

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
EMPREGANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Upiragibe Vinícius Pinheiro

**Santa Maria, RS, Brasil.
2015**

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Upiragibe Vinícius Pinheiro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, linha de pesquisa Controle Ambiental e Otimização Energética, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Jahn

**Santa Maria, RS, Brasil.
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pinheiro, Upiragibe Vinícius
PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO EMPREGANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS / Upiragibe
Vinícius Pinheiro.-2015.
68 f.; 30cm

Orientador: Sérgio Luiz Jahn
Coorientador: Marcio Antônio Mazutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Processos, RS, 2015

1. Ácido Giberélico 2. Farelo de Arroz Bruto 3.
Resíduo de Cervejaria Úmido 4. Fermentação em Estado Sólido
5. Gibberella fujikuroi I. Jahn, Sérgio Luiz II.
Mazutti, Marcio Antônio III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO SUBSTRATOS
AGROINDUSTRIAIS**

Elaborada por
Upiragibe Vinícius Pinheiro

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Jahn, Dr.
(Presidente/Orientador)

Raquel Cristine Kuhn, Dr.
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Gabriela Carvalho Collazzo, Dr.
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Santa Maria, 27 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Upiragibe e Sonia, pela vida, dedicação, proteção e amor.

Aos meus avós, especialmente ao Upiragibe e à Nilza, pelo exemplo, incentivos, dedicação e valores que me ensinaram.

Aos tios e também padrinhos Najara e Jorge, pelo amor, pela dedicação e incentivo, especialmente durante a produção deste trabalho.

Às minhas irmãs Nayara e Ananda, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Sérgio Jahn, pela oportunidade de trabalharmos juntos nesse projeto, pela orientação e pela amizade.

Aos membros da banca pela disponibilidade dedicada à este trabalho.

À UFSM, em especial às equipes e colegas do Departamento de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.

Aos amigos e colegas que estiveram juntos desde o início da caminhada na carreira como Engenheiro Químico, em 2006, especialmente ao André e ao Fabiano, pela força que deram durante este período.

Ao Pessoal de Santa Maria, pela amizade e compreensão.

Aos colegas do programa de pós-graduação pela ajuda, paciência e compreensão.

Aos bolsistas, pela amizade e pela dedicação na elaboração das pesquisas.

Aos colegas da Pró-Reitoria de Infraestrutura, tanto aos que passaram por ela, quanto aos que lá estão.

Muitas coisas perde o homem, que depois vem a encontrar; porém lhes devo ensinar, e é bom no fundo reter: quem a vergonha perder, jamais a voltará a achar.+

- *Don José Hernández*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Autor: Upiragibe Vinícius Pinheiro
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Jahn
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de Março de 2015

O ácido giberélico (GA3) é um hormônio natural presente em algumas plantas, sendo empregado em formulações agrícolas como regulador de crescimento, apresentando grande importância econômica e industrial. Atualmente, sua produção em escala industrial é realizada por fermentação submersa (FSub) empregando o fungo *Gibberella fujikuroi*. O maior problema no processo submerso está relacionado aos baixos rendimentos de GA3, fazendo com que o processo de purificação apresente elevados custos. Uma alternativa a este processo é a fermentação em estado sólido (FES) que permite a obtenção deste produto em concentrações maiores. A maior vantagem da FES frente à FSub está relacionada à maior produção de GA3 empregando substratos de baixo custo, como por exemplo, resíduos e subprodutos da agroindústria. Dado o fato de que o Brasil é destacado como um dos mais prósperos países em termos da produção agrícola, e que o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 30 a 40% da produção de arroz e cevada, no país, avaliou-se a utilização de Farelo de Arroz Bruto (FAB) e Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU), resíduos do processamento de arroz e da indústria cervejeira, como substratos para a produção de GA3 pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. Foram realizados dois planejamentos experimentais, linear do tipo 2ⁿ e DCCR, ambos para duas variáveis. O primeiro planejamento, em três níveis, avaliou o efeito da umidade, na faixa de 50 a 70%, e a composição do meio, com o teor de FAB variando entre 30 e 70% do total de massa do substrato (massa de FAB e de RCU). Por sua vez, o segundo planejamento, em 5 níveis, avaliou o efeito da adição de glicose, fonte de carbono na faixa de 0 a 80 g/L, e do Nitrato de Amônio (NH₄NO₃), fonte de nitrogênio, na faixa entre 0 a 5 g/L, na produtividade de GA3, fazendo uso das melhores condições do primeiro planejamento. Foi verificado que, para sete dias de fermentação, o maior rendimento obtido, para a primeira investigação proposta, foi no ensaio realizado com composição do meio 30% FAB e 70% RCU e umidade do meio de 70%. No segundo planejamento constatou-se que a maior concentração de NH₄NO₃ favoreceu a formação de GA3 pelo fungo, para um valor intermediário do teor de glicose. Por fim, a investigação da cinética demonstrou um comportamento de crescimento na produção de GA3, com o pico no sétimo dia, com produção máxima de 10,10 g/Kg de substrato, e posterior tendência à estabilização.

Palavras-chave: Ácido Giberélico, Farelo de Arroz Bruto, Resíduo de Cervejaria Úmido, Fermentação em Estado Sólido, *Gibberella fujikuroi*.

ABSTRACT

Dissertation for the degree of Master of Science
Post-Graduation Program in Process Engineering
Federal University of Santa Maria

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EMPREGANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Author: Upiragibe Vinícius Pinheiro

Advisor: Sérgio Luiz Jahn

Local and Date of Defense: Santa Maria, March, 27 of March of 2015.

The gibberellic acid (GA₃) is a natural hormone found in some plants, this hormone has been used in agricultural formulations, as growth regulator, highly relevance both economic and industrial. Currently, its industrial scale production is achieved by Submerged Fermentation (SF) using the fungus *Gibberella fujikuroi*. The main problem in the industrial process is related to the low yield of GA₃, causing the purification process presents high costs. An alternative to this process is the Solid-State Fermentation (SSF) that allows to obtain higher concentrations of this product. The greatest advantage of the SSF front SF is related to increased production of GA₃ using low cost substrates such as waste and by-products of agroindustry. Given the fact that Brazil is highlighted as one of the most prosperous countries in terms of agricultural production, and the Rio Grande do Sul accounts for about 30-40% of rice and barley production in the country, this research evaluated the use of Raw Rice Bran (RRB) and Wet Brewery Waste (WBW), rice processing and brewing industry residues, as substrates for GA₃ production by the fungus *Gibberella fujikuroi*. Two experimental designs, a linear type 2ⁿ and CCRD, both for two variables were performed. The first design evaluated, on three levels, evaluated the effect of moisture content in the range of 50 to 70%, and the composition of the medium, with RRB content ranging from 30 to 70% of the total substrate mass (RRB and WBW mass). In turn, the second planning in 5 levels, evaluated the effect of the addition of glucose, the carbon source over the range 0 to 80 g/L, and ammonium nitrate (NH₄NO₃), the nitrogen source, in the range 0 - 5 g/L, by making use of the best conditions of the first planning. It was found that, for seven days of fermentation, the greater yield for the first research proposed, was at the test carried out with medium composition of 30% RRB and 70% WBW and moisture content equals 70%. At the second design It was observed that the highest concentration of NH₄NO₃ favored the formation of GA₃ by the fungus, towards intermediate value to the glucose content. Finally, investigation of the kinetic behavior showed an increase in production of GA₃, with the peak on the seventh day with maximal production of 10,10 g/kg of substrate, and subsequent tendency for stabilization.

Keywords: Gibberellic acid, Raw Rice Bran, Wet Brewery Waste, Solid State Fermentation, *Gibberella fujikuroi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do esqueleto <i>ent</i> -gibrelano.....	20
Figura 2 -	Biossíntese de formação do <i>ent</i> -caurano no <i>Gibberella fujikuroi</i>	21
Figura 3 -	Biossíntese de giberelinas em <i>Gibberella fujikuroi</i> em plantas.....	22
Figura 4 -	Estrutura química do GA3.....	24
Figura 5 -	Influência da umidade na atividade de água dos substratos RCU e FAB.....	43
Figura 6 -	Influência do tempo de fermentação na quantidade de massa seca formada por litro de meio de fermentação.....	44
Figura 7 -	Influência do tempo de fermentação na taxa de formação de massa seca no meio de fermentação.....	45
Figura 8 -	Análise da influência do percentual de FAB e da umidade do meio de fermentação na quantidade de GA3 formado....	47
Figura 9 -	Superfície de resposta para o Planejamento Experimental das variáveis composição do meio e umidade.....	47
Figura 10 -	Correlação entre os valores preditos e observados de produção de GA3 no processo de FES.....	48
Figura 11 -	Análise da influência dos teores de glicose e nitrogênio na quantidade de GA3 formado por FES.....	51
Figura 12 -	Superfície de resposta para ensaios da influência da concentração de glicose e nitrogênio do meio de fermentação na quantidade de GA3 formado.....	52
Figura 13 -	Correlação entre os valores preditos e observados de produção de GA3 no processo de FES.....	52
Figura 14 -	Influência do tempo de fermentação na quantidade de GA3 formado.....	55
Figura 15 -	Influência do tempo de fermentação no teor de glicose e percentual de glicose consumida.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do RCU.....	28
Tabela 2 -	Composição do FAB.....	28
Tabela 3 -	Composição do meio de fermentação.....	35
Tabela 4 -	Composição da solução de suplementação.....	36
Tabela 5 -	Planejamento experimental PB12 e três repetições no ponto central para umidade e composição do meio.....	37
Tabela 6 -	Planejamento Experimental DCCR para teor de glicose e teor de nitrato de amônio.....	39
Tabela 7 -	Planejamento experimental realizado com resultados.....	39
Tabela 8 -	Planejamento experimental realizado com resultados.....	46
Tabela 9 -	Planejamento de experimento para avaliar a influência da concentração de glicose e nitrogênio na produção de GA3 por fermentação no estado sólido.....	50
Tabela 10 -	Produção de GA3, em g/Kg, para ensaios realizados em Erlenmeyers em diferentes períodos de tempo.....	54
Tabela 11 -	Influência do tempo de fermentação na massa de glicose e percentual de consumo de glicose.....	54

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

m - Massa

pH - Potencial de Hidrogênio

N - Nitrogênio

a_w - Atividade de Água

CA - Carvão ativado

Ca - Cálcio

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cu - Cobre

CuSO_4 - Sulfato de Cobre

BDA - Batata Dextrose Agar

FAB - Farelo de Arroz Bruto

FES - Fermentação no Estado Sólido

FeSO_4 - Sulfato de Ferro

FSub - Fermentação Submersa

g - gramas

GAs - Giberelinas

GA3 - Ácido Giberélico

ICI - *Imperial Chemistry Industries*

kg - quilogramas

K - Potássio

K_2HPO_4 - Fosfato de Potássio Dibásico

KCl - Cloreto de Potássio

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio Monobásico

L - Interação Linear

mL - mililitros

m/v - Massa/Volume

MgSO_4 - Sulfato de Magnésio

min - Minutos

Mn - Manganês

NH_4NO_3 - Nitrato de Amônio

NH_4SO_4 - Sulfato de Amônio

PA - Reagente para análise

P - Fósforo

Ppm - partes por milhão

Q - Interação Quadrática

RCU . Resíduo de Cervejaria Úmido

rpm - rotações por minuto

S - Enxofre

UV - Ultravioleta

v/v - Volume/Volume

vvm - volume de ar por volume de meio por minuto

Zn - Zinco

ZnSO_4 - Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVO GERAL.....	17
2.1	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Breve histórico.....	18
3.2	O grupo de fitohormônios giberelinas.....	19
3.2.1	Biossíntese do Ácido Giberélico.....	21
3.2	O Ácido Giberélico (GA3): propriedades físicas e químicas e interações biológicas.....	23
3.3	Produção de GA3 por Fermentação Submersa (FSub)	24
3.4	Produção de GA3 por Fermentação em Estado Sólido (FES)....	25
3.4.1	Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU).....	27
3.4.2	Farelo de Arroz Bruto (FAB)	28
3.5	Fatores que influenciam a produção de GA3.....	29
3.5.1	Aeração.....	29
3.5.2	Temperatura.....	29
3.5.3	Umidade e atividade de água (a_w).....	30
3.5.4	Fontes de Carbono.....	30
3.5.5	Fontes de Nitrogênio.....	31
3.5.6	Sais minerais.....	31
3.6	Extração e purificação do GA3.....	32
3.6.1	Purificação.....	32
3.6.2	Extração do GA3 do substrato sólido.....	33
3.7	Análise do GA3.....	33
3.7.1	Método espectrofotométrico.....	34
3.7.2	Outros métodos.....	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Microrganismo.....	35
4.2	Substratos.....	36
4.3	Produção do inóculo de <i>Gibberella fujikuroi</i>	37
4.4	Planejamento experimental para a produção de GA3 por FES...	38
4.4.1	Análise da influência da umidade e da composição do substrato na produção de GA3 por FES.....	38
4.4.2	Análise da influência da glicose e do nitrogênio na produção do GA3 por FES.....	39
4.5	Análise da cinética da produção do GA3 por FES.....	40
4.6	Extração e purificação do GA3.....	40
4.7	Análise da produção de GA3.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.1	Atividade de água dos substratos.....	42
5.2	Preparo do inóculo.....	43
5.3	Estudo da influência da umidade e da composição do substrato na produção de GA3 por FES.....	45
5.4	Estudo da influência da glicose e do nitrogênio na produção do GA3 por FES.....	49

5.5	Cinética da produção de GA3.....	53
6	CONCLUSÃO	57
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXO A	67

1. INTRODUÇÃO

A importância do setor agrícola para a economia nacional traz à tona a procura de alternativas para o aumento da produção de alimentos e matérias primas. Os hormônios vegetais passam a ser vistos, então, como um importante insumo para aumentar a eficiência técnica e econômica dos sistemas de produção agrícolas. O ácido giberélico (GA3) é um fitormônio natural, da classe da giberelinas, regulador de crescimento de grande importância econômica e industrial (RODRIGUES, 2010).

No Brasil, não há registro de produtores desse fitormônio, que originalmente é obtido pelo processo de Fermentação Submersa (FSub), com alto custo de produção que limita suas aplicações. A FSub apresenta diversas vantagens, tais como espaço reduzido e controle de parâmetros operacionais precisos. A produção de GA3 por FSub é baixa e o produto diluído no meio fermentado apresenta maior dificuldade purificação (MACHADO, 2002; KUMAR e LONSANE, 1989).

Por sua vez, a Fermentação em Estado Sólido (FES) é definida como um processo que utiliza material não solúvel em estado sólido e age tanto como suporte físico, como fonte de nutrientes, sem a livre vazão de líquidos. O baixo teor de umidade desse processo significa que somente alguns poucos microrganismos podem ser capazes de realizar esse tipo de fermentação, tais organismos, em sua maioria, são fungos (PANDEY *et. al.*, 2000).

A grande diferença entre a FSub e a FES é a quantidade de líquido utilizada nesses processos, uma vez que a FES não contém fase líquida e na FSub, todo o meio de fermentação é composto por água. A FES apresenta grandes vantagens frente à FSub, destacando-se o baixo custo de produção (COUTO e SANROMÁN, 2006; DURAND, 2003). Os custos de um produto fabricado pelo processo de FES podem chegar a uma diminuição de até 47% com relação ao preço de mercado (CASTILHO, ALVEZ e MEDRONHO, 2000). Isso se deve ao fato, do processo em estado sólido utilizar matérias-primas de baixo custo, como por exemplo, resíduos de produção agrícola e da agroindústria (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

A fim de exemplificação, comparações entre a FES e FSub demonstraram que o primeiro processo possui capacidade de produção de GA3 maior que o segundo, alcançando números desde 1,1 g/kg de massa seca a centenas de gramas

por quilograma de substrato, partindo-se de substratos como resíduos agrícolas. Destaca-se ainda, que a produção de GA3 por FES, conforme estudos recentes, tem resultado em dados superiores numericamente à produção de GA3 por FSub (RODRIGUES, 2010).

A grande variedade de substratos empregados no processo de FES depende de fatores como custo e disponibilidade. Resíduos agrícolas e de agroindústrias são gerados em grandes quantidades e são ricos em nutrientes, principalmente fontes de carbono e nitrogênio, podendo ser largamente utilizados no processo de FES. Isso não somente reduz os custos de produção, mas também diminui as fontes geradoras de poluição (CASTILHO, ALVEZ e MEDRONHO, 2000; DURAND, 2003).

Interessa evidenciar que, dentre os principais produtos de origem agrícola do Brasil, o arroz sofreu um aumento de 4% em relação à safra anterior e a cevada teve sua produção aumentada em 21,1%, ao se comparar as safras de 2012 e de 2013 (CONAB, 2013). Um dos principais resíduos do beneficiamento do arroz é o Farelo de Arroz Bruto que representa de 10% do grão inteiro (EMBRAPA, 2004). Na indústria cervejeira, principal emprego da cevada, o Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU) é resíduo do processo de fabricação da cerveja (JORGE, 2003).

Dessa forma, diferentes estratégias estão sendo estudadas de modo a aumentar a produção de GA3 por FES, destacando-se o estudo da influência de diferentes variáveis no processo e o uso de diversos substratos provenientes da agroindústria (MACHADO *et. al.*, 2000; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Em vista disso, estabelece-se o problema de pesquisa, a partir das seguintes constatações:

- O Rio Grande do Sul é responsável por mais de 30% da produção de arroz do País (CONAB, 2014);
- As arrozeiras da região disponibilizam uma grande quantidade de farelo;
- O Estado do RS é responsável pela produção de mais de 40% da cevada do Brasil (CONAB, 2014);
- As cervejarias da região produzem RCU em grande quantidade.

Essa grande quantidade de resíduos agroindustriais tem potencial para ser aproveitada como substrato na produção de GA3 por FES? A partir dessa indagação, estabelece-se o problema de pesquisa: É viável, tecnicamente, produzir GA3 por FES empregando FAB e RCU como substratos?

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal é investigar a produção do hormônio vegetal Ácido Giberélico, por Fermentação em Estado Sólido, utilizando como substratos o Resíduo de Cervejaria Úmido e o Farelo de Arroz Bruto, pelo fungo *Gibberella fujikuroi*.

2.1 Objetivos específicos

Como especificidades deste trabalho, destacam-se:

- 1) Estudar a influência da composição do meio de fermentação, contendo os substratos Resíduo de Cervejaria Úmido e Farelo de Arroz Bruto e do teor de umidade do meio, em condições de processo definidas;
- 2) Estudar a influência da glicose, como fonte de carbono e do Nitrato de Amônio (NH_4NO_3), enquanto fonte de nitrogênio, adicionados ao substrato no processo de FES para produção de GA3, partindo-se da composição do meio de fermentação e teor de umidade, nas condições definidas;
- 3) Investigar a cinética de produção de GA3, partindo-se de condições definidas das seguintes variáveis: composição do substrato e teor de umidade do meio de fermentação, de concentração de glicose, a fonte de carbono, e de NH_4NO_3 , a fonte de nitrogênio, na solução de suplementação adicionada ao meio de FES.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Antes de qualquer estudo de bioprocessos, notadamente a Fermentação em Estado Sólido (FES) por meio de substratos sólidos com fungos patógenos, como o *Gibberella fujikuroi*, se faz necessário entender como este microrganismo passou a ser utilizado dessa forma. Adicionalmente, torna-se necessária a compreensão sobre o processo de produção de Ácido Giberélico por Fermentação em Estado Sólido com substratos oriundos de resíduos da agricultura e agroindústrias, a partir do destaque dos grupos de fitohormônios giberelinas.

3.1 Breve histórico

Inicialmente, não se conheciam as giberelinas como hormônios de plantas, mas sim como metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Gibberella fujikuroi*, que causa uma patologia típica do arroz e de outras plantas. Em 1917, o fungo foi descrito como *Lisea fujikuroie*, identificado como o causador da doença %akanae+, ou %doença da plantinha boba+. Em 1926, no Japão, descobriu-se que a doença era causada por uma substância secretada por esse microrganismo, um sólido que foi chamado de giberelina A. Logo após tais descobertas o fungo passou a ser conhecido como é atualmente, *Gibberella fujikuroi* (BÖMKE e TUDZYNSKI, 2009).

Um grande número de microrganismos é conhecido como produtor de giberelinas, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (MACMILLAN, 2002). Industrialmente, os microrganismos utilizados para produção de GA3 são *Gibberella fujikuroi* (estágio sexuado) e *Fusarium moniliforme* (estágio assexuado), para os quais, recentemente, foi proposta uma reclassificação, com a nomenclatura *Fusarium verticillioides* (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Morfologicamente, não há diferenças visíveis entre as características de *Gibberella fujikuroi* ou *Fusarium moniliforme*. A cor e forma de crescimento destes fungos podem variar de acordo com o meio de crescimento utilizado, temperatura e rotina de manutenção das cepas. Em meio BDA (Batata Dextrose Agar), usado

nesta investigação, a cultura apresentou características como as destacadas na literatura por Leslie e Summerell (2006), ou seja, as culturas têm micélio branco, mas podem desenvolver pigmentos violeta ao longo do tempo.

No início dos anos 50, as giberelinas começaram a ser aplicadas na agricultura. Nesta mesma década, através de pesquisas de fermentações em escala de laboratório com *Gibberella fujikuroi*, uma giberelina foi isolada, passando a ser denominada Ácido Giberélico, com fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_6$ (TAKAHASHI, 1986).

3.2 O grupo de fitohormônios giberelinas

Com base em trabalhos já realizados, destacando-se, entre eles Rodrigues (2010), as giberelinas (GAs) são um grupo de fitohormônios que concentram sua produção na zona apical nos frutos e nas sementes. São fitohormônios identificados também em fungos e bactérias, resultando em 136 compostos dessa classe conhecidos e catalogados com a sua nomenclatura. A classificação das giberelinas varia de GA1 a GA136, seguindo a ordem de descoberta. Os dois compostos, dentre as 136 giberelinas conhecidas que apresentam a maior relevância são as GA1 e GA3 e as GA4 e GA7, cujos efeitos biológicos acentuados as tornam comercialmente importantes (BÖMKE e TUDZYNSKI, 2009). O composto GA3 é o de interesse deste trabalho.

As giberelinas exercem diversos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas, tais como germinação, expansão das folhas, desenvolvimento das flores, incremento do crescimento dos talos, interrupção do período de latência das sementes fazendo-as germinar, indução da brotação de gemas e promoção do desenvolvimento dos frutos, além do estímulo à atividade de transferência causando maior formação de xilema e floema em plantas lenhosas (TUDZYNSKI, 1999; BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000; TUCKER e ROBERTS, 2000; DAVIES, 2004).

Esses fitohormônios compõem a família de ácidos dipentenóides, sendo que todas as giberelinas possuem um esqueleto estrutural conhecido como *ent*-giberelano, mostrado na Figura 1. Esse esqueleto pode ter 19 ou 20 unidades de carbono, as quais podem formar quatro ou cinco sistemas de anéis. Salienta-se que

todas as giberelinas bioativas possuem 19 carbonos, entretanto nem todas as giberelinas que possuem 19 carbonos são bioativas (BÖMKE e TUDZYNSKI, 2009).

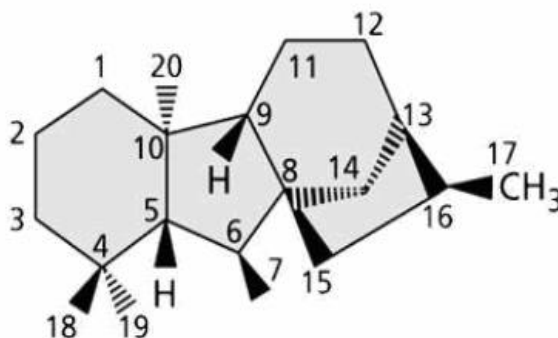


Figura 1 - Estrutura do esqueleto ent-gibrelano.

Fonte: Bömke e Tudzynski, 2009.

A maioria dos hormônios giberelinas, entretanto, são precursores de menor importância ou formas biologicamente inativas. Nesse contexto, o Ácido Giberélico (GA3) é considerado o mais importante membro da família das giberelinas, que age como um hormônio de crescimento, controlando a maioria dos processos de desenvolvimento numa planta (RODRIGUES *et. al.*, 2009). Dentre as principais aplicações deste fitohormônio estão a contribuição sobre os processos de malteação da cevada, a atividade promotora de desenvolvimento em parreirais, o aumento das distâncias internodais em algumas plantas, a redução do período de latência em sementes (PIEROTTY, OTÁLVARO e ALGECIRA, 2006), dentre outras, que o fizeram ganhar especial atenção, devido aos seus efeitos benéficos na agricultura.

Além do número de carbonos, as giberelinas diferem quanto ao número e posição dos grupos hidroxila, quanto ao estado de oxidação do C20 e com a presença ou ausência da ponte de lactona entre C10 e C19. Normalmente é difícil quantificar as GAs, pois elas possuem baixa absorção no ultravioleta (UV), não apresentam nem fluorescência e nem boa distinção entre suas características químicas, o que seria a base de ensaios químicos específicos (TAIZ e ZEIGER, 1998; TUCKER e ROBERTS, 2000).

A produção industrial de GAs é realizada através de Fermentação Submersa do fungo ascomiceto *Gibberella fujikuroi*. Mas, embora a química, biossíntese, modo de ação, relação entre estrutura e atividade e utilização das GAs já tenham sido investigados (BRUCKNER e BLECHSMIDT, 1991; HOLLMANN *et. al.*, 1995; LU *et. al.*, 1995), sabe-se pouco sobre a produção de GAs por FES, e até mesmo em fermentação em meio líquido (GELMI *et. al.*, 2000).

3.2.1 Biossíntese do Ácido Giberélico

Rodrigues (2010) destaca que a biossíntese do Ácido Giberélico no fungo *Gibberella fujikuroi* foi determinada, inicialmente, na década de 60, por meio da incorporação de acetato e mevalonato com carbono marcado. Segundo essa pesquisa, a síntese de giberelinas ocorre a partir do acetil-CoA pela via do ácido mevalônico (via MVA), o qual é produzido pela condensação de três moléculas da acetil coenzima A (CoA). O MVA é então convertido via isopentenil, dimetilalil, geranyl e difosfato de farnesila em difosfato de geranyl geranila (GDPP) (TUDZYNSKI, 1999). As enzimas *ent*-copalil difosfato sintase (CPS) e *ent*-caureno sintase (KS) estão envolvidas na conversão do GDPP para o *ent*-caureno.

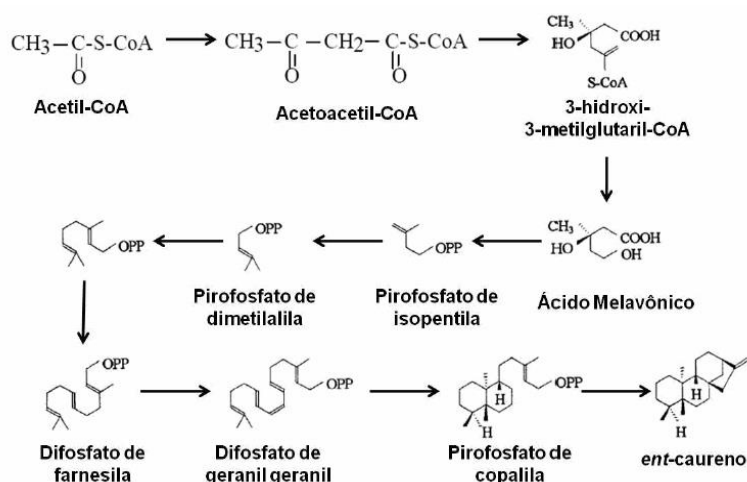


Figura 2 - Biossíntese de formação do *ent*-caurano no *Gibberlla fujikuroi*.

Fonte: Tudzynski, 1999.

Como se observa na Figura 2, a descoberta dos genes, que codificam as enzimas da biossíntese de GAs em plantas e fungos, demonstra que a rota de biossíntese de GAs é diferente entre as plantas e os fungos em níveis químicos, enzimáticos e genéticos.

Na Figura 3, a seguir, nota-se que o ent-caureno sofre modificações sucessivas pelas citocromo P-450 oxigenases (P450) até formar o GA12-aldeído. Importa destacar que todas as etapas da rota biossintética até a formação GA12-aldeído são idênticas em plantas e fungos. No entanto, a partir do GA12-aldeído, ocorre uma alteração nas vias de biossíntese de giberelinas, tornando-as diferentes em plantas e em fungos.

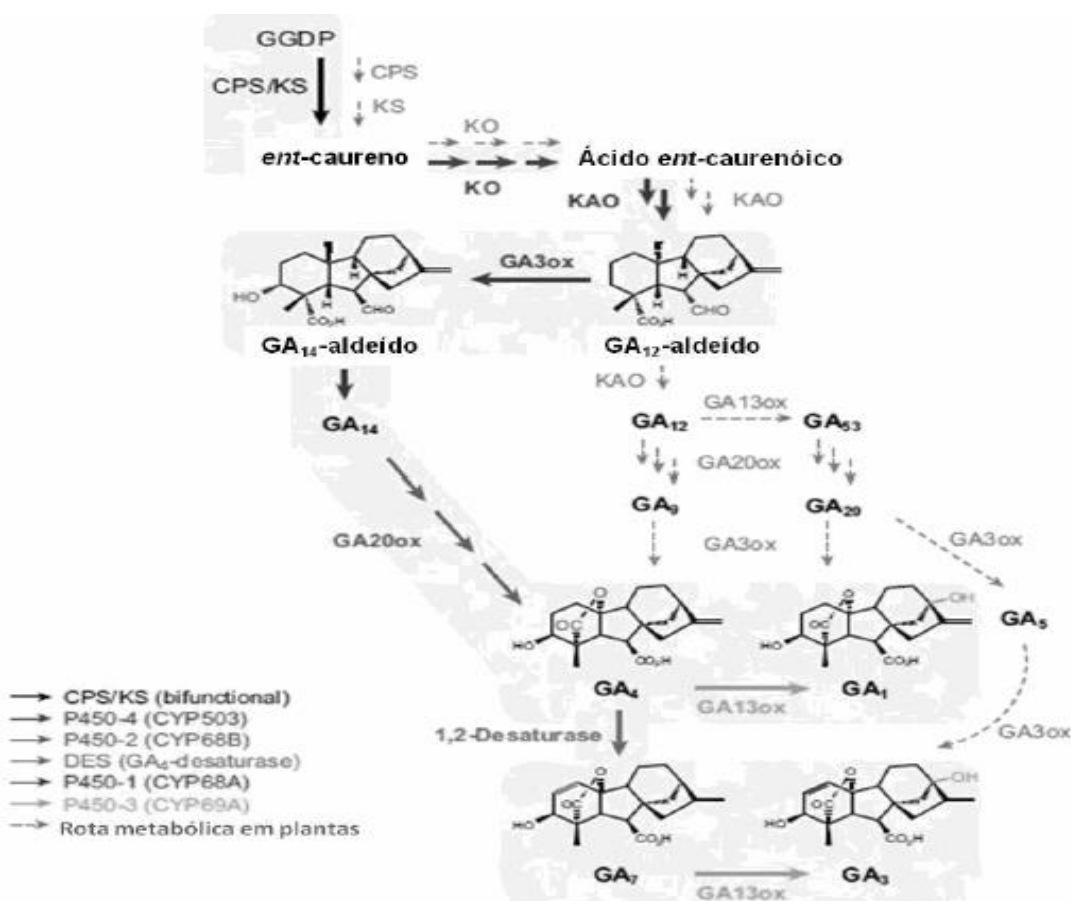


Figura 3 - Biossíntese de giberelinas em *Gibberella fujikuroi* e em plantas.

Fonte: Yamagushi, 2008.

A Figura 3 revela a formação do GA3 a partir da rota de interesse no fungo e em plantas. Em várias espécies de plantas, o GA12-aldeído é convertido em GA12. Por meio de oxidação, forma a giberelina GA9 ou 13-hidroxiado para formar GA53. A etapa final da via de formação de giberelinas em plantas, GA9 e GA53, formam GA4 e GA1, respectivamente. Por sua vez, em fungos, o GA12-aldeído é 3β-hidroxiado a GA14-aldeído que, quando oxidado forma o GA14. Este, por sua vez, sofre oxidação para formar o GA4.

Conforme as informações de Yamagushi (2008), na Figura 3, a partir de uma dessaturação no GA4 forma-se o GA7, que ao ser convertido por hidroxilação forma o composto de interesse deste trabalho: o GA3.

3.2 O Ácido Giberélico (GA3): propriedades físicas e químicas e interações biológicas

Em relação às propriedades físicas e químicas, o GA3 é considerado um sólido cristalino, de fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_6$ e massa molecular 346,37 g/mol. Seu ponto de fusão é igual a 233 - 235 °C. Esse ácido de pH 4,0 não possui odor e apresenta uma densidade de 600 mg/ml a 28 °C. O GA3 é ligeiramente solúvel em éter dietílico, também é solúvel em etanol, metanol, acetona, solução de bicarbonato de sódio, solução de acetato de sódio e soluções alcalinas. Em acetato de etila é moderadamente solúvel e insolúvel em clorofórmio. Em água, a solubilidade do GA3 é de 5000 mg/L a 25 °C+(RODRIGUES, 2012).

Seguindo as afirmações da autora, o GA3, na Figura 4 (ANVISA, 2007), é quimicamente caracterizado como um ácido tetracíclico dihidroxi-g-lactônico, contendo duas ligações duplas carbono-carbono e uma carboxila livre. Para Kumar e Losane (1989) essa estrutura foi obtida pelo estudo da decomposição de produtos ácidos e sua estereoquímica absoluta foi deduzida de dispersão rotatória, dicroísmo circular e análises de raios-X.

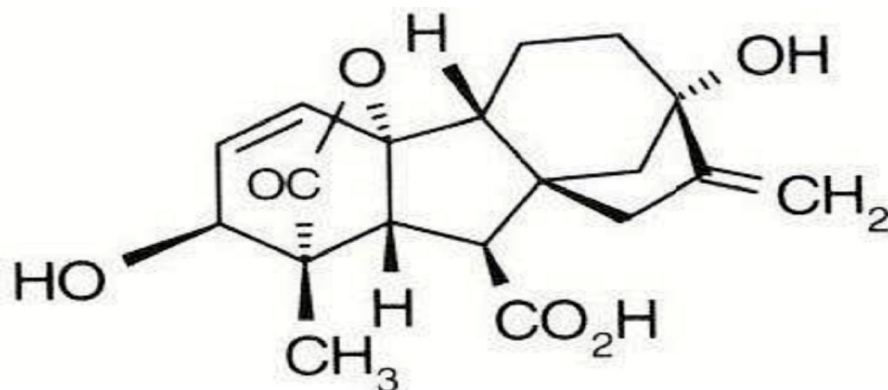


Figura 4 - Estrutura química do GA3.

Fonte: ANVISA (2007).

Quanto às interações biológicas, nas plantas, a quantidade de giberelinas (GAs) varia de 0,001 a 1,0 mg/kg. Na perspectiva de Takahashi (1986) e Machado (2002), diferentes GAs podem ser encontradas na mesma planta e a proporção entre elas pode mudar dependendo de seu estágio de desenvolvimento. Em folhas jovens são sintetizadas grandes quantidades de giberelinas, assim como nas sementes imaturas e raízes. Cabe salientar que as folhas jovens transportam giberelinas para o caule via floema. Afirmam os autores que um decréscimo acentuado é observado na concentração de giberelinas das partes aéreas podendo ser percebido por meio de remoções de parte do sistema radicular. Isso demonstra que uma parcela significativa das giberelinas desses órgãos é suprida pelas raízes.

Já em relação ao fungo *Gibberella fujikuroi*, a produção de GA3 e outras giberilinas é superior às existentes em plantas. Bruckner e Blechschmidt, 1991 destacam que a germinação de esporos e o alongamento das hifas podem ser influenciados pela ação do GA3. Com isso, pode-se inferir que a função dessa giberelina é a mesma nos fungos e nas plantas.

3.3 Produção de GA3 por Fermentação Submersa (FSub)

No processo de fermentação submersa, comumente utilizado na produção de GA3, são empregados vasos cilíndricos com a relação altura/diâmetro igual a 2:1 ou

3:1, onde todos os nutrientes estão dissolvidos no meio fermentativo. A presença do produto em forma diluída no meio é o maior obstáculo, dado que o custo da separação por tecnologias como centrifugação ou microfiltração, pode envolver de 50% a 75% do custo total de produção por FSub (KUMAR e LONSANE, 1989).

Os resultados expostos na literatura alcançam um máximo de produtividade que está entre 0,1 a 2 g/L, empregando meios contendo desde sacarose à água de maceração de milho e farinha de arroz, em fermentadores de produção em batelada (BERRIOS, PYLE e AROCA, 2010; CHAVEZ-PARGA et. al., 2008; SHUKLA, CHAND e SRIVASTAVA, 2005). Em algumas patentes publicadas pode-se observar resultados relevantemente maiores que os encontrados nas referências citadas para a produção de GA3 por FSub, por exemplo, nas patentes do Reliance Life Sciences Private Limited (2008) e da Universidade Federal do Paraná (2012), o primeiro, utilizando-se de meio industrial de cultura e o segundo utilizando de extratos aquosos de frutas cítricas, chegou-se a uma produtividade de cerca de 15 g/L. Contudo, apesar de toda a tecnologia disponível, no fim da década de 70, já sabia-se que este processo estava muito próximo da saturação, da mesma forma que redução de custos estava muito próxima do seu limite (JEFFERYS, 1970; KUMAR e LONSANE, 1989).

3.4 Produção de GA3 por Fermentação em Estado Sólido (FES)

As rotas para a obtenção do GA3 são: síntese química, extração de plantas e fermentação. O baixo rendimento das duas primeiras rotas faz com que estas sejam economicamente inviáveis. Como já citado no item anterior, industrialmente, a produção de GA3 é realizada através da FSub (RODRIGUES et. al., 2011). Porém, a FSub apresenta algumas desvantagens, se comparada com a FES, notadamente, os custos de produção do meio de fermentação, de operação do processo e de separação do metabólito de interesse.

É corrente nas pesquisas desenvolvidas na área, entre elas as de Pandey (2003) e Soccol e Vanderberghe (2003) que a FES caracteriza-se pelo desenvolvimento de microrganismo em um ambiente com ausência de água livre, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz

sólida. Essa matriz sólida tem a função de suporte físico e/ou fonte de nutrientes. Segundo Del Bianchi, Moraes e Capalbo (2001) a matriz sólida possui características capazes de gerar maior rendimento do processo. Evidenciam como produtivos o alto grau de acessibilidade do microrganismo, a reprodução das condições de alta atividade de água e alta transferência de oxigênio, tais condições podem ser obtidas por meio do uso de materiais inertes impregnados com solução nutritiva.

Em vista disso, por um lado podem ser elencadas vantagens, dentre as quais se destacam: as condições da cultura em FES (próximas das que se desenvolvem em meios naturais), a simplicidade no preparo do meio fermentativo, a redução da geração de efluentes líquidos, o uso de resíduos da agroindústria de baixo custo (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Por outro lado, a utilização industrial é dificultada por problemas gerados pela remoção de calor e obstáculos na medição de variáveis como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido. Essas limitações aumentam as dificuldades no monitoramento do processo de FES.

Diversos tipos de fermentadores têm sido utilizados para FES em modelo de batelada ou até em contínuo. Uma característica comum em quase todos esses modelos tem sido sua simplicidade no funcionamento. Nesta pesquisa a produção de GA3 por FES é abordada por meio da utilização de escala laboratorial conduzidos em frascos Erlenmeyer, béqueres e placas de Petri. Esses frascos são apropriados por possuírem abertura larga e oferecem facilidade na manipulação durante o processo (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância no Brasil, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza (SOCCOL, 1996a; PANDEY *et. al.*, 2000b). O reaproveitamento destes resíduos como substrato/suporte, além de ser uma alternativa em processos fermentativos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Diversos resíduos e subprodutos da agroindústria têm sido estudados como substrato/suporte em FES. Nesta investigação, optou-se por utilizar os Resíduo de Cervejaria Úmido e Farelo de Arroz Bruto.

A necessidade de reduzir os resíduos gerados, no Brasil, no Século XXI tem demonstrado que a utilização de subprodutos da agroindústria, como os do processamento de café, de frutas cítricas, de trigo, de mandioca (RODRIGUES *et.*

al., 2009; MACHADO *et. al.*, 2001, PASTRANA *et. al.*, 1995; MACHADO *et. al.*, 2002), polpa de frutas e cascas de vegetais como tomate e batata (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH, 2006; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012) e arroz e cevada (resíduos pesquisados neste trabalho), atingem produções de GA3 em processo de FES na faixa de 0,1 a 9,0 g/kg de substrato, demonstrando assim, uma produtividade até oito vezes maior que no processo de FSub. Isso revela que há alternativas tecnicamente viáveis para diminuir o impacto da geração de resíduos da agroindústria nos processos produtivos.

3.4.1 Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU)

A mosturação compreende o processo que envolve a mistura do malte moído com água quente, e por extração a quente, obtém-se o mosto: solução aquosa de açúcares, aminoácidos, peptídeos, contendo sais de cálcio e com um pH ligeiramente ácido. No processo de mosturação, pode-se obter a extração de 65% dos sólidos totais do malte. A filtração é feita em um equipamento chamado filtro prensa, onde as cascas e os bagaços são separados do líquido açucarado (mosto). Em seguida, a camada de cascas retidas no filtro é borrifada com água a aproximadamente 75°C por diversas vezes, de modo que, quando o resíduo se apresenta com menos de 1% de extratos solúveis, é considerado totalmente esgotado. O bagaço de malte, nomeado Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU) é constituído basicamente pelas cascas da cevada malteada (JORGE, 2003). A composição do RCU é apresentada na Tabela 1¹.

¹Os dados das Tabelas 1 e 2 foram obtidos por meio de análises específicas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, da UFSM, para os resíduos RCU e FAB, investigados neste trabalho (Anexo A).

Tabela 1 . Composição do RCU.

Propriedades	Composição (%)
Matéria Seca	93,92
Proteínas	19,35
Extrato etéreo	14,48
Teor de amido	15,69
Açúcares totais	13,92

Fonte: Autor.

3.4.2 Farelo de Arroz Bruto (FAB)

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe. Nas camadas do farelo e germe, está concentrada a maior parte dos lipídeos do grão de arroz. Durante o descascamento, obtém-se o farelo (pericarpo e germen) que representa de 10% do grão inteiro (CONAB, 2014). O farelo contém entre 12-18% de óleo, o que significa que o grão de arroz potencialmente possui apenas 0,8% de óleo. Durante o beneficiamento do arroz várias partes dos grãos são removidas e há a concentração dos principais elementos nutritivos no farelo, o que o torna ótima matéria-prima para processos industriais e para alimentação (ORTHOEFER, 1996). A composição do FAB é apresentada na Tabela 2¹.

Tabela 2 . Composição do FAB.

Propriedades	Composição (%)
Matéria Seca	93,92
Proteínas	13,09
Extrato etéreo	14,54
Teor de amido	36,74

Fonte: Autor.

3.5 Fatores que influenciam a produção de GA3

Existem fatores que devem ser levados em consideração no processo fermentativo por FES, através do fungo *Gibberella fujikuroi*, como por exemplo, a aeração, a temperatura, a umidade, além das fontes de nutrientes disponíveis ao microrganismo (fontes de carbono, fontes de nitrogênio e sais minerais). Esses fatores devem ser estudados e, sua influência na produção de GA3 deve ser compreendida, com o objetivo de se alcançar os melhores resultados possíveis dentro do processo.

3.5.1 Aeração

A aeração é um fator crítico, na produção de GA3, devido ao fato do processo de biossíntese do fungo *Gibberella fujikuroi* compreender vários passos oxidativos. Porém, como o espessamento do meio causado pela biomassa e a síntese de polissacarídeos, no meio, tendem a diminuir a transferência de oxigênio, isso afeta drasticamente o aumento da produção de GAs (VASS e JEFFERYS, 1979; BANDELIER, RENAUD e DURAND, 1996). Os resultados obtidos refletem a afirmação dos autores, uma vez que o aumento da parcela de FAB na composição do meio aumenta sua compactação e reduz a transferência de oxigênio. A consequência desses resultados é a redução da produção de GA3.

3.5.2 Temperatura

O efeito da temperatura na produção de GA3 parece ser independente do microrganismo utilizado, embora a maioria dos estudos sejam desenvolvidos utilizando cepas de *Gibberella fujikuroi*. Temperaturas muito elevadas afetam consideravelmente o desenvolvimento do microrganismo, podendo inclusive ocorrer a perda total das cepas. Vários estudos relatam que as pesquisas são desenvolvidas

utilizando diferentes condições de temperatura. Há relatos de variações entre 25°C e 30°C (OLIVEIRA, 2010).

3.5.3 Umidade e atividade de água (a_w)

A literatura aborda teores de umidade que, em geral, variam entre 30 e 85% dependendo do substrato (OLIVEIRA, 2010). A quantidade máxima de água no meio é função da capacidade de absorção do substrato. Porém, o teor de água não diferencia a água disponível aos microrganismos da água de ligação ao substrato, não disponível aos microrganismos. A quantidade de água que realmente está disponível ao metabolismo do microrganismo pode ser avaliada pela atividade de água (a_w). O teor de umidade do substrato é uma das principais variáveis que influencia o sucesso de uma FES. O líquido no seio da matriz não deve ser muito abundante para não reduzir a porosidade e, conseqüentemente, limitar as trocas gasosas. Valores importantes de crescimento de *Gibberella fujikuroi* e produtividade de GA3 estão relatados com a_w acima de 0,99 (KUMAR e LOSANE, 1990; CORONA, SÁEZ e AGOSIN, 2005). De fato, em concordância com a explanação acima, valores de a_w acima de 0,99 foram abordados nesta pesquisa, com teores de umidades dos substratos em valores na faixa de 50% a 70%.

3.5.4 Fontes de Carbono

O Carbono é um dos elementos essenciais à sustentação e ao crescimento do microrganismo. Entre as fontes de carbono mais utilizadas para produção da GA3 por FES, destaca-se a glicose. Neste processo, as concentrações de glicose superiores a 20% podem causar repressão catabólica (TUDZYNSKI, 1999), acarretando a paralisação do metabolismo do microrganismo. Outras fontes também podem ser utilizadas para a produção do GA3, podendo ser citadas as farinhas de origem vegetal ou misturas com diferentes fontes de carbono como glicerol, glicose e galactose e até mesmo óleos vegetais (GELMI *et. al.*, 2000; MACHADO *et. al.*,

2001; SHUKLA, CHAND e SRIVASTAVA, 2005). A influência das fontes de carbono no metabolismo do fungo produtor do GA3 torna-se clara quando se observa o decréscimo nas concentrações dessa fonte (glicose) com o aumento da produção de GA3 e posterior estabilização da curva.

3.5.5 Fontes de Nitrogênio

Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas em relação ao seu efeito sobre a produção de GA3. São consideradas fontes de nitrogênio favoráveis o nitrato de amônio, o sulfato de amônio, o cloreto de amônio, a uréia, o tartarato de amônio e a água de maceração de milho (CHAVES-PARGA *et. al.* 2008; BERRIOS, PYLE e AROCA, 2010). Considerando-se que, na análise do experimento, os maiores valores propostos para as fontes de nitrogênio geraram também os maiores valores para a produção de GA3, corroborando, assim, as informações de Tudzynski, 1999.

3.5.6 Sais minerais

Os sais minerais exercem função chave na biossíntese de metabólitos secundários. Os compostos frequentemente utilizados nos processos de FES, para produção de GA3 por *Gibberella fujikuroi*, são Sulfatos de Magnésio, de Ferro e de Zinco, podendo chegar a concentrações de 5 g/L de solução de suplementação, bem como Fosfatos de Potássio (CHAVEZ-PARGA, 2008; BERRIOS, PYLE e AROCA, 2010; PEREZ-CORREA e AGOSIN, 2002; CORONA, SÁEZ e AGOSIN, 2005; RELIANCE LIFE SCIENCES PRIVATE LIMITED; 2008).

3.6 Extração e purificação do GA3

3.6.1 Purificação

O GA3 oriundo do processo de FES pode ser recuperado por adsorção ou por extração com solventes, purificado através de repetidas extrações líquido-líquido e concentrado em condições de vácuo (SHUKLA, SRIVISTAVA e CHAND, 2003). Dentre os solventes orgânicos que solubilizam o GA3, o acetato de etila é utilizado neste tipo de extração por ser imiscível em água. No processo de purificação Rachev *et. al.* (1993) relatam que utilizaram o processo de extração líquido-líquido com acetato de etila, para obtenção do cristal de GA3 do caldo fermentado. Mais recentemente, Rangaswamy, Mumbai e Balu (2008) purificaram o GA3 produzido por fermentação utilizando o processo de extração com acetato de etila e, a partir de sucessivas concentrações, por evaporação e posterior cristalização. Esse processo serviu para a extração do GA3 presente no filtrado obtido da extração com solução tampão fosfato adicionada ao meio de fermentação.

Rodrigues (2010) destaca que na fase sólida a extração dos compostos de interesse é retido por meio de um agente de sorção sólido e posterior eluição por solvente adequado. Dentre os agentes de sorção disponíveis, os mais utilizados são as alquil-sílicas, particularmente as C8 e as C18 (cadeias de 8 ou 18 átomos de carbono ligados covalentemente aos grupamentos silanol da sílica), ideais para sorção de compostos de média ou pouca polaridade (CHIMELLI, 2003). A utilização de carvão ativado para purificação de metabólitos produzidos por fermentação tem mostrado grande potencial para a extração de giberelinas (RODRIGUES, 2010).

O carvão ativado é um material carbonoso poroso. A aplicação dos materiais carbonosos porosos como adsorventes se baseia principalmente em suas propriedades texturais e em sua natureza química. As propriedades texturais do carvão ativado apresentam duas características importantes: tamanho de poro e a área superficial. Essas características definem a utilização do carvão ativado e sua capacidade de adsorver e dessorver moléculas. As propriedades físicas da superfície são descritas pela área superficial específica e porosidade, enquanto que

as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos sobre sua superfície (MORENO-CASTILLA, 2004; RODRIGUES, 2010).

3.6.2 Extração do GA3 do substrato sólido

A extração do GA3 produzido por FES é essencial para o procedimento de análise e validação da produção deste metabólito em substrato sólido. A extração utilizando solução tampão fostato, com pH igual a 7,4 ou 8,0 é frequentemente utilizada como precursora às análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrofotometria (MACHADO, 2002; BERRÍOS, ILLANES e AROCA, 2004; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012). A extração acidificada mostra-se eficiente para as análises em espectrofotômetro UV, com comprimento de onda de 254 nm, utilizando HCl para baixar o pH da solução de extração até pH 2,5 (BARENDSE *et. al.*, 1980; BANDELIER, 1997).

3.7 Análise do GA3

Para análise de GA3, produzido por *Gibberella fujikuroi*, foram desenvolvidos métodos rápidos e simples, dentre os quais se destaca a análise espectrofotométrica, utilizada nesta investigação. No entanto, os métodos de quantificação de GA3 originalmente estavam baseados em bioensaios realizados em plantas. Os bioensaios foram importantes na identificação das giberelinas, sendo requeridos frente à necessidade de altos níveis de especificidade e sensibilidade, mas não são adequados para monitoramento da produção de GA3 durante o processo de FES, quando diferentes giberelinas são sintetizadas e resultados rápidos são requeridos (RODRIGUES *et. al.*, 2009).

3.7.1 Método espectrofotométrico

O método espectrofotométrico proposto originalmente por Holbrook, Edge e Baily (1961) é o método mais simples e mais amplamente utilizado para determinação de GA3 em processos fermentativos, da mesma forma que é o método que melhor compactua com a extração e purificação propostas nesta investigação. O uso de FES para a produção de GA3, usando o fungo *Gibberella fujikuroi*, contém muitos compostos que são fortemente absorvidos na faixa de comprimento de onda de ultravioleta. Sendo assim, o pré-tratamento da amostra de leitura, para a análise em espectrofotometria em UV, a 254 nm, se faz necessário.

O método espectrofotométrico baseia-se na conversão do GA3 em ácido giberelênico, pela ação de ácidos fortes. A absorbância do ácido giberelênico é medida em 254 nm (HOLBROOK, EDGE e BAILY, 1961). A adição de HCl à amostra extraída do processo de FES leva o GA3 a reagir com este ácido forte, formando ácido giberelênico, que é absorvido na faixa UV, mais especificamente em 254 nm (BERRÍOS, ILLANES e AROCA, 2004). O fato de que a conversão do GA3 a ácido giberelênico é linear, isso torna a metodologia factível com a realidade desta pesquisa.

3.7.2 Outros métodos

Embora existam vários métodos para analisar a produção de GA3, interessa explicitar apenas aquele utilizado nesta pesquisa. Entre os outros métodos citados na literatura, encontram-se listados a análise fluorométrica, a análise espectrofluorodensitométrica, a cromatografia de camada delgada, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrometria de massa (EM). A exclusão desses métodos para a análise do GA3, formado no processo de FES, pelo fungo *Gibberella fujikuroi* se deve por razões tais como: indisponibilidade de equipamentos, incompatibilidade com os métodos de extração e purificação utilizados.

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizada uma cepa liofilizada do fungo *Gibberella fujikuroi*, cedida pelo *United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service* (USDA - ARS) da *ARS culture collection of National Center for Agricultural Research Unity* em Peoria, Illinois, nos Estados Unidos da América. A cepa foi, então, inoculada em tubos de vidro contendo o meio sintético elaborado conforme solução apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 . Composição do meio sintético.

Substrato	Concentração (g/L)
Glicose	10
Peptona	10
Extrato Levedura	7,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
MgSO ₄	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	1

Fonte: PARRA *et. al.*(2005); ZHANG *et. al.*(2012); SELBMANN *et. al.*(2002); YU *et. al.*(1998); KLAIC (2014).

Após 10 dias de manutenção em uma estufa sob temperatura de 28°C, deu-se início às repicagens em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar), seguindo procedimento descrito na Tabela 4. Em procedimento realizado em capela de fluxo laminar, o fungo já desenvolvido no meio de cultura sintético foi inoculado nas placas contendo o meio BDA. Feito isso, passados sete dias, parte das placas foram repicadas novamente, raspando-se o micélio com alça de platina,

em novas placas com meio BDA, enquanto a outra parte das placas foi armazenada em uma geladeira a 4°C, para futuras repicagens.

Tabela 4 . Composição do meio BDA.

1	Infusão de 200 g de batata
2	Adição de 20g de ágar
3	Adição de 20g dextrose
4	Adição de água até 1000 mL
5	Correção do pH para 5,0

Fonte: ROSSELL, (1972).

4.2 Substratos

Os substratos utilizados neste trabalho para a produção dos meios de cultura para os ensaios das Fermentações em Estado Sólido (FES) foram o Resíduo de Cervejaria Úmido (RCU) e o Farelo de Arroz Bruto (FAB). O primeiro foi doado pela Santa Mate Ind. e Com. Ltda., e o segundo, fornecido pela empresa J. Fighera e Cia. Ltda. O RCU passou por processo de secagem em estufa, a uma temperatura de 50°C, por um período de três dias.

Os ensaios de FES foram realizados em béqueres de vidro de 400 mL, todos contendo 50 g de substrato, em diferentes proporções de composição, conforme descrito no item 4.4 e solução de suplementação, elaborada de acordo com a composição descrita na Tabela 5.

Tabela 5 . Composição da solução de suplementação.

Substrato	Concentração (g/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,0
MgSO ₄	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,2

Fonte: PARRA *et. al.*(2005); ZHANG *et. al.*(2012); SELBMANN *et. al.*(2002); YU *et. al.*(1998); KLAIC, (2014).

Os béqueres contendo o substrato, bem como a solução de suplementação e demais materiais necessários para este caso, eram autoclavados por 30 min a 121° C e levados à capela para que, então, o inóculo, preparado conforme item 4.3, fosse adicionado ao meio de cultura, a uma taxa de inóculo de 15 % em volume/massa (KUMAR e LOSANE 1990).

Os ensaios realizados com FAB e RCU foram realizados em uma estufa vertical, com a temperatura em 28° C. Com o objetivo de manter a umidade elevada dentro da estufa foi realizado o insuflamento de ar borbulhado em recipiente contendo água destilada.

A atividade da água dos resíduos agrícolas utilizados como substrato foi medida empregando equipamento AquaLab LITE. Essa variável foi avaliada para teores de umidade dos substratos na faixa de 30 a 70%. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em cada béquer contendo FAB ou RCU foi adicionado água e deixados em repouso por 24 horas, após, as amostras eram retiradas e analisadas no equipamento supracitado.

4.3 Produção do inóculo de *Gibberella fujikuroi*

A cepa de *Gibberella fujikuroi* foi cultivada em placas de Petri contendo meio BDA e incubada em estufa apropriada a 28°C por 168 horas. Após esse período, certo número de discos, contendo o micélio do fungo em questão, foram retirados do

meio de cultivo através do uso de tubos de ensaios de diâmetro igual a 12 mm. Os discos foram depositados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio formado pela solução descrita anteriormente na Tabela 1. O cultivo do inóculo foi conduzido a 28°C sob agitação de 120 rpm por 96 horas (RODRIGUES, 2009).

De forma a definir o tempo e o número de discos a serem utilizados para a preparação do inóculo foram realizados ensaios em frascos Erlenmeyer de 100 mL. Cada um dos frascos continha 30 mL de meio, formado pela solução descrita na Tabela 1. Para tanto, foram depositados dois e três discos, retirados das placas de Petri contendo as culturas de *Gibberella fujikuroi*. Após, os ensaios foram feitos em estufas, durante tempos de 24 a 96 h, a 28 °C e 120 rpm. A determinação de biomassa foi realizada pelo método de matéria seca, no qual o fermentado foi filtrado e posteriormente seco em estufa a 80°C até peso constante.

4.4 Planejamento experimental para a produção de GA3 por FES

Todos os ensaios englobados neste tópico do trabalho foram realizados em béqueres de vidro de 400 mL, em estufas verticais, com insuflamento de ar através de recipiente contendo água de forma a tornar a umidade no ambiente alta. A temperatura foi fixada em 28° C.

4.4.1 Análise da influência da umidade e da composição do substrato na produção de GA3 por FES

Nesta etapa do trabalho, foi definida a preparação do meio de cultura. As variáveis estudadas, para tanto, foram: umidade inicial do meio de cultura, composição do meio (massa de FAB/massa total de substrato, definida como a soma das massas de FAB e RCU). O planejamento experimental foi linear do tipo 2ⁿ e três repetições no ponto central, para duas variáveis, totalizando sete ensaios nesta etapa. A tabela 6 apresenta o delineamento experimental. O processo fermentativo ocorreu por um período de sete dias.

Tabela 6 . Planejamento experimental linear 2ⁿ para duas variáveis com três repetições no ponto central para umidade e composição do meio.

Variável	-1	0	+1
Umidade %	50	60	70
Composição do meio (% de FAB)	30	50	70

Fonte: Autor.

4.4.2 Análise da influência da glicose e do nitrogênio na produção do GA3 por FES

Para o estudo da produção de GA3 por FES, as variáveis trabalhadas nesta etapa foram as seguintes: teor de glicose no meio de cultura (g/L) e teor de nitrato de amônio no meio de cultura (g/L). O planejamento experimental foi do tipo DCCR para duas variáveis, totalizando 11 ensaios. Na tabela 7 estão os níveis utilizados para cada variável. O processo de FES ocorreu por um período de sete dias.

Tabela 7 . Planejamento Experimental DCCR para teor de glicose e teor de nitrato de amônio.

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Teor de glicose no meio de cultura (g/L)	0,00	11,63	40,00	68,37	80,00
Teor de nitrato de amônio no meio de cultura (g/L)	0,00	0,73	2,50	4,27	5,00

Fonte: Autor.

4.5 Análise da cinética da produção do GA3 por FES

O estudo da cinética da produção de GA3 por FES consistiu em realizar ensaios em duplicata, por doze dias. As condições para realização do experimento de cinética a produção de GA3, com os substratos RCU e FAB, foram as melhores condições de produtividade definidas para as variáveis dos planejamentos experimentais dos itens 4.4.1 e 4.4.2.

As amostras a serem extraídas, purificadas e analisadas começaram a ser retiradas, a partir do terceiro dia, totalizando, assim, para este caso, 20 experimentos. As amostras foram preparadas contendo os substratos estudados neste trabalho, de acordo com os melhores resultados obtidos em cada uma das duas etapas anteriores.

Além das análises de produção de GA3, a variação da concentração dos açúcares simples empregados como fonte de carbono na análise da cinética de produção do GA3 foi realizada através do método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

4.6 Extração e purificação do GA3

A extração do metabólito, objeto deste trabalho, foi realizada com tampão fosfato pH 7,4 (razão 3:1 volume/massa), agitação 20 min a 200 rpm, filtrado e novamente extraído (MACHADO *et. al.*, 2004; MACHADO *et. al.*, 2002; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012). Feito isso, acetato de etila foi adicionado na proporção 1:1 v/v, em funis de separação, até que duas fases bem distintas se formassem: a fase aquosa, com a solução tampão e a fase mais leve, contendo o acetato de etila e o composto de interesse. Após a separação, um evaporador rotatório (rota-evaporador) foi usado para evaporar o solvente acetato de etila, a 40°C e 8 rpm, até que restasse equivalente a uma pequena parcela do volume inicial (5%), dentro do balão contendo o ácido giberélico cristalizado, (RANGASWAMY, MUMBAI e BALU (2008), RODRIGUES, 2009). Na sequência, realizou-se a adição de 10 mL de etanol ao conteúdo do balão de evaporação

4.7 Análise da produção de GA3

Procedendo à análise da produção de GA3 pelo processo de FES, 1 (um) mL da amostra obtida na etapa de extração e purificação foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com 9 mL de HCl 3,75 M. Como branco, foi tomado 1 mL de etanol somado a 9 mL de HCl 3,75 M. Após 1 hora de reação, foi realizada a leitura no comprimento de onda 254 nm em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu UV 2600 (HOLBROOK, EDGE e BAILY, 1961; BERRÍOS, ILLANES e AROCA, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados para o estudo da produção de GA3, em substratos de RCU e FAB, foram obtidos através de Planejamento Experimental linear e rotacional, definidos conforme a necessidade de visualizar a influência das variáveis de interesse no processo de Fermentação em Estado sólido, de modo a verificar sua influência, individualmente ou como um todo, sobre a produtividade de GA3. Ao passo que, as investigações envolveram, além dos ensaios dos processos de FES, a extração, purificação e análise do metabólito em questão, tal como foi esmiuçado na metodologia presente no capítulo 4.

É importante mencionar que, observando-se unicamente o objetivo principal, notadamente, a produção de GA3 por meio do fungo *Gibberella fujikuroi*, cultivado em meio de fermentação composto dos substratos RCU e FAB, os resultados foram obtidos em escala de bancada.

5.1 Atividade de água dos substratos

A análise de atividade de água (a_w) dos substratos que foram utilizados no processo de FES, como meio de fermentação, ou seja, o RCU e o FAB, está demonstrada na Figura 5. Os resultados da medição de a_w são apresentados em função do teor de umidade presente nas amostras. Pode-se constatar que a atividade de água para todas as amostras foi alta em todos os valores de umidade investigados, sendo que a amostra de FAB apresentou a_w superior ao RCU no intervalo de 30% a 70% de umidade, atingindo valores muito próximos para valores superiores a 70% de umidade. Corroborando o resultado proposto por Qian, Preez e Killian (1994) para a análise de a_w e umidade em substratos sólidos.

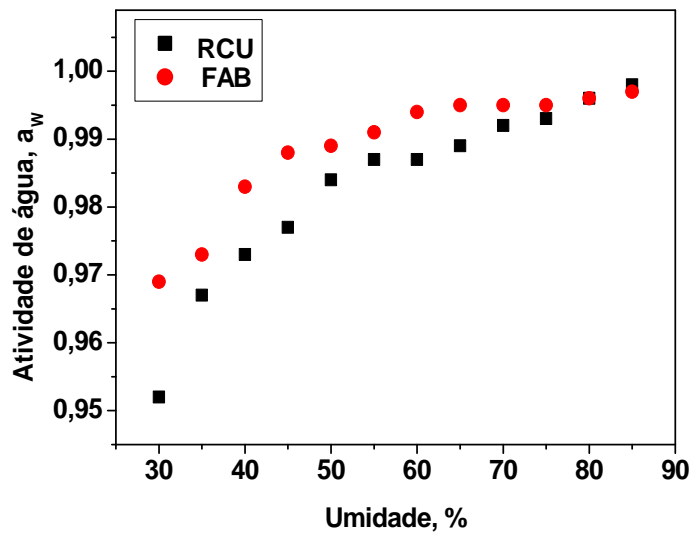


Figura 5 - Influência da umidade na atividade de água dos substratos RCU e FAB.

Fonte: Autor.

5.2 Preparo do inóculo

O inóculo empregado no processo de FES foi determinado, com base no tempo e número de discos, contendo a cultura do fungo, extraídos das Placas de Petri, conforme definido pela metodologia descrita no item 4.3. A Figura 6 apresenta os resultados de massa seca obtidos nos ensaios, empregando dois e três discos, em tempos de fermentação na faixa de 24 a 96 horas. Pode-se observar que o número de discos empregados no processo de determinação do inóculo afeta a quantidade de massa seca obtida, para todos os tempos de fermentação utilizados. Analisando-se a Figura 6, pode-se inferir que quantidade de massa seca formada por litro é maior nos ensaios realizados com três discos.

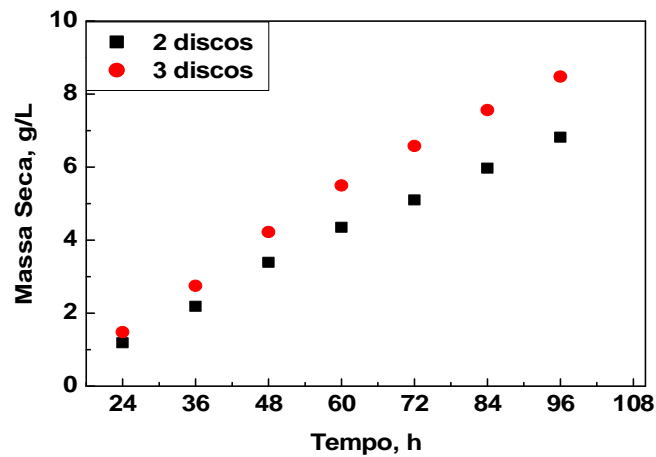


Figura 6 - Influência do tempo de fermentação na quantidade de massa seca formada por litro de meio de fermentação. Condições: Glicose: 80 g/L; N= 5 g/L; Temperatura = 28°C; agitação: 120 rpm.

Fonte: Autor.

A partir das informações de massa seca formada por litro de meio fermentado para diferentes tempos de reação, empregando dois ou três discos, foi calculada a taxa de formação de massa seca em função do tempo e volume.

Os valores obtidos são apresentados na Figura 7. Pode-se verificar que para os dois ensaios a taxa máxima de formação atinge um ápice após 48 horas de fermentação, e tende a cair para tempos maiores de fermentação. Tal comportamento pode ser atribuído ao decréscimo da concentração de glicose no meio de fermentação.

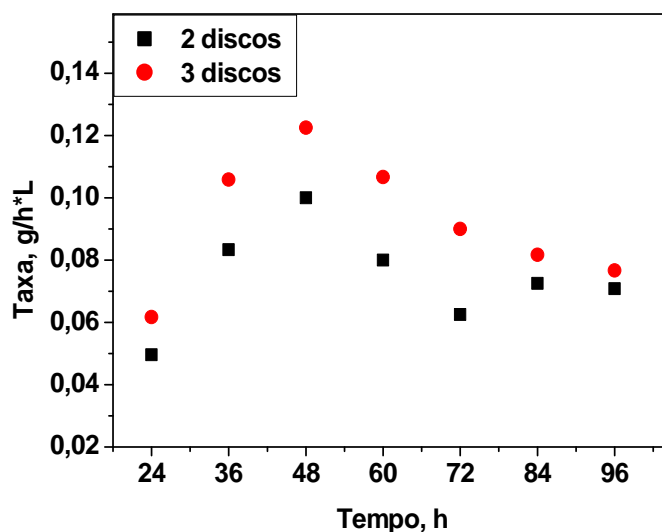


Figura 7 - Influência do tempo de fermentação na taxa de formação de massa seca no meio de fermentação.

Fonte: Autor.

Nos ensaios de fermentação no estado sólido foi padronizado que a quantidade de massa seca no inóculo deveria ser de no mínimo 6,0 gramas por litros (MACHADO *et. al.*, 2004). Assim, na sequência do trabalho, a condição para obtenção do inóculo foi determinada como sendo 96 horas de fermentação empregando três discos, obtidos das Placas de Petri contendo a cultura do fungo *Gibberella fujikuroi*.

5.3 Estudo da influência da umidade e da composição do substrato na produção de GA3 por FES

A sequência do trabalho consistiu em determinar qual o melhor percentual de FAB misturado ao RCU e qual o teor de umidade do meio que privilegia a produção de GA3. Para tanto, foi proposto um Planejamento Experimental linear do tipo 2ⁿ três repetições no ponto central, conforme Tabela 6. A Tabela 8 apresenta o planejamento experimental conjuntamente com a quantidade de GA3 formado após

7 dias de fermentação. Os resultados experimentais foram analisados empregando o software Statistic 8.0. Os ensaios foram realizados, conforme citado na metodologia, a uma temperatura de 28°C, em estufa vertical, com insuflamento de ar umedecido.

Tabela 8 - Planejamento experimental para determinar o efeito da umidade e composição do meio.

Ensaio	Composição do meio, % de FAB	Umidade,%	Produção de GA3, g/kg
1	30	50	7,10
2	70	50	4,87
3	30	70	9,22
4	70	70	5,58
5	50	60	5,48
6	50	60	5,33
7	50	60	5,78

Fonte: Autor.

A partir da análise dos dados, foram obtidas as Figuras 8 e 9, das quais pode-se constatar que tanto o percentual de FAB adicionado ao RCU como o teor de umidade do meio de fermentação foram significativos na produção de GA3 formado no processo de FES. Além disso, a elevação do percentual de FAB acarretou em redução na quantidade de GA3 formado, isto é, a elevação do teor deste substrato ao substrato RCU é prejudicial à formação do metabolito desejado. Tal comportamento pode ser atribuído à compactação do meio, ocasionando a diminuição da porosidade, já que o FAB torna-se muito compactado quando na presença de água, prejudicando a oxigenação do meio de FES.

De modo a se fazer uma abordagem comparativa, Shukla, Chand e Srivastava (2005), utilizando outro subproduto oriundo da indústria do arroz, a farinha de arroz, para investigar a produção de GA3 em FSub, alcançaram uma produtividade máxima 1,68 g/L de meio. Corroborando a afirmação da patente do Council of Scientific and Industrial Research (2008): a FES pode atingir resultados de 2 a 8 vezes maiores que a FSub, em termos de produtividade de GA3.

Com relação à umidade do meio constatou-se que a elevação da umidade do meio favoreceu a formação do GA3 no meio de fermentação. Este resultado contraria o exposto por Kumar e Losane (1990), onde a maior produtividade de GA3 foi alcançada com 50% de umidade, para sete dias de fermentação, porém utilizando como substrato farelo de trigo. Já Corona, Sáez e Agosin (2005) e Qian, Preez e Killian (1994) sugerem um resultado que vai ao encontro do constatado neste trabalho, onde a maior produção de GA3 é atingida com o maior teor de umidade do meio estudado. Assim, nota-se a importância da investigação da relação da atividade de água com o teor de umidade dos substratos em questão.

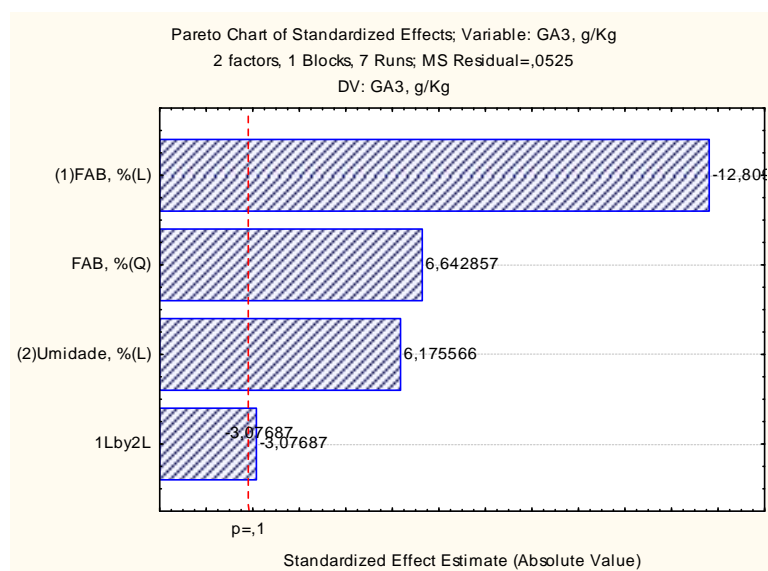


Figura 8 - Análise da influência do percentual de FAB e da umidade do meio de fermentação na quantidade de GA3 formado.

Condições: Glicose: 80 g/L; N= 5 g/L; Temperatura = 28°C; tempo = 7 dias.

Fonte: Autor.

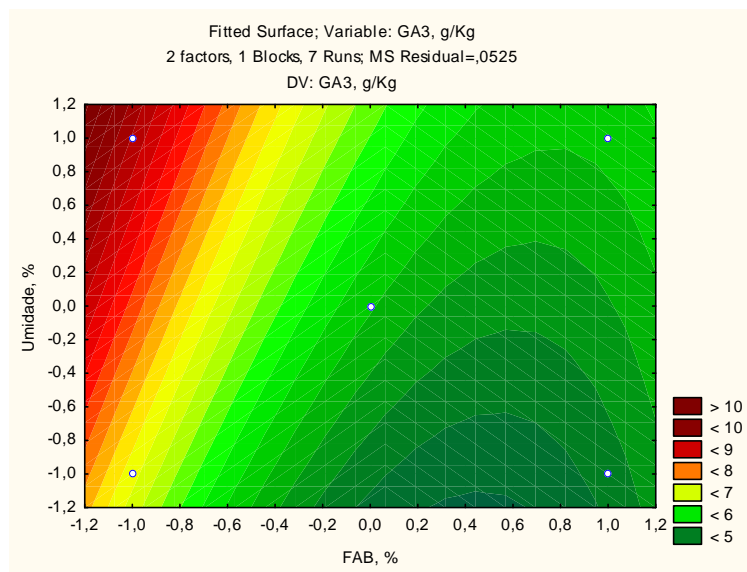


Figura 9 - Superfície de resposta para o Planejamento Experimental das variáveis composição do meio e umidade.

Fonte: Autor.

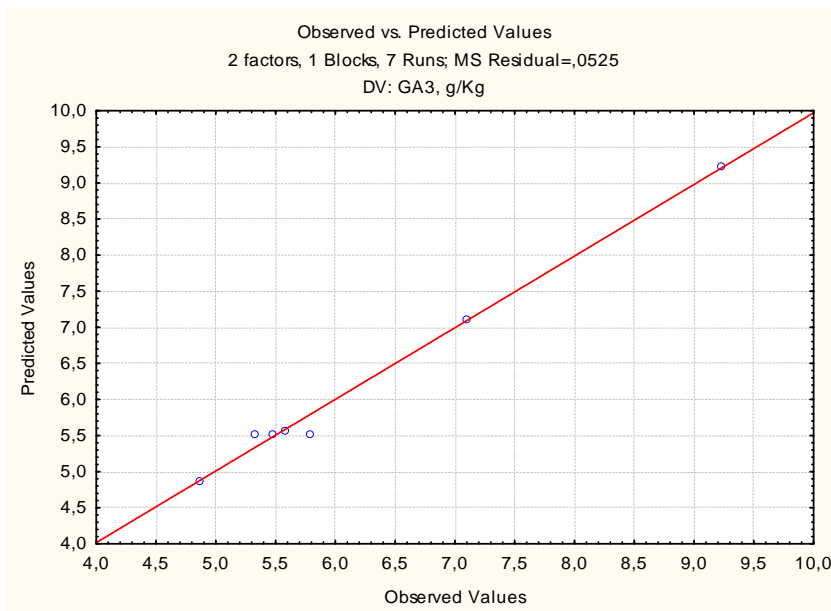


Figura 10 - Correlação entre os valores preditos e observados de produção de GA3 no processo de FES.

Fonte: Autor.

A Figura 10 apresenta a correlação obtida entre a quantidade de GA₃ formado por meio experimental e os valores sugeridos pelo modelo predito pelo *software* usado. A boa correlação entre estes valores demonstra que o modelo predito converge com os resultados experimentais.

5.4 Estudo da influência da glicose e do nitrogênio na produção do GA₃ por FES

Nesta etapa do trabalho a determinação da concentração de glicose, fonte de carbono, e nitrato de amônio, fonte de nitrogênio, por litro de solução adicionada aos substratos sólidos, tornou-se o foco, sendo que o ponto de partida para os ensaios foram os melhores resultados encontrados na seção anterior, conforme a figura 9, teor de umidade de 70 % e teor de FAB na composição do meio igual a 30 %. Tendo em vista o exposto, foi realizado um Planejamento Experimental do tipo DCCR para duas variáveis, conforme demonstrado pela Tabela 7. As condições que os ensaios foram realizados foram determinadas, segundo exposto na metodologia.

A Tabela 9 apresenta o planejamento experimental com os valores das variáveis empregadas e a concentração de ácido giberélico obtido nos onze ensaios.

Os dados experimentais foram analisados matematicamente empregando o *software* Statistic 8.0. Observando-se os gráficos gerados a partir desta análise, nas Figuras 11 e 12, a maior significância foi verificada para a variável concentração de Nitrato de Amônio, tanto linear como quadraticamente. Conclui-se, também, que as maiores concentrações de GA₃ foram verificadas com a adição de 5 g/L de NH₄NO₃ ao meio de FES, ou seja, na maior concentração de fonte de nitrogênio proposta neste experimento.

Tabela 9 - Planejamento de experimento para avaliar a influência da concentração de glicose e nitrogênio na produção de GA3 por fermentação no estado sólido.

Ensaio	Teor de glicose, g/L	Teor de N, g/L	Produtividade de GA3, g/kg
1	11,63	0,73	5,30
2	68,37	0,73	6,10
3	11,63	4,27	8,00
4	68,37	4,27	8,00
5	0,00	2,50	5,30
6	80,00	2,50	5,60
7	40,00	0,00	5,30
8	40,00	5,00	9,20
9	40,00	2,50	6,10
10	40,00	2,50	6,50
11	40,00	2,50	6,60

Fonte: Autor.

A presença de nitrogênio oriundo de sais amoniacais ou nitratos, em concentrações relativamente baixas, afeta de forma marcante a formação de ácido giberélico (BORROW *et. al.*, 1964; TUDZYNSKI, 1999; CHAVEZ-PARGA, 2008;; FUSKA *et. al.*, 1961; KUMAR e LONSANE, 1989; BERRÍOS, PYLE e AROCA, 2010). A produção significativa de GA3 por parte das células se inicia após a identificação de consumo de boa parte das fontes de nitrogênio disponíveis no meio de FES, já que o comportamento do fungo em questão é muito semelhante aos demais fungos e leveduras, que estocam nitrogênio intracelular, até que todo o estoque extracelular esteja consumido (CHAVES-PARGA *et. al.* 2008 e GELMI, PEREZ-CORREA e AGOSIN, 2002).

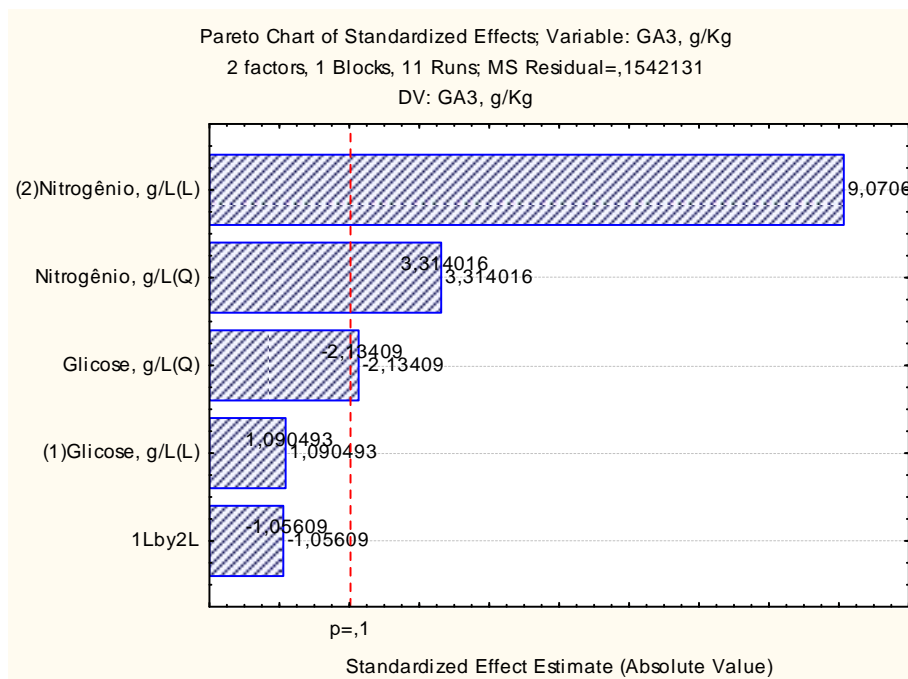


Figura 11 - Análise da influência dos teores de glicose e nitrogênio na quantidade de GA₃ formado por FES.
 Condições: Temperatura = 28 °C; tempo = 7 dias; substrato = 30% de FAB e 70% de RCU.

Fonte: Autor.

Já o efeito linear do teor de glicose adicionado ao meio de FES não foi significativo nos valores obtidos para a formação de GA₃. Esse comportamento é corroborado pelas quantidades de amido presentes nos substratos RCU e FAB, conforme identificado nas tabelas 1 e 2, suprimindo a necessidade de carbono necessário ao crescimento e manutenção do microrganismos no meio de FES.

Analisando-se os valores de produtividade, na Tabela 10, que variam entre 5,3 a 9,2 g/kg de substrato, claramente nota-se que estes valores estão de acordo com os propostos pelos rendimentos de produtividade e GA₃ por FES, propostos na literatura. Lançando-se mão do uso de substratos como os resíduos do processamento de café, de frutas cítricas, de trigo, de mandioca, produções que variam de 0,1 a 5,0 g/kg de substratos foram relatadas (RODRIGUES *et. al.*, 2009; MACHADO *et. al.*, 2001, PASTRANA *et. al.*, 1995; MACHADO *et. al.*, 2002).

A Figura 13 demonstra a existência de uma correlação relevante entre os valores previstos pelo modelo predito e os dados obtidos do planejamento experimental realizado.

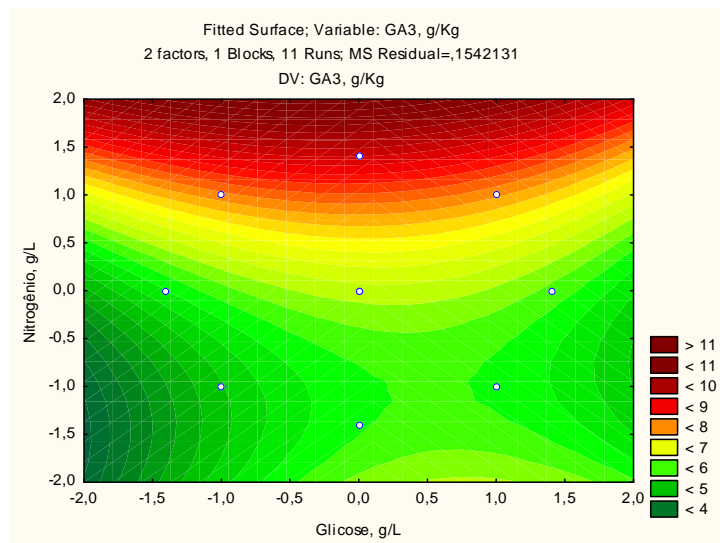


Figura 12 - Superfície de resposta para ensaios da influência da concentração de glicose e nitrogênio do meio de fermentação na quantidade de GA3 formado.

Fonte: Autor.

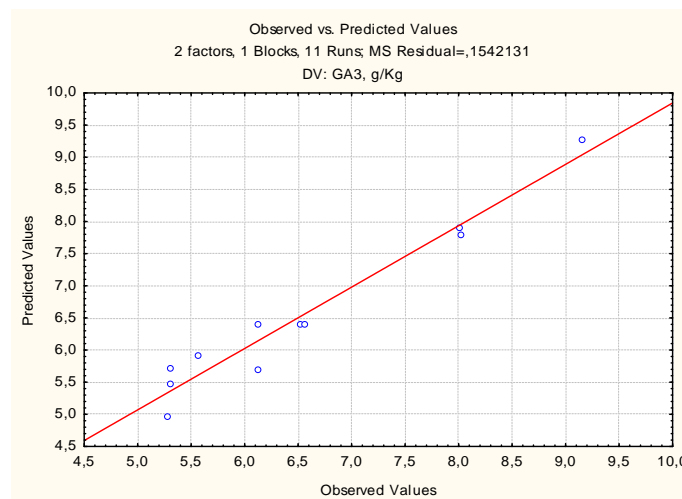


Figura 13 - Correlação entre os valores preditos e observados de produção de GA3 no processo de FES.

Fonte: Autor.

5.5 Cinética da produção de GA3

A cinética da produção de GA3 por FES, em meio de fermentação composto pelos substratos FAB e RCU, foi realizada através de experimentos em duplicata, por doze dias. As primeiras amostras foram analisadas no terceiro dia de processo, compondo um total de 20 análises, duas por dia. As amostras foram preparadas contendo os substratos estudados neste trabalho, de acordo com os melhores resultados obtidos nos planejamentos experimentais propostos.

Além das análises de produção de GA3, a variação da concentração dos açúcares simples empregados como fonte de carbono na análise da cinética de produção do GA3 foi realizada. Assim, deu-se origem às Tabelas 10 e 11 e às Figuras 14 e 15.

Através da análise da Figura 14, infere-se que o comportamento da produção de GA3, pelo fungo *Gibberella fujikuroi*, tende ao crescimento, atingindo um pico de produtividade de 10,10 g de GA3 por kg de substrato, no sétimo dia de processo, estabilizando-se a partir desse ponto, apresentando leve tendência a diminuição da concentração do metabólito no meio, até cerca de 9 g/kg no último dia de ensaios.

Os resultados supracitados são muitos similares às curvas propostas por Quian, Preez e Kilian (1994) e Gelmi, Perez-Correa e Agosin (2002) e Hollmann *et. al.* (1995), para a produção de GA3 por processo fermentativo utilizando *Gibberella fujikuroi*. Na patente requerida por Reliance Life Science Private Limited (2008), observa-se nitidamente uma curva com pico de produção no sexto dia, com acúmulo máximo do metabólito no sétimo dia, para que então se inicie a tendência de queda na concentração de GA3 no meio de FES. Nesse último caso, as produções atingem 225 g/kg, quando usado torta de pinhão-manso e até 39 g/kg de substrato contendo farelo de trigo.

Da mesma forma, Chavez-Parga *et. al.* (2008) e Rodrigues *et. al.* (2009) detalham curvas de produção do metabólito de interesse, apresentando um rápido aumento na sua produção nos primeiros sete dias, ocorrendo um pico, geralmente entre o sexto e o oitavo dia, e logo depois uma tendência à diminuição do GA3 presente no meio.

Tabela 10 - Produção de GA3, em g/Kg, para ensaios realizados em Erlenmeyers em diferentes períodos de tempo.

Tempo, dias	Produção de GA3, g/kg
3	3,00
4	4,60
5	6,51
6	8,58
7	9,92
8	10,10
9	9,59
10	9,54
11	9,38
12	9,01

Fonte: Autor.

Tabela 11 - Influência do tempo de fermentação na massa de glicose e percentual de consumo de glicose.

Tempo, dias	Consumo de glicose, g	Taxa de consumo de glicose, %
0	8,36	0,00
3	7,70	7,95
4	7,02	16,03
5	5,95	28,83
6	3,97	52,48
7	3,12	62,68
8	2,99	64,27
9	2,36	71,82
10	2,13	74,56

Fonte: Autor.

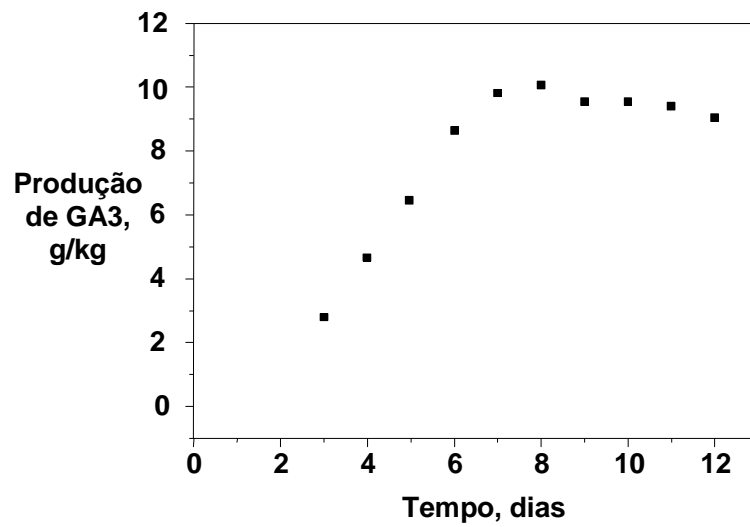


Figura 14 - Influência do tempo de fermentação na quantidade de GA3 formado.

Fonte: Autor.

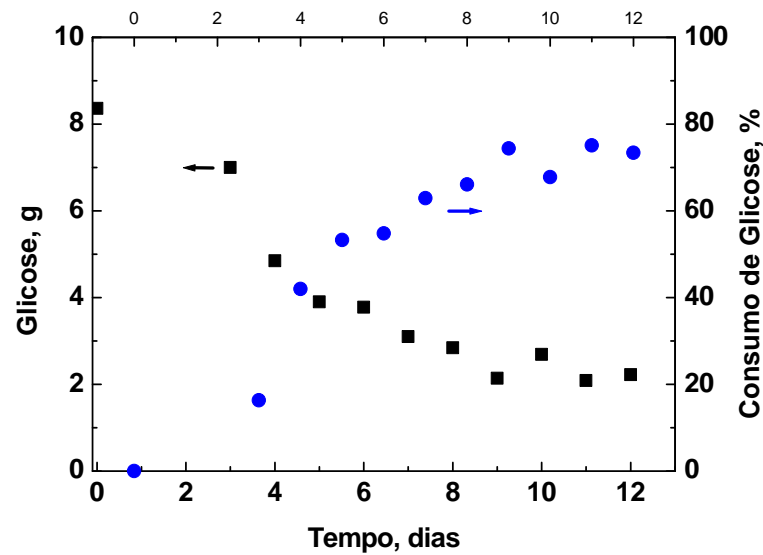


Figura 15 - Influência do tempo de fermentação no teor de glicose e percentual de glicose consumida.

Fonte: Autor.

Da análise da Figura 15, constata-se que os microrganismos presentes no meio de FES consomem o açúcar presente no meio, fazendo com que ocorra a redução no teor desta fonte de carbono, conforme aumenta o tempo de fermentação. Denotando assim, uma diminuição da massa de glicose da ordem de 63%, diminuindo de 8,36 g a 3,12 g em sete dias de processo. Decorrido esse período, o consumo de glicose no meio passa a acontecer a uma taxa bastante baixa.

Comparando-se as Figura 14 e 15, conclui-se que a produção de GA3 no meio fermentativo foi interrompida pela escassez de fontes de carbono, disponível para o crescimento e manutenção celular do fungo *Gibberella fujikuroi* no meio de FES.

6. CONCLUSÃO

A análise da atividade de água dos substratos, Farelo de Arroz Bruto e Resíduo de Cervejaria Úmido, elucidou a faixa de umidade a ser trabalhada no primeiro planejamento experimental, nos níveis de teor de umidade do meio fermentativo de 50, 60 e 70 %. Partindo-se desse ponto, o planejamento experimental linear para duas variáveis, teor de umidade e composição do meio, definiu que a melhores produção de GA3, nas condições determinadas, ocorreu para a faixa umidade máxima, igual a 70%, e composição do meio com 30% do substrato FAB e 70% do substrato RCU, em massa, ou seja, o menor teor de FAB proposto. Além disso, infere-se também, que os resultados obtidos, variando entre 5,33 e 9,22 g/kg de substrato, são muito significativos, quando comparados aos propostos na literatura, para produção de GA3 por FES.

A influência dos teores de glicose, como fonte de carbono e do teor de Nitrato de Amônio, a fonte de Nitrogênio, adicionados ao meio de FES, partindo-se de condições definidas, dentre as quais, composição do meio em 30% de FAB e 70% de RCU e umidade a 70%, foi estudada propondo-se um planejamento experimental do tipo DCCR para duas variáveis. Dessa forma, a melhor produtividade de GA3 pelo fungo *Gibberella fujikuroi* foi encontrada para o teor de glicose intermediário determinado, igual a 40 g/L de solução adicionada ao meio, ao teor máximo da fonte de N, o NH_4NO_3 , em 5g/L de solução de suplementação. Chegando-se, assim a um valor de produtividade de GA3 de 9,20 g/kg de substrato.

A cinética da produção de GA3, em meio de fermentação sólido, composto dos substratos RCU e FAB foi proposta, com os dados das variáveis definidos segundo os melhores resultados obtidos nos dois planejamentos experimentais citados anteriormente. Evidentemente, para os valores de composição do meio fermentativo com 30% de FAB e 70% de RCU, umidade igual a 70%, teor de glicose de 40 g/L e teor de NH_4NO_3 em 5 g/L. Por fim, a investigação da cinética resultou em um comportamento de crescimento na produção de GA3, com o pico no sétimo dia, produzindo 10,10 g/Kg de substrato, e posterior tendência à estabilização na produtividade.

Por fim, os modelos experimentais encontrados nesta investigação demonstraram relevância, e o uso dos substratos agroindustriais selecionados, FAB e o RCU, geraram resultados, que nas condições investigadas resultaram em produtividades que variam na faixa de 3 a 10 g/kg de substrato. Sendo assim, o processo de Fermentação em Estado Sólido, empregando resíduos agroindustriais, tais como o RCU e o FAB, como meio para o fungo *Gibberella fujikuroi* é um caminho viável como nova proposta para a produção de GA3. Para tanto, deve-se deixar claro que, apesar dos resultados promissores, novas investigações devem ser realizadas, visto que há perspectivas no aumento da produtividade de GA3 por FES.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para estudos futuros, necessários e importantes, a complementação do apresentado destacam-se:

- Realizar a cinética da produção de GA3, em FES, com substratos de FAB e RCU em biorreatores de escala piloto;
- Realizar a transferência de escala à produção de GA3, em FES, com substratos de FAB e RCU;
- Estudar a extração de GA3 produzido com meio ácido, a purificação com extração em meio sólido, como o carvão ativado e a análise em CLAE;
- Estudar a otimização de outras variáveis que influenciam no processo de produção de GA3, para estes mesmos substratos.

Tais estudos auxiliarão na formação de um inventário da Produção de GA3 em FES, em termos de diversificação de tecnologia e viabilidade técnica e econômica para implantação do processo em escala industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) . **Estrutura química do GA3** (2007). Disponível em www.anvisa.gov.br. Acessado em 10 set. 2014.

BANDELIER S., RENAUD R., DURAND A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, v.32, p.141-145, 1997.

BERRÍOS J., ILLANES A., AROCA G. Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. **Biotechnology Letters**. V. 26, p.67-70, 2004.

BERRÍOS, J., PYLE, D. L., AROCA, G. Gibberellic acid extraction from aqueous solutions and fermentation broths by using emulsion liquid membranes. **Journal of Membrane Science**. V. 348, p. 91-98, 2010.

BORROW A., BROWN S., JEFERRYS E.G., KESSEL R.J.H., LLOYD E.C., LLOYD P.B. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 10, p. 407-44, 1964;

BUCHANAN B.B, GRUISSEM W., JONES R.L. (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**. 2000.

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

CHAVEZ-PARGA, M.C.; GONZALEZ-ORTEGA, O.; NEGRETE-RODRÍGUEZ, M.L.X.; VALLARINO, I.G.; ALATORRE, G.G.; ESCAMILLA-SILVA E.M. Kinetic of the gibberellic acid and bikaverin production in an airlift bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 855. 860, 2008.

CHIMELLI M. Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicosilação. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Safra 2013/2014. V.1, n.3, 2013.

CORONA A., SANCHEZ D., AGOSTIN E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. **Process Biochemistry**. V. 40, p. 2655, 2005.

COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH. Dewanand, Benishyam Satpute; Dattatraya, Mahadeo Dharmadhikari. **A Process for Production of Gibberellic Acid (GA3) in High Yield**. Int. CA01N43/00. IN n. 2006DE00649A. 10 Mar. 2006. 21 Nov. 2008. Nova Delhi, 2008.

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

DAVIES P.J (Ed.). **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!**, Kluwer Academic, Netherlands. 2004.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Utilização do farelo de arroz**. 2004.

FUSKA J., KUHR I., PODOJIL M., SEVCIK V. The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submersive cultivation of *Gibberella fujikuroi*. **Folia Microbiol.**v. 6, p. 18, 1961.

GELMI C., PÉREZ-CORREA R., GONZÁLEZ M., AGOSIN E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**.V. 35, p.1227-33,2000.

GELMI C., PÉREZ-CORREA R., AGOSIN E. Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 1033-40, 2002.

HOLBROOK A, EDGE W, BAILEY F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. **Adv. Chem. Ser.** V. 28, p. 159 - 167, 1961.

HOLLMANN D., SWITALSKI J., GEIPEL S., ONKEN U. Extractive fermentation of Gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. **Journal Ferment. Bioeng.** V. 79, p. 594 - 600, 1995.

JEFFERYS, E. G. The gibberellin fermentation. **Advances in Applied Microbiology**. V. 13, p. 283-316, 1970.

JORGE, K. Estabilidade sensorial e físico-química da cerveja: importância das matérias primas, processo e manipulação do produto final. 2003. 211 f. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** . Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

KLAIC, R. Produção de Bioherbicida por Processos de Fermentação a partir do Fungo *Phoma* sp. Santa Maria, 2014. 123 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)** . Universidade federal de Santa Maria, 2014.

KUMAR P.K.R., LONSANE B.K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**. v. 34, p. 29-139,1989.

KUMAR, P. K. R., ; LONSANE, B. K.. Solid state fermentation: Physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1990

LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. The Fusarium Laboratory Manual. Illustrated by Suzanne Bullock. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, U.S.A. 2006. First edition.

LU Z . X, Xie Z . C, Kumakura M. Production of gibberellic acid in *Gibberella fujikuroi* adhered onto polymeric fibrous carriers. **Process Biochemistry**. 1995; 30:661-5.

MACHADO, C. M. M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bioresíduos da agroindústria do café. Curitiba, **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química)** . Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2000.

MACHADO C.M.M., OLIVEIRA B.H., PANDEY A., SOCCOL C.R. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. **In: Book on Coffee Biotechnology and Quality**, Sera, T., Soccol, C.R., Pandey, A. and Roussos, S. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 2001. p 401-8.

MACHADO C.M.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico . GA3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). **Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos** - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2002.

MACHADO C.M.M., SOCCOL C.R.; PANDEY A. Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 102, p. 179-192, 2002.

MACHADO C.M.M., OISHI B., PANDEY A., SOCCOL C.R. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. **Biotechnology Progress**. 2004; 20:1449-53.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORENO-CASTILLA C. *et al.* Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**.v.42, 83-94 2004.

OLIVEIRA. J. Produção de Ácido Giberélico por Fermentação Submersa e por Fermentação no Estado Semissólido em Diferentes Modelos de Biorreatores Utilizando Polpa Cítrica. Curitiba, 129 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ORTHOEFER, F. T. Rice bran oil: Healthy lipid source. **Food Technology**, v. 50, n.12, p. 62-64, 1996.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**. 2000, V. 74, p. 81-87.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 2000a, 74, 69-80.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**. 2000b, 74, 81-87.

PARRA, R., ALDRED, D, MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 37, p. 704-711, 2005.

PASTRANA L.M., GONZÁLEZ M.P., TORRADO A., MURADO M.A. A fed-batch culture model for improved production of gibberellic acid from a waste medium. **Biotechnology Letters**. 1995; 17: 263-8.

PIEROTTY C. D., OTÁLVARO A. A., ALGECIRA E.N. Producción de ácido giberélico utilizando biocatalizadores soportados en matrices porosas. **Universitas Scientiarum**, 11, p. 41-50, 2006.

QIAN, X.-M., DU PREEZ, J. C. e KILIAN, S.G. Factors affecting gibberellic acid production by *Fusarium moliniforme* in soli-state cultivation on starch. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10, p. 93 - 99, 1994.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. **In: International training Course on Solid State Fermentation**, FMS 97, 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

RANGASWAMY V., MUMBAI N., BALU G. Process for gibberellic acid production with *Fusarium moniliforme* strains. **United States Patent Application Publication**. 2008, Apr. 10, n US 2008/0085543 A1.

RELIANCE LIFE SCIENCE PRIVATE LIMITED. Rangaswamy, Vidhya; Guduri, Balu. **Process For Gibberellic Acid Production With *Fusarium Moniliforme* Strains**. Int. C12P17/04. US 435/126. US n. 20080085543A1. 12 Sept. 2007. 10 Apr. 2008, Washington, DC.

RODRIGUES, C. Produção, Extração e Purificação de Hormônio vegetal (Ácido Giberélico) por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do Extrato em Meiod e Cultivo de Bromélias *in vitro*. Curitiba, 180 f. **Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; TEODORO, J. OSS, J. F.; PANDEY A.; SOCCOL, C. R. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, p. 181-188, 2009.

RODRIGUEZ-REINOSO F.; MOLINA-SABIO M. Textural and chemical characterization of microporous carbons. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 76-77, 1998.

ROSSELL, C. E. V. Obtenção de Ácido Giberélico por Fermentação com *Gibberella fujikuroi*. Campinas, 1972. 125 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos)**. Universidade Estadual de Campinas, 1972.

SELBMANN, L., ONOFRI, S., FENICE, M., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide

of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology** 153, p. 585-592, 2002.

SHUKLA R., CHAND S., SRIVASTAVA A.K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 492-497, 2005.

SHUKLA, R.; SRIVASTAVA, A.K.; CHAND, S. Bioprocess strategies and recovery processes in gibberellic acid fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 269-278, 2003.

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

SOCCOL C.R. Biotechnological products from cassava roots by solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**. 1996a; 55:358-64.

SOCCOL, C. R. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido. **Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Engenharia Química**, 1996. Livro de resumos. Lavras, MG. 1996b.

SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil, **Biochemical Engineering Journal**. 2003; 13:205-18.

SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S., MEDEIROS A.B.P., KARP S.G., BUCKERIDGE M., RAMOS L.P., PITARELO A.P., FERREIRA-LEITÃO V., GOTTSCHALK L.M.F., FERRARA M.A, BON E.P.S., MORAES L.M.P., ARAÚJO J.A., TORRES F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4820-4825, 2010.

TAKAHASHI Y. Chemistry of plant hormones. CRC Press, Boca Raton; 1986. p. 277.

TUCKER G.A., ROBERTS J.A. (Eds.). **Plant Hormone Protocols**. Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2000.

TUDZYNSKI B., KAWAIDE H. e KAMIYA Y. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. **Curr. Genet**. v. 34, p. 234-240, 1998.

TUDZYNSKI B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **Appl. Microbiol. Biot**. v. 52, n. 3, p. 298-310, 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Soccol, Carlos Ricardo, *et. al.* Processo de Produção e Purificação de Ácido Giberélico, Seu Uso e Aplicações. Int. C12P27/00 A C12P1/06. BR n. 102012008883-5A2. 16 abr. 2012. 03 dez. 2013. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**. Brasília, DF, 2012.

VANDENBERGHE, L.P.S. Développement d'un procédé pour la production d'acide citrique par fermentation en milieu solide à partir de résidus de l'agro-industrie du manioc. Compiègne. 205 f. **These (Docteur de l'UTC)** - Université de Technologie de Compiègne, 2000.

VANDENBERGHE, L.P.S; SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; Lebeault, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *ASPERGILLUS niger*. **Bioresource Technology**. 74, n. 2, 175-178, 2000a.

VASS R.C., JEFFERYS E.G. Gibberellic Acid, In-Economic microbiology: secondary products of metabolism. V. 3, AH Rose (ed), **Academic Press**, p. 421-33, 1979.

YU,X., HALLETT, S. G., SHEPPARD, J, WATSON, A. K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes* X Yu1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, 333. 338, 1998.

ZHANG, L., WANG S-Q., LI, X-J.,ZHANG, A-L. ZHANG, Q., GAO, J-M. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma endophyte*. **Journal of Molecular Structure**, 1016, p. 72. 75. 2012.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
 CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
 DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
 FONE 055 3220 8254 FAX 055 3220 8353
 CEP: 97105 900 BAIRRO CAMOBI - SANTA MARIA - RS




Análise N° F176/2014

DADOS DA AMOSTRA	
Interessado:	USINA PILOTO DE ETANOL/UFSM
Produto:	Amostra RM
Data da fabricação:	08/05/2014
Data de validade:	
Remetido:	Pelo interessado
Análise solicitada pelo interessado:	Umidade, proteína, extrato etéreo, teor de amido e açúcares totais.
Endereço:	Colégio Politécnico - UFSCAR
Entrada da Análise:	15/05/2014

ANÁLISES	RESULTADO	RESULTADO
	Produto integral g%	Massa seca total g%
Umidade	6,08	
Proteína	19,35	20,60
Extrato etéreo	14,48	15,42
Teor de amido	15,69	
Açúcares totais	13,92	


Moisés Alves Dias
 Analista


PROF. ERNESTO H. KUBOTA
 CHEFE DEPT.º TECNOLOGIA E
 CIÊNCIA DOS ALIMENTOS - UFSCAR

Santa Maria, 23 de junho de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
FONE 055 3220 8254 FAX 055 3220 8353
CEP: 97105 900 BAIRRO CAMOBI - SANTA MARIA - RS



Análise N° F174/2014

DADOS DA AMOSTRA	
Interessado:	USINA PILOTO DE ETANOL/UFSM
Produto:	Amostra FA
Data da fabricação:	08/05/2014
Data de validade:	
Remetido:	Pelo interessado
Análise solicitada pelo interessado:	Umidade, proteína, extrato etéreo, teor de amido e açúcares totais.
Endereço:	Colégio Politécnico - UFSM
Entrada da Análise:	15/05/2014

ANÁLISES	RESULTADO	RESULTADO
	Produto integral g%	Massa seca total g%
Umidade	6,08	
Proteína	13,09	13,94
Extrato etéreo	14,54	15,48
Teor de amido	36,74	
Açúcares totais	*	

* Não detectado pela metodologia: Instituto Adolfo Lutz


Moisés Alves Dias
Analista


Prof. ERNESTO H. KUBOTA
Mestrado em Engenharia e
Ciência dos Alimentos - UFSM

Santa Maria, 23 de junho de 2014.