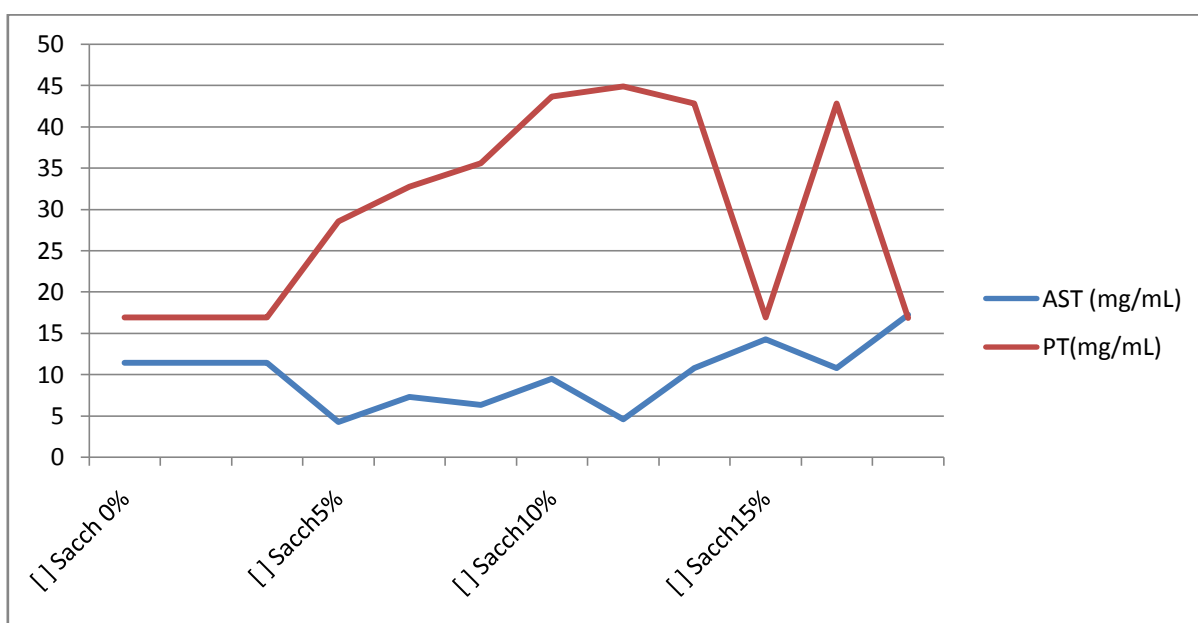
Fonte: Dados do autor (2014).

Araújo et al. (2008), avaliando o valor maximizado para Energia bruta (EB) em palma forrageira encontrou que, após a FSS a EB foi de 3991kcal/g, equivalente ao aumento de 2%

em relação ao teor de EB da palma forrageira *in natura*. Esse aumento significou que a palma possui carboidratos, principalmente monossacarídeos, na sua composição química, que podem ser utilizados pelas leveduras no processo de fermentação, além de ser considerada uma das principais fontes de calor e energia. No entanto, o mesmo trabalho observou que não foram detectadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os teores de energia bruta da palma forrageira nas concentrações de inóculos estudadas. Apesar de a levedura utilizar os carboidratos para síntese de proteínas, não houve redução no valor energético do bioproduto.

Comparando os dados referentes ao comportamento protéico nessas mesmas amostras, observou-se no gráfico 3 que, à medida que a proteína aumenta em concentração, os carboidratos estão diminuindo, porém muito sensivelmente em termos numéricos. Isso pode ser observado até as 48h de exposição à levedura, o que corrobora a ideia de que as leveduras estão consumindo os carboidratos para produção de biomassa, uma vez que as próprias células leveduriformes são fontes de proteínas.

Gráfico 3: Concentração de Carboidratos solúveis totais e proteínas totais em mg/mL utilizando diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* para enriquecimento protéico em resíduos de algas.



Fonte: Dados do autor (2014).

Um dos fatores que pode ter ajudado na interação microrganismo-substrato para otimizar a fermentação é a quebra dos compostos contidos no resíduo através do calor úmido, utilizando o autoclave. Em muitos casos, os substratos usados na FSS podem ser hidrolisados

ou parcialmente hidrolisados através do uso de métodos físicos, químicos ou enzimáticos, facilitando assim a ação microbiana (KURBANOGLU, 2001 apud ALBUQUERQUE, 2003). O calor no processo de autoclavagem foi estudado no trabalho de GIONGO, 2013 que, observando apenas o tempo inicial (0 hora), comparou a variação de isoflavonas agliconas em amostras não-autoclavadas e autoclavadas antes da fermentação pela *Saccharomyces cerevisiae*. foi possível notar que, nas amostras sem autoclavagem a concentração inicial da isoflavona aglicona é baixa e à medida que a fermentação ocorreu, essa concentração teve um aumento gradativo, devido à bioconversão. Já para amostras autoclavadas a concentração inicial da forma isoflavona aglicona aproximou-se a concentração máxima obtida, em relação ao teor de agliconas nas amostras brutas fermentadas. Essas características indicam que o processo de autoclavagem foi um dos fatores responsáveis pela bioconversão das isoflavonas.

Na segunda etapa foram feitas as análises de proteínas totais, sendo a digestão feita pelo método de *Kjeldahl* (AOAC, 1985) e a quantificação feita pelo método Baethgen e Alley (1989). O resíduo *in natura* foi analisado após o processo fermentativo associado a uma fonte de nitrogênio visando uma maior conversão protéica.

Foram utilizados os compostos nitrogenados sulfato de amônio p.a. a 2,5% no C2; ureia p.a. a 2,5% no C3e uma mistura contendo 1,25% de Sulfato de amônio e 1,25% de ureia no C4, todos associados a 10% de *Saccharomyces cerevisiae*, em um tempo de 24 horas. Numericamente, os resultados mostraram um aumento protéico na amostra suplementada com ureia, em relação as demais amostras como pode-se ver na tabela abaixo:

Tabela 7: Percentual de proteínas totais no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de *Saccharomyces cerevisiae* em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio.

Amostra	24h
C0(<i>in natura</i>)	10,55%
C1(Sac)	15,48%
C2(Sac+SA)	40,96%
C3(Sac+U)	112,42%
C4(Sac+SAU)	77,49%

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia.

Fonte: Dados do autor (2015).

Foi observado que o percentual protéico aumentou em relação ao resíduo in natura e que a ureia exclusivamente teve um melhor desempenho numericamente, ao ser comparado com o sulfato de amônio exclusivamente e até em associação com a ureia, em menores proporções.

O teste estatístico foi feito em DIC, com cinco repetições sendo que os tratamentos apresentaram-se com diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). A média dos tratamentos dessa segunda parte apresenta-se na tabela a seguir:

Tabela 8: Valor das médias das concentrações de proteínas totais entre os tratamentos suplementados com compostos nitrogenados na etapa 2.

Amostras	PT mg g ⁻¹ MS
Co(<i>in natura</i>)	0,06930 d
C1 (Sac)	10,16268 d
C2(Sac+SA)	26,89168 c
C3(Sac+U)	73,80002 a
C4 (Sac+SAU)	50,86666 b
CV(%)	26,11

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia.

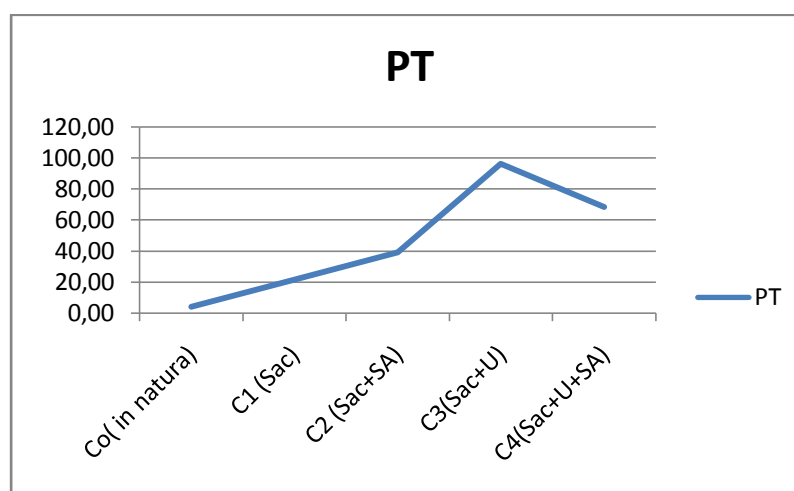
Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

Na análise de proteínas totais, a extração pelo método de *Kjerdahl*(AOAC,1985) e a quantificação pelo método Baethgen e Alley (1989), observou-se que o maior aumento na concentração protéica, estatisticamente foi na amostra de *Saccharomyces cerevisiae* associada a 2,5% da Ureia p.a.,O gráfico a seguir relaciona a média dos valores percentuais de proteínas totais, feita em cinco repetições e adicionado um suplemento de nitrogênio.

Observou-se que, numericamente em todos os tratamentos que foram adicionados a levedura houve um aumento do percentual protéico. Pode-se ver isso ao comparar o percentual de proteínas totais do resíduo *in natura* com os demais tratamentos.

Gráfico 04: Concentração percentual das proteínas totais utilizando diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* para enriquecimento protéico em resíduos de algas.



Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia.

Fonte: O autor (2014).

No entanto, ao comparar o tratamento C1 com os demais, observou-se que houve um aumento do percentual protéico, mesmo não sendo utilizado nenhum suplemento de nitrogênio. Entre os suplementos, observou-se estatisticamente que houve significância entre os tratamentos e o suplemento a base de ureia a 2,5% foi o que mais apresentou proteína total.

Com o objetivo de aumentar o teor protéico da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* L.) cv miúda, por meio da FSS, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ureia e mistura mineral, Lima et al. (2007) concluíram que a adição de 2% de levedura mais 2% de ureia proporcionou o rendimento de 26,52% de proteína bruta, no tempo de 12 horas de fermentação, representando 469% de incremento em relação ao tratamento controle.

Segundo Menezes (2009), a inclusão de até 2,0% de ureia na MS de dietas contendo 60% de coproduto de vitivinícolas desidratado e 40% de palma forrageira *in natura* possibilita incrementos no consumo e no coeficiente de digestibilidade dos nutrientes. A ureia

foi responsável pela maior porcentagem de nitrogênio disponível das dietas experimentais, e sua adição aumentou o teor e o consumo de proteína total.

Este fato pode ser embasado na observação dos teores iniciais baixos de proteína total dos resíduos das algas *in natura* que apresentaram 0,0693 mg/mL. Entre as fontes nitrogenadas, a ureia é a mais utilizada, pois possui maior concentração de N, menor preço relativo e menor poder acidificante do meio, o que pode favorecer o crescimento/desenvolvimento das leveduras presentes no resíduo (MENEZES, 2009).

Gattás (1989) em seu trabalho sobre o efeito da adição de nutrientes na fermentação alcoólica de meio de cultivo elaborado com fécula de mandioca concluiu que o pH do meio contendo ureia como fonte de nitrogênio sofreu pouca variação comparado com o meio contendo sulfato de amônio ou isento de nutrientes. A variação de pH foi maior no meio isento de nutrientes. Aceita-se, em geral, que as leveduras crescem melhor em meios ácidos, com pH entre 3,5 e 3,8, contudo os limites de tolerância estão situados entre pH 2,2 e 8,0 de acordo com as diversas espécies (PELCZAR et al., 1980).

Na concentração C2, adicionada 2,5% de Sulfato de amônio houve um crescimento significativo em relação ao controle. Isso corrobora com o trabalho de Cerqueira (2013) que testou a suplementação com compostos nitrogenados em mostos com alta concentração de açúcar, e obteve maior produção de biomassa quando comparado com o controle (ensaio sem suplementação).

O sulfato de amônio tem a capacidade de acidificar o meio, porém ou a concentração adicionada foi pouca a ponto de não permitir que o pH ficasse na faixa de crescimento ótimo da levedura que é entre 3,5 e 3,8, ou ainda a quantidade foi grande o suficiente para diminuir o pH para menos de 3,5.

Já a ureia tem a capacidade de deixar o meio mais alcalino. De acordo com um trabalho desenvolvido por LOW & PIPER (1970) apud MELLO et al. (1980), a taxa de nitrificação do sulfato de amônio e ureia aumentava com o pH do meio, sendo que o NH_3 da ureia era nitrificado mais rapidamente do que o do sulfato de amônio, isto devido a elevação do pH que normalmente ocorre após a adição de ureia ao solo (ENO & BLUE, 1957 apud MELLO et al., 1980). No caso do sulfato de amônio, verifica-se um abaixamento do pH (ANDERSON & PURVIS, 1955 apud MELLO et al., 1980).

Para Vendruscolo (2007), a maior quantidade de proteína total conseguida foi 4

vezes o valor inicial, através de fermentação semissólida utilizou o bagaço da maçã com uma umidade de 70% e com a ureia numa concentração de 5%.

Ao ser observada a concentração de carboidratos solúveis totais das amostras na segunda etapa constatou-se que, numericamente a amostra suplementada com ureia continua sendo a maior concentração de carboidratos solúveis totais do experimento. Como pode ser visto na tabela 9, apesar da pouca diferença do tratamento composto por ureia e sulfato de amônio, o tratamento feito somente com suplementação de ureia apresentou um aumento discreto provavelmente devido a disponibilidade do nitrogênio oriundo da ureia em relação ao nitrogênio inorgânico oriundo do sulfato de amônio.

Tabela 9: Valores de Carboidratos solúveis totais (ATS) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de *Saccharomyces cerevisiae* em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL)

Amostra	24h
C0(<i>in natura</i>)	58,7a
C1(Sac)	74,25a
C2(Sac+SA)	63,07a
C3(Sac+U)	89,62a
C4(Sac+SAU)	88,10a

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia. Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2014).

Estatisticamente, utilizando DIC, com cinco repetições foi observado que os tratamentos não apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). A média dos tratamentos dessa segunda parte apresenta-se na tabela 10.

Em seu trabalho, Luciano et al. (2014) observou que a adição de ureia alterou os teores de carboidratos solúveis em resíduo de abacaxi inoculado com apenas 2% levedura que apresentou valor equivalente a 76,94%. Ao adicionar a levedura mais 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2% de ureia os valores de carboidratos totais diminuiram para 70,93%; 63,12%; 53,14% e 52,07%, respectivamente e os teores de proteína brutos adquiridos após o processo de enriquecimento foram de 21,0%; 28,9%; 38,6% e 40,1%, respectivamente.

Tabela 10: Valor das médias das concentrações de carboidratos solúveis totais (AST) entre os tratamentos suplementados com compostos nitrogenados na etapa 2.

Amostras	AST mg g ⁻¹ MS
Co (<i>in natura</i>)	7,42* a
C1 (Sac)	8,30* a
C2(Sac+SA)	7,90* a
C3(Sac+U)	9,36*a
C4 (Sac+SAU)	9,40*a
CV(%)	

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia. *Dados transformados ($\sqrt{X}$). Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

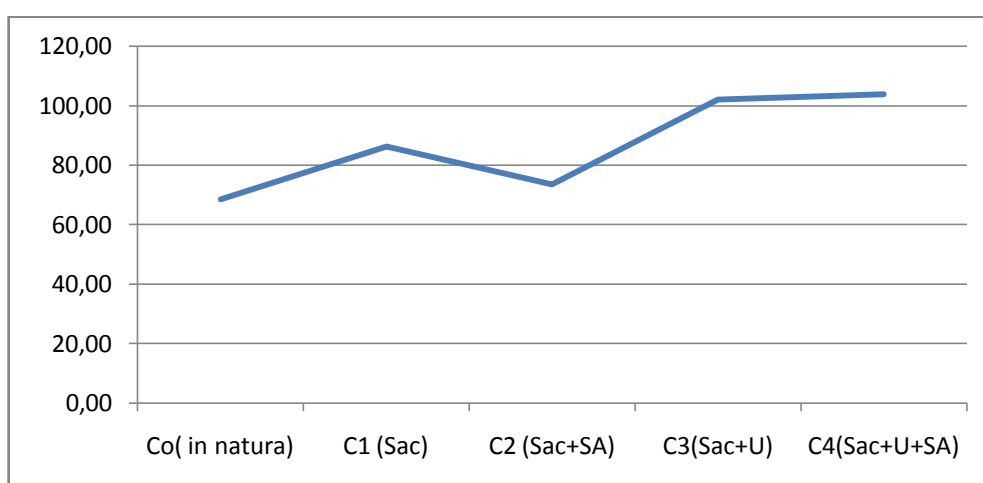
Então, numericamente a redução gradativa da fração de carboidratos totais existentes nos resíduos do abacaxi foi atribuída à facilidade da degradação dos carboidratos contidos nos substratos que podem ser metabolizados como fonte de energia para reações de biossíntese da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo também dependente da concentração desse microrganismo no substrato.

Os carboidratos solúveis totais do presente trabalho tiveram um comportamento numericamente parecido ao das proteínas totais, presentes na segunda parte do projeto como pode ser visto no gráfico 5. A adição de suplementos nitrogenados pode ter servido como intermediários da via de produção de energia, preservando os carboidratos solúveis disponíveis na amostra residual (LEHNINGER, 2010). A tabela mostra os valores dos carboidratos solúveis totais das amostras da segunda etapa.

Essa pequena diferenciação numérica pode ser explicada pelo fato da concentração C1, que contém somente a *Saccharomyces cerevisiae* ter aumento na concentração de carboidratos solúveis, devido ao aumento da massa fúngica, tanto por bioconversão como também os carboidratos da própria levedura ao ser adicionada. Então, os carboidratos solúveis

totais da amostra residual analisados podem estar sendo confundido com os carboidratos solúveis totais da biomassa fúngica.

Gráfico 5: Valores de Carboidratos solúveis totais (ATS) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de *Saccharomyces cerevisiae* em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL)



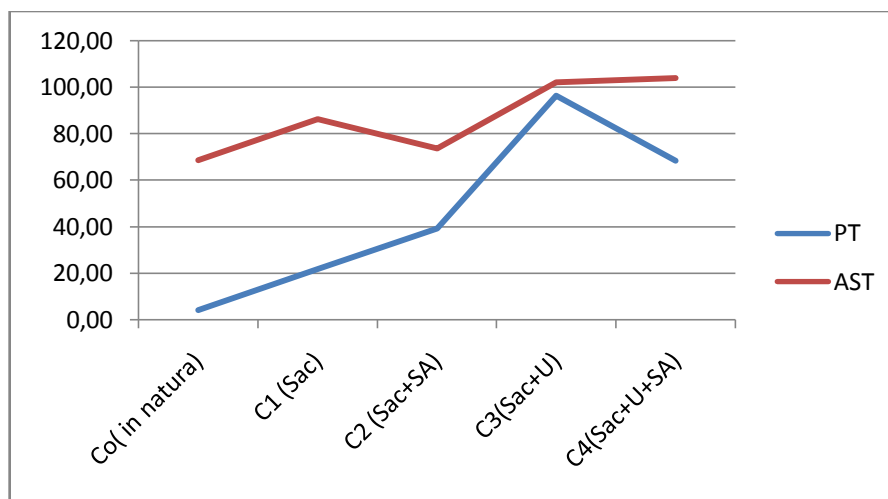
Fonte: O autor (2015).

Já para C2, os valores de carboidratos solúveis totais diminuíram possivelmente devido a um ajuste de pH do meio e também a uma disponibilidade de nitrogênio vindo do sulfato de amônio, o que aumentou a concentração de proteínas totais, possivelmente devido a bioconversão. Em C3, com adição de ureia, mesmo que em menor quantidade, associada ao Sulfato de amônio pode ter alterado o pH e limitado o crescimento microbiano

Observa-se que o comportamento da concentração de carboidratos solúveis totais está idêntico ao comportamento das proteínas totais nas mesmas amostras como mostra o gráfico 6.

A umidade do substrato também deve ser considerada para que o fungo atinja o crescimento máximo. Altos índices de umidade resultam na diminuição da produção por brotamento, interferindo na transferência de oxigênio (HOPPE et al, 2004). Já os baixos teores de umidade reduzem o crescimento fúngico.

Gráfico 6: Valores de Carboidratos solúveis totais (ATS) e proteínas solúveis totais (PT) no resíduo submetido à fermentação na concentração de 10% de *Saccharomyces cerevisiae* em 24h, suplementada com diferentes fontes de nitrogênio (mg/mL)



Fonte: O autor (2015).

O efeito do conteúdo de umidade do meio sólido sobre o crescimento microbiano pode ser mais bem expresso em termos de atividade de água (a_w), que indica a quantidade de água disponível para o crescimento do fungo.

Considerando a etapa 1 em que foram testadas várias concentrações da levedura em diferentes tempo de exposição, o teste estatístico foi feito em esquema fatorial, com três repetições sendo que os tratamentos em relação as concentrações apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). A média da umidade da parte 1 apresenta-se na tabela a seguir:

Tabela 11: Valor das médias das umidades entre os tratamentos, em diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na etapa 1.

<i>S. cerevisiae</i> m/m	Umidade %
-----------------------------	--------------

C0(0%)	92,94 a
C1(5%)	53,71 b
C2(10%)	54,11 b
C3(15%)	9,37 c
CV(%)	3,24

Legenda: Co= controle negativo, sem a levedura; C1= levedura a 5%; C2= levedura a 10%; C3=levedura a 15%.

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

A diminuição da umidade do resíduo na concentração C3 em relação ao controle e aos demais tratamentos pode ser explicada pela maior quantidade de massa fúngica adicionada ao meio de cultura de uma só vez, diminuindo a água disponível no meio uma vez que a umidade da *Saccharomyces cerevisiae* (em forma de fermento em pó) é de aproximadamente 1,36% e a umidade do resíduo das algas era, no momento da inoculação da levedura de 92,93%. Em seu trabalho, Araújo (2005), observou que para enriquecer, através de FSS a palma forrageira (uma cactácea), deve-se iniciar o processo com umidade acima de 90%. Segundo o autor, a umidade mínima para o crescimento das leveduras é entre 75 e 95%, mas também as mesmas suportam uma ampla variação.

O problema da ocorrência de fungos contaminantes em alimentos baseia-se em dois fatores: o seu alto poder de deterioração, relacionando ao fato de possuírem um alto arsenal enzimático, proporcionando-lhe a capacidade de colonizar os mais diversos substratos; e a sua capacidade de produzirem metabólitos tóxicos nos seres humanos e animais (SOUZA et al, 2003; SOUZA et al, 2004). Se o teor de umidade estiver abaixo de 12% à capacidade de desenvolvimento do bolor é menor, pois haverá uma menor possibilidade de contaminação sendo então a concentração C3 mais adaptada ao processo de armazenamento. A tabela 12 mostra o valor das médias das umidades encontradas nas amostras suplementadas com compostos nitrogenados.

Tabela 12: Valor das médias das umidades entre os tratamentos, em diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na etapa 2.

<i>S. cerevisiae</i>	Umidade
----------------------	---------

m/m	%
Co (<i>in natura</i>)	4,66 a
C1 (Sac)	2,82 b
C2(Sac+SA)	2,87 b
C3(Sac+U)	3,24 b
C4 (Sac+U+SA)	3,27 b
CV(%)	16,76

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia.

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

Com relação às cinzas foi observado que, estatisticamente não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos, entre as duas etapas da pesquisa, como mostra as tabela 13 e 14.

Tabela 13: Valor das médias das Cinzas entre os tratamentos , em diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na etapa 1.

<i>S. cerevisiae</i> m/m	Cinzas %
C0(0%)	2,82 a
C1(5%)	3,57 a
C2(10%)	2,58 a
C3(15%)	3,99 a
CV(%)	52,31

Legenda: Co= controle negativo, sem a levedura; C1= levedura a 5%; C2= levedura a 10%; C3=levedura a 15%.

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

Tabela 14: Valores das médias das cinzas entre os tratamentos , em diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* na etapa 2.

<i>S. cerevisiae</i> m/m	Cinzas %
Co (<i>in natura</i>)	5,46 a
C1 (Sac)	5,74 a
C2(Sac+SA)	6,00 a
C3(Sac+U)	5,06 a
C4 (Sac+U+SA)	5,43 a
CV(%)	10,99

Legenda: Co=controle negativo; Sac=*Saccharomyces cerevisiae*; SA=Sulfato de amônio; U=ureia; SAU=Sulfato de amônio e ureia.

Obs : A diferença entre as letras mostra a diferença significativa entre as amostras. A igualdade entre as letras mostra que as amostras não diferem estatisticamente.

Fonte: Assistat ® versão 7.7 (2010).

Na legislação brasileira (BRASIL, 2005) conceituam-se as cinzas como o resíduo mineral fixo resultante da incineração da amostra do produto. Desta forma, estatisticamente o teor de cinzas dos resíduos fermentados não foi alterado nem na etapa 1 e nem na etapa 2. As cinzas são a fração mineral dos alimentos, e o aumento observado, mesmo numericamente deve-se às reduções na concentração da matéria orgânica.

De acordo com Paiva (1991), valores maiores que a tolerância máxima permitida pode ser também um indicativo de teores significativos de Ca, P, Fe e Mg, como também, mais provavelmente, indicam contaminação por material estranho ao produto ocasionado por falhas em algumas etapas do processamento.

A média do teor de cinzas dos resíduos fermentados, se comparados com o trabalho de Rebouças (2013), cujo resíduo foi analisado *in natura* e o valor é em torno de 14%, apresentou menor valor, nas duas etapas, o que pode ser justificado pelo consumo da matéria orgânica pela levedura para a produção de proteínas solúveis.

6. CONCLUSÃO

Os teores de proteínas e carboidratos mostraram ser inversamente proporcionais na primeira etapa. Já que o aumento protéico, de acordo com a elevação da concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, levou a diminuição de carboidratos no resíduo, comprovando que o microrganismo consome o açúcar presente no meio e produz proteína.

O aumento dos teores de proteína bruta dos substratos, após o enriquecimento protéico, apresentou resultados satisfatórios em relação aos valores destes nutrientes na forma *in natura*. Esse fato deve-se ao possível aproveitamento dos carboidratos solúveis disponíveis no resíduo pelas leveduras, convertendo a proteínas totais.

Mesmo não se utilizando adição de uma fonte de nitrogênio, a levedura encontrou nutrientes adequados nos diversos substratos, para seu desenvolvimento (metabolismo). Neste contexto, o processo de enriquecimento protéico de diversos substratos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz suplementos energéticos e/ou protéicos além de serem utilizados como aditivos vivos, que utilizados na dieta dos animais podem substituir em parte os concentrados convencionais, promovendo dentre outros tantos benefícios, ótimos resultados no desempenho.

Houve enriquecimento protéico de 4,0 vezes para o maior nível de *Saccharomyces cerevisiae*. Um aumento significativo em relação ao resíduo *in natura*, o qual se apresenta pobre proteicamente.

A adição de ureia 2,5% aumentou os níveis de proteínas totais em relação ao controle sem suplemento, sulfato de amônio a 2,5% e a mistura de 1,25% de sulfato de amônio e 1,25% de ureia na amostra devido a sua maior disponibilidade de nitrogênio no meio, porém esse aumento poderia ser maior se houvesse um controle maior sobre o pH, uma vez que o mesmo pode ser um fator limitante para o crescimento microbiano.

O sulfato de amônio não se mostrou tão eficaz quanto a ureia devido a uma disponibilidade menor do nitrogênio e possivelmente pela característica de acidificar o meio, podendo limitar o crescimento microbiano.

A utilização dos resíduos das algas fermentados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é viável, permitindo o reaproveitamento de resíduos de frutas como uma forma alternativa, mais barata, de suplemento alimentar para animais, principalmente nas regiões mais pobres.

Os fungos, por sua versatilidade de desenvolvimento, podem ser uma alternativa para enriquecimento e/ou disponibilização de nutrientes presentes em resíduos provenientes da indústria.

7 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P.M., **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. Florianópolis: UFSC, 103p. Dissertação, 2003.
- ANTONIO, G. C. **Influência da estrutura celular e da geometria da amostra na taxa de transferência de massa do processo de desidratação osmótica de Banana Nanica (*Musa cavendish*) e de Mamão Formosa (*Carica papaya* L.)**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists(method 900.02). Arlington: A.O.A.C., chapter 44. p. 3, 1996.
- AQUASIS (Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos). **A Zona Costeira do Ceará: Diagnóstico para Gestão Integrada**. Fortaleza: AQUASIS, 293p, 2003.
- ARAÚJO, L.F; SILVA, F.L.H.da; BRITO, E. A; OLIVEIRA JÚNIOR, S; SANTOS, E.S. **Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n.2, p. 401-407, 2008.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. **Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties and Applications**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC n. 263, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p.368-369, 2005.
- BURROWS, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H.; AARRISON, J.S. (Eds). **The Yeasts: yeast technology**, London: Academic Press, v.3, p.349-419, 1970.
- CABRAL, G. **Plantas multiuso. Algas podem ser usadas com fins alimentares, medicinais e cosméticos**. Disponível em <http://www.correiobraziliense.com.br>. Acesso em 14/11/2014.
- CAMPOS, A.R.N.; SANTANA, R.A.C.; DNTAS, J.P. , **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido**. Revista de Biologia de Ciências da Terra, v.5, p.1-11, 2003.
- CAMPOS, A. R. N. **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação semi-sólida**. Campina Grande, Paraíba, 87p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, 2005.

CANOILAS, L.M. **Enriquecimento protéico de resíduos de farinha de mandioca pelo desenvolvimento de leveduras.** (Dissertação de Mestrado), Piracicaba: ESALQ – Piracicaba -SP, 1991. 110p.

CARDOZO, K.H.M. **Estudo de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs).** (Tese de Doutorado), São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

COSTA, R. R.; MATIAS, L. G. O.; SOUZA, L. **Estudo do teor de lipídios das macroalgas marinhas: Gracilaria caudata, Gracilaria birdiae e Gracilaria dominigensis para a produção de biodiesel.** Resumo. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Ficologia, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** Analytical chemistry. Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUNLAP, P.V.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; CLARK, D.P., **Microbiologia de Brock.** 12ª Ed. Editora: Artmed., 2010.

ENO, C.F.; BLUE, W.C., **The comparative rate of nitrification of an hydrous ammonia, urea e ammonium sulphate in sandy soils.** Soil. Sci. Soc. Amer. Proc. 21 :392-396, 1957.

FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, p.274-300, 1993.

FUNDAÇÃO BRASIL CIDADÃO PARA EDUCAÇÃO, CULTURA, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE – FBC (Fortaleza, Ce). Ceará. Banco de dados. Icapuí - Ce, 2012.

GALVANI, F; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta.** In: Embrapa Circular técnica, 63. Corumbá, 2006.

GIBBONS, W.R.; WESTBY, C.A.; DOBBS, T.L. **A continous, farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets.** Biotechnology and Bioengineering, v.26, p.1098-1107, 1984.

GIONGO, C.N., **Fermentação semissólida de okara com Saccharomyces cerevisiae r. f. bayanus visando a biotransformação de isoflavonas e melhoria da qualidade nutricional.** 2013. 115p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) –Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.

HERNÁNDEZ, L. F.; ESPINOSA, J. C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. **β-Glucosidase activity in a Saccharomyces cerevisiae wine strain.** International Journal of Food Microbiology, Ciudad Real – Spain, v. 80, p. 171-176, 2003. ISSN 0168-1605.

HOLANDA, J.S.; OLIVEIRA, A.J.; FERREIRA, A.C. **Enriquecimento protéico de pedúnculos de caju com emprego de leveduras, para Alimentação Animal.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.33, p.787-792, 1998.

HOPPE, J. M. , **Produção de sementes e mudas florestais**, Caderno Didático nº 1, 2ª ed.Santa Maria , 388 p., 2004.

HSIEH, M.; GRAHAM, T. L. **Partial purification and characterization of a soybean b-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugate**. Phytochemistry, Philadelphia, v. 58, p. 995-1005, 2001. ISSN 0031-9422.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 27-28, 1985.

KURBANOGLU, E. B. **Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate**, Turkish Journal of Biology, v.25, p.371-377, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. L. - **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 4ª edição, São Paulo, 2006. 1202 páginas.

LIEBIG, M. J. **Sur les phénomènes de la fermentation et de la putréfaction, et sur les causes qui les provoquent**. Annales de Chimie et de Physique. 2e Serie LXXI, p.147-195. 1839.

LIMA, L. F. O.; NASCIMENTO, B. M.; HABU, S.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. **Produção de Biomassa e de Exopolissacarídeos por *Ágaricus brasiliensis* em Fermentação Submersa**. Anais do XVI Sinaferm, 2007.

LOW,A.J. ;PIPER, **The ammonification andnitrification in soil of urea with and without biuret.**, J .Agric.Sci.75, 301-309, 1970.

OLIVEIRA, E.C. & MIRANDA, G.E.C. **Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil**. In Anais do IV Congresso Latinoamericano de Ficologia, Volume II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo, v.z p.359-369. 1998.

OLIVEIRA-FILHO, A. **Estudos preliminares de macroalgas como indicadoras das condições ambientais da área recifal nas praias de Boa Viagem e do Pina, Pernambuco, Brasil**. Monografia (Especialização) - Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Departamento de Oceanografia. Gestão de Ambientes Costeiros Tropicais, 2001.

MACHADO, C. Mulheres de corpo e algas - Sustento que vem do mar.**O estado**, Fortaleza,11 de Março de 2014. O estado verde. Disponível em:<<http://www.oestadoce.com.br/noticia/mulheres-de-corpo-e-algas-sustento-que-vem-do-mar>>. Acesso em: 23/11/2014.

MAIEVES, H.A. **Caracterização física, físico química e potencial tecnológico de novas cultivares de mandioca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MANILAL, V.B.; NARAYANAN, C.S.; BALAGOPALAN, C. **Cassava starch effluent treatment with concomitant scp production.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v.7, p.185-190, 1991.

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

McHUGH, D. J. **Um guia para a indústria de algas.** FAO Fisheries Technical Paper 441. 2003.

MELLO, F.A.F. **Efeito da adição de uréia e sulfato de amônio sobre o pH e nitrificação em um solo ácido.** Anais da ESA Luiz de Queiroz., vol XXXVII, p. 1-10, 1980.

MENEZES, D.R. et al. **Níveis de ureia em dietas contendo co-produto de vitivinícolas e palma forrageira para ovinos Santa Inês.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. 2009, vol.61, n.3, pp. 662-667. ISSN 0102-0935.

MENEZES, T.J.B.; SALVA, J.G.; BALDINI, V.L.; PAPINI, R.S.; SALES, A.M. **Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation.** Process Biochemistry, London, p.167-171, Oct. 1989.

MEIRELES, A.J.A. **Banco dos cajuais: aspectos geoambientais: fundamentos para o uso sustentável dos recursos naturais.** Fundação Brasil Cidadão – Fortaleza CE, 2006.

MOLINA, G. **Prospecção de processos biotecnológicos de interesse industrial.** Dissertação de Mestrado. UNICAMP: Campinas, 2010, 126p.

MOORE, J.; CHENG, Z.; HAO, J.; GUO, G.; LIU, J.; LIN, C.; YU, L.; **Effects of Solid-State Yeast Treatment on the Antioxidant Properties and Protein and Fiber Compositions of Common Hard Wheat Bran.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 10173–10182, 2007. ISSN 0021-8561.

NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. **Preparation and functional properties of beverages made from sea algae.** Food Chemistry, V. 81, Issue 3, 2003.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J.L.; **Tempe fermentation, innovation and functionality, Update into the third millennium.** Journal of Applied Microbiology, v. 98, p. 789-805, 2005. ISSN 1365-2672.

PADUA, D. M.C. **Utilização da levedura alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte protéica na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, pisces, teleostei): aspectos metabólicos e de desempenho produtivo.** Dissertação de Mestrado. UNESP: Jaboticabal, 1996, 133p.

PAIVA, F. F. A. 1991. **Controle de qualidade da farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) produzida na região metropolitana de Fortaleza.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 216pp.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, Trivandrum - India, v. 13, p. 81-84, 2003. ISSN 1369-703X.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; DOMÍNGUEZ, H.; VÁZQUEZ, M. **Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates**. Food Chemistry, v.53,p.157-163, 1995.

PARK, S.; RAMIREZ, W.F. **Dynamics of foreign protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae***. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 33, p. 272, 1989.

PASTEUR, L. **Mémoire sur la fermentation appelée lactique (Extrat par l'auteur)** - 1857. Molecular Medicine, Volume 1, Number 6, September 1995.

PEDROSO, R. A. **Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru**. Dissertação de Mestrado. UEPG: Ponta Grossa, 2006, 74p.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia**. São Paulo : Makron Books, 2003. v.2, p.22-40.

PEPPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON,J.S. (Eds). **The yeast: tecnologia**. London: Academic Press,1970. v. 3, p.421-462.

PEREIRA, L. **As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades**. Disponível em http://www.algas_marinhas_portugal.pdf. Acesso em 12/11/2014.a

PEREIRA, L. **Extração, caracterização e utilização das carragenanas**.Disponível em <http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos.pdf>.> Acesso em12/11/2014.b

PEREIRA JR. N. BON, E.P.S. FERRARA, M.A.**Tecnologia de Bioprocessos**.Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.: il. – (Séries em Biotecnologia, v. 1). ISBN 978-85-903967-2-7.

PINHEIRO, A.J.R.; HEDRICK, T.I.; CALLAN, J.**Alimentos uni e multicelulares**. Seiva, Viçosa, MG, v. 39, n.87, 1-9p. Jan., 1979.

RASHAD, M. M.; SITOHY, M. Z.; SHAROBEEM, S. F.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; AL-KASHEF, A. S. **Production, Purification and Characterization of Extracellular Protease from *Candida guilliermondii* using Okara as a Substrate**. Advance Journal of Food Science and Technology. v. 32: p. 100-109, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ELCHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ed, edt. Guanabara, cap. 14, 2007.

REBOUÇAS, C. R. R. **Estudo do teor de lipídios das macroalgas marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria dominigensis* para a produção de biodiesel**. Dissertação de Mestrado. UERN: Mossoró, 2013,79p.

ROCHA, A.P.T. **Estudo do desempenho de um leito de jorro convencional para secagem de leveduras**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos) –Universidade Federal de Campina Grande.Campina Grande, PB, 2002.

ROCHA, C.P., **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia química)- Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2010.

ROSE, A.H., HARRISON, J.N. **The Yeast**. London: Academic Press. 1970. v.3.

SANTOS, et al. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. Ano 3, nº 4, 2º semestre de 2006. Disponível em:http://www.researchgate.net/publication/258681292_POTENCIALIDADES_E_APLICACOES_DA_FERMENTAO_SEMISLIDA_EM_BIOTECNOLOGIA/links/0c960528cac3ae9fba00000.pdf Acesso em:12/06/2014.

SANTOS, T.C. **Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento protéico para utilização na alimentação de ruminantes**.2013.Dissertação(Mestrado em Ciências Ambientais)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB): Itapetinga, BA,2013.

SCARINCI, H. E., UMANSKY, G., MENDOZA, M. S. C. **Estudio de la composicion quimica de biomosas celulares de leveduras**. Arch. Lationoam. Nutr., Guatemala,v.40, n.4, p.594-602, 1990.

SCHWARTZ, M., **Life and works of Luis Pasteur**. Journal of Applied Microbiology, 91, 597-601, 2001.

SILVA,P.M. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras**.2009. Dissertação(Mestrado em Ciências(Bioquímica))- Universidade de São Paulo (USP): São Paulo,SP, 2009.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. , 2. ed., Viçosa:UFV, Imprensa Universitária, 1990. 165p.

SILVEIRA, P.T.S. et al. **Barra de cereal com farinha da casca da berinjela (*Solanum melongena*, L.): análise microbiológica, caracterização química e aceitação sensorial**. III Congresso brasileiro de processamento de frutas e hortaliças, Ilheus, BA-Brasil,v. 26, p.614-619, 2013.ISSN 2236-4420.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. **Recent advances in solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, Trivandrum - India, v. 44, p. 13-18, 2009. ISSN 1369-703X.

SMIT, AJ. **Medicinal e Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review**. J.Appl phycol. 2004: 245 a 262.

SOUZA, M.C.B.;PAULA,P.O.C. **Algas e suas diversas utilidades para o meio ambiente**. 62º Reunião Anual da SBPC. SBPC Jovem-PROCEEM (UFRN): Natal, 2010. Disponível

em:<http://www.comperve.ufrr.br/conteudo/sbpc/jovem/arquivos_site/minicursos_oficinas/119.pdf>. Acesso em: 07/01/2015.

SOUZA, Edvandro Leite de; SOUSA, Cristina Paiva de; LIMA, Edeltrides de Oliveira; FREIRE, Kristerson R.L. **Isolamento e Identificação de Fungos Filamentosos em Farinhas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e Fubá de Milho (*Zea mays* L.) comercializados em Feiras livres da cidade de João Pessoa PB.** Revista Higiene Alimentar, vol 17, n] 109, p.34-39, junho de 2003.

SOUZA, Edvandro Leite de; SOUSA, Cristina Paiva de; LIMA, Edeltrides de Oliveira; FREIRE, Kristerson R.L. **Sensibilidade de Fungos Filamentosos isolados de alimentos, frente a extratos vegetais.** Revista Higiene Alimentar, vol 18, nº 124, setembro de 2004.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. **Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines.** Enzyme and Microbial Technology, Catania- Italy, v. 31, p. 1030-1035, sep. 2002. ISSN 0141-0229.

SUN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, N.; LI, D.; LI, M. **Hydrolysis of genistin and daidzin by a β -glucosidase purified from *Lentinula edodes*.** Journal of Medicinal Plants Research, Harbin -China, v. 24, n. 4, p. 2684-2690, dec. 2010. ISSN 1996-0875.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia.** 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VAN DEN HOECK C, MANN DG e JAHNS H M. **Algae: An introduction to phycology.** Cambridge University Press.1995.623 p.

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. DE O.; NINOW, J. L. **Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido.** Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 1, n. 0, p. 53- 57, 2007.

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

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

VOGEL, H. C.; TODARO, C. L. **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment.** Second edition, Noyes Publications, 1997. 799p.

YANG, S.S. **Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation.** Biotechnology and Bioengineering, New York, v.32, p.886-890, 1988.

YANG, S.; WANG, L.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LI, L. **Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*.** Food Chemistry, Beijing -China, v. 115, p. 1247–1252, 2009. ISSN 0308-8146.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. **High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 49, p. 4581-4583, 2001.