



*Federação das Indústrias do Estado da Bahia*

FACULDADE DE TECNOLOGIA SENAI CIMATEC  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
GESTÃO E TECNOLOGIA INDUSTRIAL

LARISSA CASADO DE LIMA

ENRIQUECIMENTO PROTEICO A PARTIR DO RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SEMISSÓLIDO

Salvador  
2017

LARISSA CASADO DE LIMA

ENRIQUECIMENTO PROTEICO A PARTIR DO RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SEMISSÓLIDO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Faculdade Tecnologia SENAI CIMATEC como requisito para a obtenção do título de Mestre em Gestão e Tecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. (a) Edna dos Santos Almeida  
Co-orientadora: Prof. Dr. (a) Bruna Aparecida Souza Machado

Salvador  
2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro Universitário SENAI CIMATEC

L732e Lima, Larissa Casado de

Enriquecimento proteico a partir do resíduo do processamento do caju por fermentação em estado semissólido / Larissa Casado de Lima. – Salvador, 2017.

66 f. : il. color.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edna dos Santos Almeida.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Bruna Aparecida Souza Machado.

Dissertação (Mestrado em Gestão e Tecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação, Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, 2017.

Inclui referências.

1. Enriquecimento proteico. 2. Caju. 3. *Rhizopus microsporus*. 4. *Candida albicans*. I. Centro Universitário SENAI CIMATEC. II. Almeida, Edna dos Santos Almeida. III. Machado, Bruna Aparecida Souza. IV. Título.

CDD: 338.45

LARISSA CASADO DE LIMA

ENRIQUECIMENTO PROTEICO A PARTIR DO RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SEMISSÓLIDO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Gestão e Tecnologia Industrial, Faculdade de Tecnologia SENAI Cimatec

Aprovada em        de        de 2017.

Banca Examinadora

Orientadora Profa. Dra. Edna dos Santos Almeida  
Doutora em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas,  
Brasil  
Faculdade tecnologia SENAI CIMATEC

Co-orientadora Profa. Dra. Bruna Aparecida Souza Machado  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Sergipe, UFS, Aracajú, Brasil  
Faculdade tecnologia SENAI CIMATEC

Membro interno da Banca – Profa. Dra. Erika Durão Vieira  
Doutora em Engenharia Química na área de desenvolvimento de processos  
biotecnológicos pela Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil  
SENAI CIMATEC

Membro externo da Banca - Profa. Dra. Alessandra Argôlo do Espírito Santo Carvalho  
Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Brasil.  
Centro Universitário Jorge Amado, UNIJORGE.

Dedico este trabalho à Deus e à  
minha família, em especial minha filha.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus sinceros agradecimentos...

A minha mãe e minhas tias Eliete e Ana Lúcia que com seu apoio e amor me educaram da melhor maneira, dando-me confiança para seguir sempre em frente e alcançar meus objetivos.

A minha filha, Joana, pela minha ausência nos finais de semana em virtude da pesquisa.

Ao SENAI Alagoas pela oportunidade concedida.

Aos professores do SENAI CIMATEC - BA, que transmitiram um pouco de seus conhecimentos.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Almeida, pela orientação e confiança.

A minha co-orientadora, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bruna Machado, pelo profissionalismo e orientação.

A professora Samira Abdala, do Laboratório de Microbiologia do ICS – Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Universidade Federal da Bahia, pela doação dos microrganismos imprescindíveis à pesquisa.

As colaboradoras do Laboratório de Pesquisa Aplicada de Alimentos e Biotecnologia do SENAI-CIMATEC-BA, em especial Ingrid Lessa Leal.

Ao amigo Vitor Francisco pelo apoio concedido.

A todos que contribuíram com a realização dessa etapa.

## RESUMO

Na industrialização do caju ocorre o beneficiamento da castanha e, em menor escala, o aproveitamento do pedúnculo sob a forma de sucos, doces, geleias, néctares, farinha e fermentados. O resíduo gerado é passível de aproveitamento, sendo o enriquecimento proteico uma das possibilidades para utilização como fonte de proteína na alimentação, utilizando microrganismo através de uma fermentação em estado semissólida. Assim, o objetivo deste trabalho foi definir as melhores condições de processo para o enriquecimento proteico do resíduo do processamento do caju quando fermentado em estado sólido com *Rhizopus microsporus* e *Candida albicans*. As amostras de resíduos foram coletadas do processo de polpa de fruta de caju, de uma empresa localizada no Estado de Alagoas. Foram realizadas análises físico-químicas para caracterização inicial do resíduo. O resíduo foi utilizado como substrato com os microrganismos das espécies *R.microsporus* e *C.albicans*, cedidos pelo banco de cultivo do laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. Frascos Erlenmeyer contendo meio PDA foram inoculados com resíduo de caju e uma suspensão contendo  $10^6$  esporos/mL de *R.microsporus* e de *C.albicans* foram dispostos em estufa com temperatura controlada a 35°C por 4 dias. As amostras foram colhidas em duplicata a cada 12 horas, totalizando 96 horas, para avaliar a concentração, temperatura de cultivo e tempo de armazenamento do produto final sobre o teor proteico. Na caracterização inicial, observou-se que o resíduo possuía umidade de  $88,77\% \pm 0,37$ ; atividade de água de  $0,95 \pm 0,01$ ; lipídios de  $0,85 \pm 0,11$ ; proteína de  $0,80 \pm 0,05$  e sólidos solúveis totais de  $4,07^\circ\text{Brix} \pm 0,12$ . Após a fermentação das amostras, a maior quantidade de proteína encontrada foi de  $2,46\% \pm 0,02$  no tempo de 60 horas na fermentação com *R.microsporus* e de  $2,33\% \pm 0,20$  no fermentado com a *C.albicans* no tempo de 48 horas. Considerando que o valor inicial de proteína no resíduo de caju, foi de 0,8%, o ganho proteico no fermentado no tempo de 60h com *R. microsporus* foi 3,1 vezes maior que o valor inicial do resíduo in natura e no fermentado com *C.albicans* no tempo de 48h foi de 2,9 vezes maior. A partir do mapeamento tecnológico realizado neste estudo, percebe-se que o desenvolvimento e obtenção de proteína microbiana são estudados há algumas décadas e tem registros crescentes de patentes, principalmente nos Estados Unidos, onde algumas empresas na área de biotecnologia e desenvolvimento de ingredientes para alimentos se destacam no registro dessas patentes.

Palavras-chave: Enriquecimento proteico; resíduo de caju; *Rhizopus microsporus*; *Candida albicans*.

## ABSTRACT

In the industrialization of the cashew, the processing of the chestnut and, to a lesser extent, the use of the peduncle in the form of juices, jams, jellies, nectars, flour and fermented. The residue generated is suitable for use, with protein enrichment being one of the possibilities for use as a protein source in the diet, using microorganism through a semi-solid state fermentation. Thus, the objective of this work was to define the best process conditions for the protein enrichment of the cashew processing residue when fermented in solid state with *Rhizopus microsporus* and *Candida albicans*. The residue samples were collected from the cashew fruit pulp process, from a company located in the State of Alagoas. Physical and chemical analyzes were carried out for the initial characterization of the residue. The residue was used as substrate with the microorganisms of the species *R.microsporus* and *C.albicans*, provided by the culture bank of the Microbiology laboratory of the Institute of Health Sciences (ICS) of UFBA. Erlenmeyer flasks containing PDA medium were inoculated with cashew residue and a suspension containing 10<sup>6</sup> spores / ml of *R.microsporus* and *C. albicans* were housed in a temperature controlled oven at 35 ° C for 4 days. Samples were collected in duplicate every 12 hours, totaling 96 hours, to evaluate the concentration, culture temperature and storage time of the final product on the protein content. In the initial characterization, it was observed that the residue had humidity of 88.77% ± 0.37; Water activity of 0.95 ± 0.01; Lipids of 0.85 ± 0.11; Protein of 0.80 ± 0.05 and total soluble solids of 4.07 ° Brix ± 0.12. After fermentation of the samples, the highest amount of protein found was 2.46% ± 0.02 in the time of 60 hours in the fermentation with *R.microsporus* and of 2.33% ± 0.20 in the fermented with *C. albicans* In the time of 48 hours. Considering that the initial value of protein in the cashew residue was 0.8%, the protein gain in the fermented in the 60h time with *R. microsporus* was 3.1 times higher than the initial value of the in natura residue and in the fermented with *C.albicans* at 48 h was 2.9 times higher. From the technological mapping carried out in this study, it is noticed that the development and obtaining of microbial protein have been studied for some decades and has growing patent registrations, mainly in the United States, where some companies in the area of biotechnology and development of food ingredients Are highlighted in the registration of these patents.

Keywords: Protein enrichment; Cashew residue; *Rhizopus microsporus*; *Candida albicans*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Meio PDA.....	34
Tabela 2 - Resultados da caracterização físico-química do resíduo do caju (Média ± desvio padrão) .....	40
Tabela 3 - Determinação colorimétrica do resíduo do caju (Média ± desvio padrão).....	42
Tabela 4 - Determinação de fibras no resíduo de caju (Média ± desvio padrão) .....	43
Tabela 5 - Valores de Sólidos Solúveis Totais, pH e proteína nos fermentados com resíduo de caju e <i>Candida albicans</i> .....	44
Tabela 6 - Valores de Sólidos Solúveis Totais, pH e proteína nos fermentados com resíduo de caju e <i>Rhizopus microsporus</i> .....	44
Tabela 7 – Descrição dos códigos da Classificação Internacional de Patentes – IPC.....	55

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Caju .....	31
Figura 2 - Amostra de resíduo de caju .....	31
Figura 8 - Crescimento de <i>Candida albicans</i> em placa de petri contendo meio PDA .....	35
Figura 9 – Prova do tubo germinativo com blastoconídios, tubo germinativo e pseudo-hifas de <i>Candida albicans</i> .....	36
Figura 10 - Imagem de microscópico da <i>Candida albicans</i> .....	36
Figura 11 - Crescimento de <i>Rhizopus microsporus</i> em placa de petri contendo meio PDA .....	37
Figura 12 - Morfologia microscópica de um cultivo <i>Rhizopus microsporus</i> .....	38
Figura 8 - Caju fermentado com <i>Candida albicans</i> nos tempos de 0 a 96h.....	45
Figura 9 - Caju fermentado com <i>Rhizopus microsporus</i> nos tempos de 0 a 96h.....	46
Figura 10 - Evolução anual do depósito de patentes da tecnologia pesquisada entre os anos de 1992 e 2017.....	51
Figura 11 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana por país de origem/região dos depositantes entre 1992 e 2017 (WO = PCT: <i>Patent Cooperation Treaty</i> ; EP: <i>Organização Europeia de Patentes</i> ).....	53
Figura 12 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana relacionados aos principais depositantes.....	53
Figura 13 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana relacionados aos principais inventores.....	54
Figura 14 - Distribuição dos principais códigos de classificação internacional de patentes (IPC) identificados nos documentos sobre proteína microbiana.....	54

## LISTAS DE SIGLAS

Aa – Atividade de água

ATCC – *American Type Culture Collection*

PDA - Ágar Batata Dextrose

DP – Desvio Padrão

Espacenet - Escritório Europeu de Patentes

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - Fibra em Detergente Ácido

FDN - Fibra em Detergente Neutro

FES - Fermentação em Estado Semissólido

GRAS – *Generally Regarded As Safe*

INPI – Instituto Nacional de Propriedade intelectual

P – Pressão de vapor parcial da água contida na solução ou no alimento

P<sub>0</sub> - Pressão de vapor de água da água pura

PD&I – Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

SCP – *Single Cell Protein*, em português: Proteína unicelular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Definição do problema .....	15
1.2 Objetivo.....	16
1.3 Questão da pesquisa.....	16
1.4 Organização da Dissertação de mestrado.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Caju .....	18
2.2 Reaproveitamento de resíduos da indústria de alimentos .....	19
2.3 Proteínas microbianas.....	21
2.4 Fermentação em estado sólido.....	25
2.5 Leveduras do gênero <i>Cândida</i> .....	27
2.6 Fungos filamentosos do gênero <i>Rhizopus</i> .....	28
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Obtenção e preparação da amostra .....	31
3.2 Caracterização físico-química da amostra.....	32
3.3 Microrganismos .....	33
3.4 Inoculação e cultivo semissólido .....	34
3.4.1 Confirmação da identificação de leveduras.....	35
3.4.2 Identificação da espécie <i>Rhizopus microsporus</i> .....	36
3.5 Análise do resíduo do caju fermentado .....	38
4 ANÁLISE E RESULTADOS DA PESQUISA.....	40
4.1 Caracterização inicial das amostras .....	40
4.2 Enriquecimento proteico a partir da fermentação semissólida .....	43
5 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SOBRE PROTEINA MICROBIANA SOB O ENFOQUE EM DOCUMENTOS DE PATENTES .....	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
6.1 Conclusões.....	56
6.2. Atividades Futuras de Pesquisa .....	56
REFERÊNCIAS.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Na indústria de frutas, a utilização industrial do caju é realizada principalmente na região Nordeste do país, onde visa basicamente o aproveitamento da castanha e, em menor escala, o aproveitamento do pedúnculo sob a forma de sucos, doces, geleias, néctares, farinha e fermentados, que contabilizam sua utilização de 15% da produção do pedúnculo (CAMPOS *et al.*, 2005).

O caju é uma das principais culturas sustentáveis do Nordeste, região reconhecida como produtora de caju, cuja produção de pedúnculos situa-se de 2,0 milhões a 2,5 milhões de toneladas por ano (HOLANDA *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2008).

Segundo Oliveira:

No Brasil, a caju cultura mobiliza cerca de 280 mil pessoas e possui uma área cultivada de 740.000 ha. Distribuída em várias regiões do País, concentra-se na região Nordeste, que responde por 94% da produção nacional, onde os maiores plantios se localizam principalmente nas faixas litorâneas e de transição do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (Oliveira, 2008, p.1).

Anualmente, são desperdiçados nos nove estados do Nordeste mais de 1,5 milhão de toneladas do pedúnculo, representando 75% das 2,5 milhões de toneladas (HOLANDA *et al.*, 2010).

Em se tratando da produção de derivados de frutas, especificamente a fabricação de polpa de caju, existe uma preocupação com os resíduos gerados, os quais atualmente são destinados a aterros ou alimentação animal, a fim de diminuir o impacto ambiental.

Além disso, o aproveitamento máximo dos recursos existentes leva o homem a se apropriar de processos que atendam as necessidades individuais e coletivas da população, assim como minimizar os efeitos de seus resíduos sobre o meio ambiente.

Neste contexto, o processamento do caju na indústria, gera resíduos com potencial valor econômico que não são aproveitados de forma adequada ou então são jogados no meio ambiente contribuindo desta maneira para aumentar a poluição do mesmo.

Com o crescente desenvolvimento industrial, há uma necessidade de

processos ambientalmente sustentáveis, e há um consenso geral de que a proteção ambiental sustentável só pode ser alcançada através da integração de uma consciência ambiental geral em funções de negócios de uma empresa.

Assim sendo, justifica-se cada vez mais a necessidade de se encontrar nichos de oportunidades a partir de novas formas de atuação, por meio de propostas para aproveitamento dos resíduos gerados na industrialização, considerando o valor nutritivo do resíduo de caju e que sua quantidade desperdiçada representam um elevado potencial de uso para conversão de proteínas através de microrganismos.

A importância do presente trabalho está na redução do impacto ambiental causado pelos resíduos das fábricas de polpa de fruta, propondo a produção de proteína microbianas por fermentação semissólida.

A proteína microbiana ou unicelular ou *Single Cell Protein* – SCP são células secas de algas, bactérias, leveduras e fungos, que apresentam como vantagens: curto período de geração, possibilidade de modificações genéticas para alterar a composição proteica, alto teor de proteínas, e possibilidade do uso de resíduos agroindustriais de frutas provenientes da recuperação em outros processos industriais (AQUARONE *et al.*, 2001).

Estas proteínas podem ser produzidas por processos biotecnológicos, a exemplo da fermentação em estado semissólido - FES e utilizadas como fonte de proteína na alimentação humana e na ração animal, fornecendo a formulações alimentícias características desejáveis, tais como sabor, formação de espuma, retenção de água e de gordura, textura, entre outras (ALBUQUERQUE, 2003).

Essa técnica aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos com reduzida quantidade de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (ROCHA, 2010).

Cabe salientar que a fermentação é um dos métodos para melhorar o conteúdo de nutrientes da alimentação através da biossíntese de vitaminas, aminoácidos essenciais, digestibilidade de proteínas e fibras (TESFAW & ASSEFA, 2014).

Atualmente, a proteína unicelular tem sido produzida por esta técnica a partir do cultivo de diferentes microrganismos. Os fungos filamentosos e as

leveduras são os mais estudados no cultivo de substratos semissólidos por se adaptarem melhor nas condições desse tipo de cultivo, além de serem capazes de se desenvolver em ambientes com atividade de água baixa (SANTOS, 2007).

Neste sentido a proposta deste trabalho é o enriquecimento proteico do resíduo do processamento do caju por meio de fermentação em estado semissólido, utilizando o fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* ou a levedura *Candida albicans* em diferentes tempos de cultivo a fim de determinar a melhor condição estudada para a produção proteica.

### 1.1 Definição do problema

A geração de resíduos e subprodutos nas indústrias de alimentos tem se tornado motivo de preocupação nas últimas décadas. A conscientização ecológica aumenta com a necessidade de alternativas para reduzir os impactos ambientais gerados pelas empresas de processamento de frutas.

A preocupação da geração de resíduos agroindustriais está voltada para os prejuízos que eles podem gerar no solo, água, ar e paisagens, pois, quando incorretamente descartados, podem tornar-se ameaça ao meio ambiente.

A fim de diminuir os prejuízos gerados no meio ambiente, sugere-se o aproveitamento de resíduos da indústria alimentícia que tem potencial para melhorar a oferta de alimentos que substituam de forma parcial ou integral alguns componentes básicos na composição de novos alimentos, visto que esse resíduo é nutricionalmente rico em nutrientes imprescindíveis à alimentação humana.

Diante da elevada produção de caju, faz-se necessário reunir subsídios para o aproveitamento do resíduo do caju no Brasil, através de pesquisas para estabelecer condições de utilização na alimentação humana.

## 1.2 Objetivo

### Objetivo Geral

Definir as melhores condições de processo para o enriquecimento proteico do resíduo do processamento do caju quando fermentado em estado sólido com *Rhizopus microsporus* e *Candida albicans*.

### Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do resíduo da fabricação de polpa de caju utilizado nesse estudo;
- Realizar a produção de proteína a partir do *Rhizopus microsporus* e da *Candida albicans* no resíduo de caju;
- Avaliar o melhor tempo de fermentação do produto final sobre o teor proteico, pH e sólidos solúveis;
- Realizar um estudo de prospecção tecnológica relacionado ao desenvolvimento e obtenção de proteína microbiana a partir de diferentes fontes.

## 1.3 Questão da pesquisa

- Qual a melhor combinação de variáveis que gera a otimização na produção proteica quando os resíduos de caju são fermentados por *Rhizopus microsporus* ou *Candida albicans*?

## 1.4 Organização da Dissertação de mestrado

Este trabalho encontra-se dividido em 6 capítulos. O Capítulo 1, anteriormente apresentado refere-se a seção **introdução**, onde foi descrito de forma geral a importância do trabalho, justificativa e objetivo.

No capítulo 2 apresenta-se a **fundamentação teórica** abordando sobre o caju, reaproveitamento de resíduos da indústria de alimentos, proteínas microbianas, fermentação em estado sólido, leveduras do gênero *Candida*, e, por fim, fungos filamentosos do gênero *Rhizopus*.

No capítulo 3 é descrito o item **métodos e técnicas da pesquisa**, citando as análises laboratoriais realizadas. No capítulo 4 trata da **prospecção tecnológica** sobre proteína microbiana sob o enfoque em documentos de patentes. No capítulo 5 é descrito o item sobre **análise e resultados da pesquisa** e, por fim, no Capítulo 6 a apresentação das **considerações finais** do trabalho.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O referencial teórico traz uma visão geral sobre o caju e o reaproveitamento de resíduos da indústria de frutas, em seguida relata sobre as proteínas microbianas.

Na sequência, o texto trata sobre fermentação em estado sólido, conceito e suas aplicações e, posteriormente sobre os tipos de microrganismos utilizados.

### 2.1 Caju

O cajueiro pertence à família Anacardiaceae, que inclui árvores e arbustos tropicais e subtropicais. *Anacardium occidentale L.*) é o nome oriundo da palavra indígena, que em tupi quer dizer "noz que se produz". Originário da América Tropical, é considerada uma das mais importantes espécies cultivadas das regiões tropicais, o cajueiro ocupa, no mundo, uma área estimada em 3,39 milhões de hectares (OLIVEIRA, 2008).

O fruto do cajueiro é dividido em duas partes bem diferenciadas. Uma é o pseudofruto, resultante da hipertrofia do pecíolo, comestível ao natural, macio, carnoso, rico em suco, colorido e de conservação limitada. Outra é a castanha, fruto verdadeiro, de comercialização internacional. Ao separar a castanha do pseudofruto ocorre o aproveitamento de ambos, embora a castanha tenha maior interesse comercial (LIMA, 2008).

Embora o pedúnculo do caju seja aproveitado em menor escala, ele representa cerca de 90% do peso total e possui uma composição físico-química rica em nutrientes. Paiva *et al.* (2000) encontrou os seguintes resultados nas análises do pseudofruto: 86% Umidade, 11° Brix, 4,2 pH, 7,9% de açúcares redutores e 8,4% de açúcares totais, acidez de 0,36, 18,5mg/100g de ácido ascórbico, 0,35% de taninos, 14,5mg/g de cálcio, 33 mg/100g de fósforo, 0,36mg/100g de ferro.

O caju é classificado como fruto não climatérico, ou seja, após a colheita ocorre diminuição contínua na taxa respiratória, não havendo aumento na

produção de etileno, nem alterações no amadurecimento. Por isso, a colheita do fruto deve ser no estágio maduro, pois se feita antes do amadurecimento, pode vir a ocorrer o amolecimento e perda da cor verde e ficando impróprio ao consumo.

Esta característica fisiológica talvez explique, em parte, o baixo nível de aproveitamento comercial do pedúnculo, pois há necessidade de um menor tempo entre a colheita e o processamento.

A seguir será tratado o reaproveitamento de resíduos da indústria de alimentos.

## 2.2 Reaproveitamento de resíduos da indústria de alimentos

No setor alimentício, partes da matéria-prima não utilizadas e descartadas durante o processamento são denominados resíduos ou bagaço, que na maioria das vezes são mais nutritivas do que outras partes do alimento que estamos habituados a ingerir. No Brasil, a fruticultura produz grande quantidade de subprodutos (EVANGELISTA, 2008).

O aproveitamento dos resíduos de frutas tem sido alvo de vários estudos o que contribui para o acúmulo de informações sobre o seu grande potencial e seus valores nutricionais uma vez que os mesmos apresentam uma grande taxa de nutrientes essenciais, melhorando a saúde humana.

Estes resíduos são constituídos de compostos lignocelulósicos, os quais são os recursos mais abundantes da natureza e podem ser utilizados em bioprocessos. Podem ainda, ser utilizados na geração de bioenergia através da produção de biogás por meio do processo de digestão anaeróbia. Esse processo é uma alternativa que se destaca para o tratamento dos resíduos sólidos, sendo o biogás considerado uma fonte de energia renovável, devido à produção de metano como produto final.

Batista (2014) utilizou a biodigestão anaeróbia, pirólise e combustão direta em seu estudo sobre caracterização de resíduos da casca do cacau, coco e café, e avaliou as possibilidades de rotas tecnológicas para a transformação do potencial energético da biomassa em energia elétrica.

Por estes resíduos apresentarem ainda quantidades significativas de nutrientes, eles podem ser perfeitamente utilizados no desenvolvimento de

novos produtos alimentícios, aumentando seu valor agregado (UCHOA *et al.*, 2008).

Estudos da EMBRAPA relatam que o resíduo de caju é transformado em farinha e pode ser utilizado para o enriquecimento de alimentos tradicionais, como biscoitos artesanais, com objetivo de agregar valor (SANTANA & SILVA, 2008).

Segundo Santana & Silva (2008), as farinhas de frutas, em relação às farinhas de cereais, apresentam como vantagens: uma maior conservação e concentração dos valores nutricionais; menor tempo de secagem; diferenciadas propriedades físicas e químicas, o que permite uma ampla gama de aplicações, e diferenciadas possibilidades do uso do fruto inteiro ou da polpa como matéria-prima.

Resíduos das indústrias de laranja têm sido usados como ração animal, para a produção de enzimas hidrolíticas, celulases, a produção de extrato enzimático, bem como meios de cultura para kits de culturas, *kefir* para panificação e fermentações alcoólicas e produtos lácteos (AGGELOPOULOS *et al.*, 2013).

Jin *et al* (2005) estudou a utilização de resíduos (batata, milho, trigo e abacaxi) para a produção de ácido láctico e biomassa fúngica de *Rhizopus arrhi* ZUS 36017 e *R. oryzae* 2062.

Kleekayai & Suntornsuk (2011) pesquisou sobre a produção e caracterização de quitosana obtida a partir de *Rhizopus oryzae* cultivado em resíduo do processamento de batata chip, onde afirma que a casca de batata pode ser aplicada como um substrato de baixo custo para a produção de quitosana a partir de *R. oryzae*.

Outro resíduo passível de aproveitamento é a semente do maracujá que pode ser utilizado para fabricação de sabonetes, tintas, vernizes e após refinação ou hidrogenação, para fins comestíveis (ZERAIK *et al.*, 2010).

Através da pesquisa em artigos científicos sobre a utilização do resíduo de caju para enriquecimento proteico, Monteiro *et al.* (2015) avaliou a cinética do enriquecimento de proteínas por *Saccharomyces cerevisiae*, de misturas constituídas de resíduo de caju, abacaxi e maracujá em câmara com condições controladas de umidade relativa do ar (UR).

Já Lima *et al.* (2015) estudaram a pré-hidrólise e hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo do caju e a remoção dos compostos tóxicos do licor hidrolisado usando a lignina residual como adsorvente e fermentação alcoólica dos licores para a produção de bioetanol de segunda geração.

Outros autores utilizaram processos fermentativos com diversos substratos agroindustriais. Pacheco *et al.* (2012) avaliaram o efeito da variação do teor de água, do tempo de fermentação e da temperatura, na produção de endoglucanase do fungo *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, utilizando semente de jaca como substrato.

Enquanto Mélo *et al.* (2014) avaliaram o resíduo agroindustrial de acerola para ser utilizado na produção de celulases através de processos fermentativos em estado sólido. Oliveira *et al.* (2014) avaliaram o uso simultâneo da casca de maracujá e do sabugo de milho como substratos para a produção das enzimas na fermentação semissólida com o fungo *Aspergillus niger*.

Esta situação criou uma demanda para a formulação de alimentos utilizando fontes proteicas inovadoras e alternativas, a exemplo da proteína de biomassa microbiana cultivada (KLEPÁRNÍK & FORET, 2013). Este tema será tratado a seguir.

### 2.3 Proteínas microbianas

Antes de se descrever proteínas microbianas, é importante conceituar proteínas.

As proteínas são macromoléculas, de alto peso molecular, constituídas de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, além de enxofre, fósforo, ferro e cobalto (PACHECO, 2006).

As proteínas estão presentes em todas as células vivas e são biopolímeros formados pela polimerização por condensação de aminoácidos, que são unidos por ligações covalentes (NELSON & COX, 2011), chamadas de ligações peptídicas, dispostos em sequências específicas que conferem características individuais às inúmeras proteínas do corpo (PACHECO, 2006).

Na natureza, são encontrados cerca de 20 aminoácidos chamados de aminoácidos primários, que ocorrem com grande incidência na maioria das

proteínas. Os aminoácidos apresentam uma estrutura geral que é comum a todos os aminoácidos, com a presença de um carbono ligado a um grupamento amínico ( $\text{NH}_3^+$ ), a um grupamento carboxílico ( $\text{COO}^-$ ) e a um radical ou grupamento R, cuja estrutura vai variar de acordo com o aminoácido, e são classificandos como apolares, polares, aromáticos, ácidos e básicos (NELSON & COX, 2011).

Proteínas e aminoácidos são importantes para o metabolismo energético do corpo. Estas apresentam função estrutural, fornecendo substratos necessários para o crescimento, reparo e manutenção dos tecidos corpóreos; além das funções enzimática, endócrina, regulação hidroeletrólítica, equilíbrio ácido-base, transporte, imunológica, coagulação, contratilidade e relaxamento muscular e energética.

Nosso organismo não tem reserva de aminoácidos livre, ou seja, qualquer quantidade acima das necessárias para a síntese proteica celular e para a síntese de compostos não proteicos que contém nitrogênio será metabolizada (PACHECO, 2006).

A falta de proteínas no corpo pode acarretar em uma desnutrição proteica, que leva a um quadro acentuado de perda de massa muscular, além do grande comprometimento do sistema imunológico, abrindo a possibilidade de outras doenças oportunistas.

Na aplicação industrial de alimentos, as proteínas são classificadas de acordo com suas propriedades funcionais, ou seja, classificadas em hidrofílicas, interfásicas, intermoleculares, reológicas e sensoriais.

Já o termo proteína microbiana, ou proteína de célula única tem sido usado para denominar as células secas de microrganismos de algas, bactérias, leveduras e fungos. Sua multiplicação ocorre rapidamente, podendo conter até 70 % de proteína bruta, mostrando-se como um produto atrativo quanto à obtenção de fontes proteicas mais baratas, especialmente se esses organismos forem cultivados em resíduos agroindustriais (ALBUQUERQUE, 2003).

A biomassa que pode ser obtida a partir desses resíduos agroindustriais como substratos para suprir a necessidade de proteína na alimentação animal e humana (MAMMA & CHRISTAKOPOULOS, 2014).

Proteína microbiana ou SCP tem várias vantagens sobre as proteínas animais e vegetais em que a sua exigência para o crescimento não variam sazonalmente ou são dependente do clima; podendo ser produzido durante todo o ano. Outro ponto importante é que não necessita de uma grande extensão de terra como ocorre na produção de plantas ou de proteína animal (ADEDAYO *et al.*, 2011).

Várias bactérias (*Cellulomonas*, *Alcaligenes*), fungos (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus*), leveduras (*Candida*, *Saccharomyces*) e algas (*Spirulina*, *Chlorella*) têm sido empregados na produção de proteínas unicelulares (NASSERI *et al.*, 2011).

Em relação a fungos, muitas espécies são usadas como alimentos ricos em proteínas. As mãos relatadas pela literatura são as espécies de levedura *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Saccharomyces*.

Muitos outros fungos filamentosos também podem servir como fontes de proteína microbiana, como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Os fungos filamentosos que têm sido utilizados incluem *Chaetomium celluloliticum*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Cephalosporium cichhorniae*, *Penicillium cyclopium*, *Rhizopus chinensis*, *Scytalidium acidophilum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma alba* e *Paecilomyces varioti* (ADEDAYO *et al.*, 2011).

Ao lidar com a produção de proteína microbiana, diversos autores testaram vários resíduos da agroindústria, como substrato.

Albuquerque (2003) estudou a produção de proteína microbiana em resíduo de abacaxi utilizando *Rhizopus oligosporus*. Já Suhel & Fioreze (2011) aproveitou o bagaço de maçã como substrato para a produção de proteína unicelular utilizando a levedura *Candida utilis* e o fungo *Rhizopus oligosporus* através de fermentação semissólida.

Outra tendência recente na produção SCP é a exploração de espécies de fungos para bioconversão de resíduos lignocelulósicos (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000), a exemplo de sabugo de milho fermentado. Já Coelho *et al.* (2001) investigaram o aproveitamento da casca do coco verde, mediante fermentação semissólida, para produção de enzimas por *Aspergillus niger*.

Oduguwa *et al.* (2008) em seu estudo sobre sabugo de milho fermentado, utilizaram os microrganismos *R. oligosporus* e *S. cerevisiae*. A partir dos resultados obtidos, nas análises físico-químicas, *S. cerevisiae* aumentou os teores de proteína e gordura, enquanto *R. oligosporus* foi capaz de degradar a fibra significativamente.

Suhet & Fioreze (2011) pesquisaram sobre a produção de proteína unicelular por meio da fermentação semi-sólida a partir do resíduo da industrialização do abacaxi com os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger*.

Albuquerque (2003) em seu trabalho utilizou o bagaço de maçã como substrato para a produção de proteína unicelular em dois tipos de cultivo: cultivo submerso, onde a levedura *Candida utilis* CCT 3469 cresceu no extrato obtido a partir da prensagem do bagaço de maçã, em biorreator de bancada; e fermentação em estado sólido, onde o fungo *Rhizopus oligosporus* CCT 4134 foi empregado no enriquecimento proteico deste resíduo, cultivado em reatores de coluna.

Zen *et al.* (2014) pesquisaram sobre a reutilização de resíduos agroindustriais agregando valor a estes. Com o cultivo de *Aspergillus niger* para a produção de lipídios e proteínas intracelulares através de fermentação em estado sólido.

Aggelopoulos *et al.* (2014) estudou o crescimento dos microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kefir sp*) por fermentação em estado sólido de várias misturas de resíduos da indústria alimentar (soro de leite, melão, resíduos sólidos de cerveja, laranja e resíduos de batata). Os resultados mostraram que o produto da fermentação com *K. marxianus*, em comparação com de *S. cerevisiae* e *Kefir*, continha as maiores quantidades proteicas, sendo esse enriquecimento favorável a alimentação animal.

Klepárník & Foret (2013) afirmou que procedimentos sanitários e controle de qualidade rigoroso devem ser mantidos durante todo o processo de enriquecimento proteico para evitar a deterioração e contaminação por microrganismos patogênicos e toxigênicos quando a biomassa para SCP está sendo cultivada.

Campos *et al.* (2005) estudou o enriquecimento proteico do bagaço do caju processado por cultivo semissólido, usando diferentes concentrações de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a produção de SCP a partir de resíduos agroindustriais são empregadas a técnica de fermentação em estado sólido, a qual será descrita a seguir.

#### 2.4 Fermentação em estado sólido

A fermentação é um bioprocessos consiste no processo de transformação de uma matéria-prima envolvendo um microrganismo (fungo, levedura ou bactéria), ou parte de uma célula viva, um catalisador (enzima) ou uma alga que acumulem no meio de cultivo uma série de bioprodutos produzidos no metabolismo desses micro-organismos.

A fermentação pode ser utilizada para aumentar o conteúdo de nutrientes em alimentos, por meio da biossíntese de vitaminas, aminoácidos essenciais, proteínas e, melhorar a qualidade da fibra e da digestibilidade proteica (OBOH, 2006).

Existem diferentes tipos de alimentos fermentados, sendo os mais conhecidos: o iogurte, o queijo, o vinho, a cerveja, e o pão. Outros alimentos fermentados começam agora a ganhar grande visibilidade devido às suas propriedades, tais como o *tempeh*, miso, sake ou a kombucha. Esses alimentos são produzidos a partir de Fermentação em Estado sólido - FES (CRUZ, 2014; CHEN, 2013).

Fermentação em estado sólido, ou fermentação semissólida, é definida como a fermentação envolvendo sólidos com pouca quantidade de água livre; no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e metabolismo do microrganismo (PANDEY, 1992).

Esse tipo de fermentação consiste em uma boa alternativa para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, por utilizar materiais simples e de baixo custo, necessitando, na maioria dos casos, apenas da adição de água e de micronutrientes, sendo uma técnica renovável que agrega a sua possibilidade do uso de resíduos, diminuindo o impacto sobre o meio ambiente (ZEN *et al.*, 2014).

Uma das principais vantagens da FES é a facilidade com a qual os fungos podem crescer em substratos sólidos naturais, como resíduos agroindustriais (GOWTHAMAN *et al*, 2001).

Os fatores que influenciam a FES são o tipo de inóculo, a atividade de água, o pH e o controle de temperatura.

O uso de esporos é mais comum na FES quando comparado ao uso de células vegetativas do inóculo, devido a facilidade de preparação do inóculo, e sua capacidade de armazenamento prolongada para uso posterior. Como desvantagens apresentam maior tempo *lag*<sup>1</sup>, diferentes condições ótimas para a germinação de esporos e crescimento vegetativo (LEISTNER & RODEL, 1976).

A maioria dos fungos capazes de desenvolver uma FES têm valores de atividade de água ( $Aa^2$ ) mínimas entre 0,8 e 0,9. A atividade de água ótima pode ser diferente para o crescimento e para formação de produto, sua condição oferece a possibilidade de manipular a atividade da água durante a fermentação (GOWTHAMAN *et al.*, 2001).

A fermentação leva a um aumento na atividade de água do substrato, devido à produção de água, mas, ainda assim, não pode ajudar a manter os níveis de umidade no substrato devido a perdas por evaporação.

Os fungos filamentosos têm crescimento em pH de 2 a 9, com um pH ótimo de 3,8 a 6,0. Por outro lado, as leveduras têm um pH ótimo entre 4 e 5 mas pode crescer em pH de 2,5 a 8,5. Esta variação de pH típica de fungos pode ser vantajosa para evitar a contaminação bacteriana, especialmente a quando usa o pH mais baixo. Os fungos podem crescer no intervalo de temperatura de 20 a 55°C. (GOWTHAMAN *et al.*, 2001).

Entre os povos orientais, as técnicas de cultivo semissólido são bastante antigas e muito aplicadas na indústria de alimentos. Segundo Chen (1992), na China, desde os tempos antigos o cultivo semissólido vem sendo usado para a fabricação de bebidas fermentadas como o vinho chinês, molho de soja e vinagre (SOUSA, 2009).

---

<sup>1</sup> Refere-se ao período de adaptação, ocorre pouca ou ausência de divisão celular. Fase onde os microrganismos encontram-se em estado de latência (repouso).

<sup>2</sup> Parâmetro que mede a disponibilidade de água em um alimento denomina-se “atividade de água” ( $Aa$ ). Define-se  $Aa$  de um alimento ou de uma solução qualquer como sendo a relação existente entre a pressão parcial de vapor de água contida na solução ou no alimento ( $P$ ) e a pressão parcial de vapor de água pura ( $Po$ ), a uma dada temperatura:  $Aa = P/Po$ .

Exemplos de alimentos produzidos no Japão pela fermentação são o missô, alimento que contém bactérias e fermentos vivos, constituído por uma pasta de soja fermentada produzida a partir de grãos de soja cozidos e misturados com outros cereais, e o *tempeh*, produzido através da fermentação controlada de grãos de soja aspergidos com um fungo *Rhizopus*, consumido habitualmente na Indonésia (SOUSA, 2009).

A fermentação de alimentos além de acentuar o sabor e aroma e é muito apreciado pelos povos orientais, os quais têm como costume promover a fermentação de soja, arroz, trigo e outros cereais.

O Brasil, por ser um país de intensa atividade agrícola, produz grandes quantidades de resíduos agroindustriais. Diversas pesquisas tais como o aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de etanol, enzimas e o enriquecimento proteico estão sendo realizadas no Brasil desde a década de 80, para agregar valor a produtos e subprodutos agrícolas tropicais por meio do cultivo semissólido (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Nos últimos anos, fermentação em estado sólido recebeu mais interesse dos pesquisadores. Há vários estudos têm demonstrado que este processo pode levar a maiores rendimentos e produtividades ou características de produtos melhores do que fermentação submersa (MARTINS *et al.*, 2011; NIGAM, 2009; AGGELOPOULOS, 2013).

*Bhargav et al.* (2008), afirmaram em seu estudo que a fermentação em estado sólido tem vantagens quando comparada com a fermentação submersa, além de ser um processo adequado para a produção de muitos produtos de valor agregado, como enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos. Esta técnica não só reduz o custo do processo, mas também torna o produto mais barato para os consumidores.

A seguir será tratado sobre leveduras do gênero *Candida* e fungo filamentosos do gênero *Rhizopus* utilizados em fermentações.

## 2.5 Leveduras do gênero *Cândida*

As leveduras apresentam em sua composição proteína, aminoácidos, carboidratos, lipídios, minerais, aditivos e vitaminas que são compostos nutricionais importantes na dieta humana e dos animais. Além disso,

apresentam uma fonte rica de vitaminas do complexo B, como tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, colina, ácido fólico e ácido paminobenzóico (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

A composição bioquímica das leveduras depende da natureza dos substratos utilizado, espécie, concentração de sais e condições de fermentação (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Devido à alta eficiência na conversão proteica e à possibilidade de serem cultivadas em diversos substratos, as leveduras têm sido utilizadas em diferentes processos biotecnológicos, aliando produtividade e baixo custo (BUTOLO, 1997).

Dentre as leveduras consideradas de extrema importância biotecnológica podemos citar as espécies do gênero *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Rhodotorula* (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

As leveduras se destacam pela produção de biomassa de rica composição nutricional, incluindo proteínas, vitaminas do complexo B e aminoácidos (RODRIGUES E SANT'ANNA, 2001).

Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) que muitas delas apresentam.

A biologia de *C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar em distintas morfologias, cresce com várias morfologias diferentes: por brotamento para formar levedura oval, pseudo-alongado; ou com o crescimento exclusivamente polarizada para formar uninucleadas, que se assemelham as verdadeiras hifas de fungos filamentosos (BARBEDO & SGARBI, 2010).

A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH (SUDBERY *et al.*, 2004).

## 2.6 Fungos filamentosos do gênero *Rhizopus*

Segundo Hawksworth *et al.*, (1983) o gênero *Rhizopus* pertence ao grupo dos Zigomicetos, da ordem dos Mucorales caracteriza-se pelo crescimento rápido em diversos ambientes como solos e vegetais. Em geral estes fungos

são glicófilos, desenvolvendo-se em substratos contendo açúcares solúveis e amido (ALBUQUERQUE, 2003).

Segundo Bocquet (1985) as colônias possuem aparência de algodão, tornando-se escuras com o tempo. Possuem um micélio vegetativo contínuo ramificado, em parte imerso no substrato, em parte aéreo. O micélio encontra-se conectado às estruturas de reprodução assexuada (esporângios). A reprodução sexuada ocorre a partir da formação de um zigosporo que, sob condições favoráveis, forma esporos que germinam para desenvolver um novo indivíduo (ALBUQUERQUE, 2003).

A espécie *Rhizopus oligosporus* (Saito) – sinônimo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* – tem sido utilizada há séculos na FES, especialmente na Ásia, para a fabricação de diversos alimentos à base de vegetais fermentados. *R. oligosporus* não só aumenta a digestibilidade e o conteúdo protéico dos vegetais como previne a formação de compostos tóxicos (ALBUQUERQUE, 2003).

O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela ausência de substâncias tóxicas e produção de proteínas com elevada digestibilidade, já que contém quantidades apreciáveis de cistina e de metionina (AQUARONE *et al.*, 2001).

Um dos alimentos fabricado com *Rhizopus* é o *tempeh*, um alimento tradicional indonésio preparado por fermentação de soja descascada e cozida com o fungo *Rhizopus*. Esse alimento também pode ser produzido com outros cereais, a exemplo da cevada.

O *Rhizopus* foi estudado por vários pesquisadores em fermentação semissólida com produtos agroindustriais.

Escaramboni (2014) avaliou a produção de amilases por *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação em estado sólido com farelo de trigo. Seus resultados evidenciaram a viabilidade técnica do bioprocesso desenvolvido utilizando resíduos da fabricação do amido tanto para a produção de amilases como xarope de glicose.

Miranda (2014) em seu estudo sobre a bioconversão energética da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* para obtenção de alimento concluiu que os resíduos da mandioca, após a bioconversão a baixo custo, possuem as qualidades necessárias para suprirem a grande demanda

por alimento, principalmente em regiões onde há situações graves de desnutrição.

Suhet e Fioreze (2011) avaliou a fermentação semissólida do resíduo da industrialização do abacaxi, adicionado de 0,3% de ureia e sem adição do sal, *para a produção de proteína unicelular de Rhizopus oligosporus e Aspergillus niger.*

A seguir será apresentada a metodologia do trabalho, citando as análises laboratoriais realizadas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção e preparação da amostra

A figura 1 mostra caju da espécie *Anarcadium occidentale L.*

**Figura 1 - Caju**



**Fonte: Autora**

A Figura 2 apresenta a fotografia da amostra de resíduo de caju, que foram coletadas, no mês de junho de 2016, do processo de produção de polpa de fruta de caju, de uma empresa localizada no Estado de Alagoas.

**Figura 2 - Amostra de resíduo de caju**



**Fonte: Autora**

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno, transportadas sob congelamento para o Laboratório de Análise de Alimentos do

SENAI-ALAGOAS e após a realização da fermentação foi mantida em temperatura de congelamento e enviada ao Laboratório de Pesquisa Aplicada de Alimentos e Biotecnologia do SENAI-CIMATEC-BA, onde foram mantidas à temperatura de congelamento até o momento da análise.

### 3.2 Caracterização físico-química da amostra

Para as amostras de resíduo de caju foram realizadas análises em triplicata para determinações de umidade, sólidos solúveis totais (°Brix), cinzas totais, lipídios, colorimetria, índice de refração, proteínas totais, fibras e atividade de água, visando a caracterização do mesmo.

A umidade foi determinada por secagem em Balança de Infravermelho Shimadzu®, ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 110°C pelo processo de secagem em estufa a 105°C.

A análise do teor de sólidos solúveis (°Brix) e o índice de refração foram determinados por refratômetro digital a 25°C.

Empregou-se o método de resíduo por incineração para análise de cinzas (IAL, 2008).

Para determinação dos lipídeos totais foi aplicada a metodologia de BLIGH & DYER (BLIGHT & DYER, 1959).

A colorimetria foi determinada utilizando colorímetro Konica Minolta®, modelo CR-400, tendo como base o sistema CIELAB, obtendo as coordenadas L\*, a\*, b\*.

A atividade de água foi determinada com um decágono, LabMaster Novasina®.

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl (IAL, 2008), utilizando o fator de conversão 6,25.

O teor de fibras foi obtido através do analisador automático de fibras (AKNON) (VAN SOEST & WINE, 1967). A fibra em detergente ácido (FDA) configura-se como a porção menos digerível da parede celular, sendo constituída, basicamente, de lignocelulose, ou seja, lignina mais celulose. A

fibra em detergente neutro (FDN) compreende as frações de celulose, hemicelulose e lignina. A diferença entre as frações FDA e FDN pode ser considerada uma estimativa do teor de hemicelulose, mas não como uma determinação precisa, devido à presença de outros componentes da fibra (CECCHI, 1999).

O percentual de carboidratos totais foi determinado a partir da diferença do somatório dos demais componentes (umidade, proteínas, lipídeos e cinzas) subtraindo-se o valor encontrado por cem.

Para cálculo de valor calórico, considerou-se os fatores de conversão: carboidratos e proteínas fornecem 4 kcal/g; e lipídios fornecem 9 kcal/g. Com base nas quantidades de carboidratos, proteínas e lipídios das amostras, multiplicou-se o valor pelo fator de conversão mencionado.

### 3.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram as espécies *Rhizopus microsporus* (ATCC 52812) e *Candida albicans* (ATCC 10231), cedidos pelo banco de cultivo do laboratório de Microbiologia do Instituto de ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia.

As culturas foram mantidas em Ágar Dextrose Batata (*Potato Dextrose Agar* – PDA), cuja composição está apresentada na tabela 1, sendo repicadas a cada 20 dias através da transferência para placas de Petri contendo 20 mL de meio PDA e cultivadas em estufa a 35°C por sete dias. Após 7 dias de cultivo, as placas foram coletadas, selecionando-se, cuidadosamente, aquelas com crescimento uniforme e presença de esporos, e mantidas sob refrigeração a 4°C até por até 10 dias para a realização dos experimentos.

**Tabela 1 - Composição do Meio PDA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (Fórmula/Litro)</b>
Amido de batata	4,0g
Dextrose	20,0g
Agar	15,0g

Fonte: Difco & BBL, 2009.

### 3.4 Inoculação e cultivo semissólido

Frascos de Erlenmeyer contendo 10mL de meio PDA foram submetidos a esterilização em autoclave a 121°C por quinze minutos. Após esfriar o meio PDA, os frascos receberam 10g de substrato (resíduo de caju), sendo em seguida inoculados com uma suspensão contendo  $10^6$  esporos/mL de *Rhizopus microsporus* ou de *Candida albicans*.

Para a suspensão conter  $10^6$  esporos/mL utilizou-se 10mL de solução salina estéril a 0,85% e acrescentou-se o *Rhizopus microsporus* até atingir essa contagem na câmara de Neubauer usando como corante o Azul de Lactofenol Algodão.

Em relação à contagem de *Candida albicans*, foi averiguada que a escala 0,5 de *Mac Farland* equiparou-se a  $10^6$  leveduras/mL.

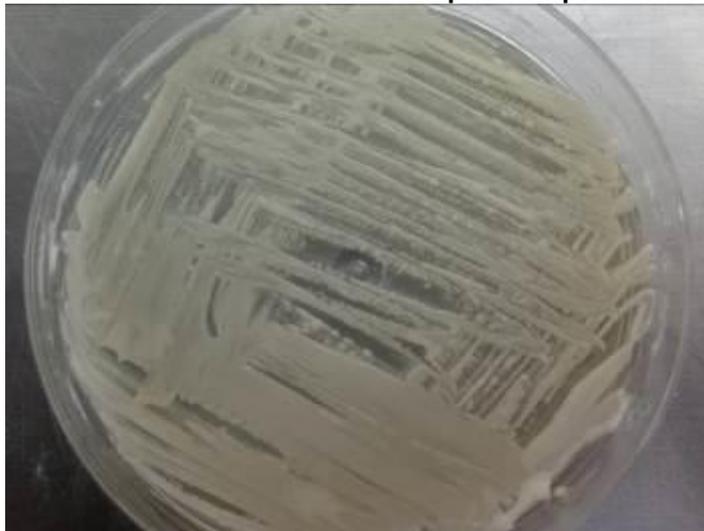
Após agitação, os frascos Erlenmeyer foram fechados com algodão e duas camadas de gaze estéril e bandas elásticas, sendo então acondicionados em estufa com temperatura controlada a 35°C por 4 dias.

Amostras foram colhidas em duplicata a cada 12 horas, totalizando 96 horas, para análises de pH, teor de sólidos solúveis e proteína. E para cada tempo também foi colhida uma amostra de controle, contendo 10ml de meio PDA, 10 ml de água destilada estéril e a suspensão contendo  $10^6$  esporos/ml de *Rhizopus* ou de *Candida*. Durante o cultivo os frascos foram mantidos estáticos.

### 3.4.1 Confirmação da identificação de leveduras

A Figura 8 demonstra o crescimento da levedura *Candida albicans* em placa de petri contendo meio PDA após incubação em estufa.

**Figura 3 - Crescimento de *Candida albicans* em placa de petri contendo meio PDA**



Fonte: Autora

#### - Prova do tubo germinativo da espécie *Candida albicans*

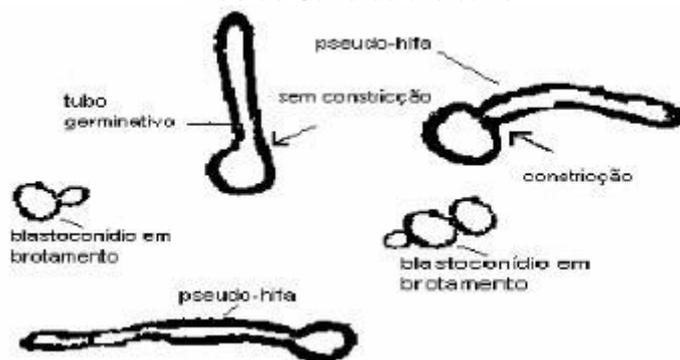
A prova do tubo germinativo é um teste que caracteriza rápida e presuntivamente a levedura da espécie *Candida albicans*. A técnica baseia-se na semeadura de um pequeno inóculo dessa levedura em soro fetal bovino.

Com a ponta de uma pipeta Pasteur estéril, retirou-se uma pequena porção de uma colônia de levedura e emulsionou de forma asséptica em 0,5mL de soro fetal bovino. Incubou-se a 37°C por três horas em estufa bacteriológica (USP, 2003).

Passado esse período de incubação, retirou-se uma gota da suspensão e montou-se uma preparação do tipo lâmina-lamínula, para observação microscópica.

O resultado foi positivo para o tubo germinativo, pois apareceu um filamento fino e cilíndrico, originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observou nenhuma zona de constricção, confirmando assim a identificação de *Candida albicans*, conforme figura 9.

**Figura 4 – Prova do tubo germinativo com blastoconídios, tubo germinativo e pseudo-hifas de *Candida albicans***



Fonte: Brasil, 2004.

Já a Figura 10 demonstra a imagem microscópica da *Candida albicans*, onde pode-se observar os blastoconídios.

**Figura 5 - Imagem de microscópico da *Candida albicans***



Fonte: OPTIMAL HEALTH NETWORK, 2016.

### 3.4.2 Identificação da espécie *Rhizopus microsporus*

A Figura 11 mostra a fotografia do crescimento da *Rhizopus microsporus* em placa de petri contendo meio PDA. Após incubação em estufa, a macromorfologia do *Rhizopus microsporus* caracteriza-se por uma colônia de crescimento rápido, cotonosa, inicialmente branca, podendo passar para acinzentada e amarronzada, recoberta de pontos negros.

**Figura 6 - Crescimento de *Rhizopus microsporus* em placa de petri contendo meio PDA**



**Fonte: Autora**

Para confirmação do *Rhizopus microsporus* foi realizado a técnica de microcultivo fazendo uso de um cubo de meio PDA nas dimensões de 1cm x 1cm onde este foi depositado em uma lâmina e sobre este foi colocado uma lamínula. Foi inoculado nas partes expostas deste sistema o fungo *Rhizopus microsporus* em câmara úmida (USP, 2003).

Após 5 dias de inóculo, o meio foi retirado e foi montado um sistema do tipo lâmina/ lamínula corado previamente com azul de lactofenol algodão.

Foi analisado em microscópio com aumento de 40x e observado a presença de rizoides, tipo das hifas e formas e disposição dos esporos, conforme visualizado na figura 12.

Figura 7 - Morfologia microscópica de um cultivo *Rhizopus microsporus*



Fonte: SOCIEDADE AMERICANA DE MICROBIOLOGIA, 2016.

### 3.5 Análise do resíduo do caju fermentado

As amostras fermentadas foram feitas em triplicata para cada tempo de fermentação. A cada 12h foram retiradas amostras da estufa para determinação de pH em pHmetro digital; proteína pelo método de *Kjeldahl* (IAL, 2008), utilizando o fator de conversão 6,25; e teor de sólidos solúveis determinados por refratômetro digital a 25°C, nos tempos de 0 a 96 horas, totalizando 9 amostras.

Para a realização do cálculo do aumento proteico do resíduo do caju foi definido como a razão entre o valor proteico do resíduo enriquecido (g) e o valor proteico da caracterização do resíduo do caju no instante inicial, conforme Equação 1.

$$\text{Aumento proteico} = \frac{\text{valor proteico do resíduo enriquecido}}{\text{valor proteico do resíduo no instante inicial}} \quad (1)$$

### 3.6 Análise estatística

Os experimentos, referentes aos nove tempos diferentes, com duas repetições cada, foram analisados através da comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Excel<sup>®</sup>.

## 4 ANÁLISE E RESULTADOS DA PESQUISA

### 4.1 Caracterização inicial das amostras

A composição química do resíduo do caju depende de alguns fatores como: variedade, origem, técnicas agrícolas, clima, solo o grau de maturação dos frutos e processo industrial. Os valores médios da caracterização físico-química do resíduo do caju são apresentados na Tabela 2.

Conforme apresentado na Tabela 2 determinou-se um valor de umidade foi de 88,77%. Canuto *et al.* (2009) encontrou resultado semelhante (93,8%) em seu estudo com polpa de caju. Já Campos *et al.* (2005) encontrou resultado inferior ao determinado neste estudo para o bagaço do pedúnculo de caju (70,98%).

**Tabela 2 - Resultados da caracterização físico-química do resíduo do caju (Média  $\pm$  desvio padrão)**

<b>Análises</b>	<b>Resíduo de caju (<i>In natura</i>)</b>
Umidade (%)	88,77 $\pm$ 0,37
Atividade de água	0,95 $\pm$ 0,01
Lipídios (%)	0,85 $\pm$ 0,11
Sólidos Solúveis Totais ( $^{\circ}$ Brix)	4,07 $\pm$ 0,12
Índice de refração	1,3389 $\pm$ 0,00
Cinzas totais (%)	0,49 $\pm$ 0,01
Proteínas (%)	0,80 $\pm$ 0,05
Carboidratos (%)	9,18 $\pm$ 0,47
Valor calórico total (kcal)	47,55 $\pm$ 1,02

Os valores encontrados na análise de atividade de água para o resíduo de caju *in natura* foi de 0,95 (Tabela 1). Moraes (2014) em seu estudo sobre caracterização físico-química da polpa de caju *in natura* encontrou 0,98 de Aw. Esse mesmo resultado Sancho *et al.* (2007) encontrou em sua pesquisa em suco de caju. A atividade de água está relacionada à quantidade de água livre para o desenvolvimento do microrganismo, podendo influenciar na qualidade e estabilidade durante o processamento, conservação e armazenamento.

A quantidade de lipídeos encontrada na amostra analisada *in natura* foi de 0,85g/100g. Os valores identificados neste estudo são superiores aos encontrados para a polpa de caju (0,10g/100g) em estudo de Canuto *et al.* (2009).

O teor de sólidos solúveis totais apresenta correlação com teores de açúcares e ácidos orgânicos, característica de interesse para produtos comercializados *in natura*, pois o mercado consumidor prefere frutos doces (SILVA *et al.*, 2002).

De acordo com a Tabela 1, ao analisar a quantidade de sólidos solúveis totais no resíduo de caju *in natura* foi encontrada 4,7 °Brix, referente ao teor de açúcares ou de carboidratos solúveis, quanto maior seu grau Brix maior será seu teor de açúcar. Brandão *et al.* (2003) caracterizaram o pedúnculo *in natura* de caju e constataram que este possuía 9,8 °Brix. Já Canuto *et al.* (2009) encontrou 5,0 °Brix na polpa de caju analisada. Pinheiro (2006) ao analisar sucos integrais de caju encontrou variação de brix de 10,3 a 13 °Brix.

O valor de proteína do resíduo do caju nesse estudo foi de 0,80% (Tabela 1). Alcântara *et al.* (2007) em seu estudo com pedúnculo de caju seco encontrou valor de proteína bruta de 11,54%, resultado próximo do valor observado por Santos *et al.* (2007) 10,10%. Entretanto, Matias *et al.* (2005) relataram valor para o bagaço de 3,25%. Para o pedúnculo fresco, Holanda *et al.* (1998) observaram concentração de proteína bruta em torno de 6,58% (ALCÂNTARA *et al.*, 2007).

É importante destacar que, as variações nas características químicas, físicas, valor nutricional e a palatabilidade dos resíduos gerados pelas agroindústrias dependem de vários fatores, sendo os mais importantes: a

variedade das frutas utilizadas, os métodos de processamento e o tempo de armazenamento (LOUSADA *et al.*, 2006).

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados da análise colorimétrica das amostras.

**Tabela 3 - Determinação colorimétrica do resíduo do caju (Média  $\pm$  desvio padrão)**

Amostras	Parâmetros		
	L*	a*	b*
Amostra 1	57,46 $\pm$ 0,08	2,42 $\pm$ 0,04	26,38 $\pm$ 0,10

Os valores de L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) foram obtidos diretamente do colorímetro. L\* varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o preto (ou cor escura) e o 100, o branco (cor clara). Os valores de Cromo a (a\*) oferece a tonalidade da amostra que tende da cor verde (-a\*) para a cor vermelha (+a\*) e Cromo b (b\*) tonalidade que tende da cor azul (-b\*) para a cor amarela (+b\*) (CANUTO *et al.*, 2009).

A luminosidade encontrada foi de 57,46  $\pm$  0,08 (Tabela 2), resultado similar ao encontrado por Canuto *et al.* (2009), em seu estudo sobre caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia, onde na análise de cor da polpa de caju a luminosidade L foi igual a 57,6  $\pm$  0,5.

A cor em alimentos resulta da presença de compostos coloridos já existentes no produto natural (pigmentos naturais), ou da adição de corantes sintéticos (LOUSADA *et al.*, 2006).

Na Tabela 4 são apresentados os valores obtidos para a determinação de fibras das amostras estudadas. Os resultados obtidos de FDN (Fibra em Detergente Neutro) foi de 49,23%, já os valores de FDA (Fibra em Detergente Ácido) de 38,71. Os resultados ficaram abaixo comparando com estudos realizados por Ferreira *et al.* (2004) que encontrou 76,7% de FDN e 46,6% de FDA. Já Ferreira *et al.* (2007) encontrou 72,2% de FDN e 56,5% de FDA. Pinho (2009) encontrou no resíduo úmido de caju um percentual de 9,81% para FDN e 5,84% para FDA. Essa diferença pode ser devido aos diferentes processamentos os quais o resíduo do pedúnculo de caju foi submetido.

Lima *et al.* (2002) avaliaram fibra do bagaço de caju e obtiveram teor de fibra alimentar de 61%, sendo que um alimento com teor de 2% a 3% já pode ser considerado uma boa fonte de fibra alimentar, para prevenção doenças, principalmente relacionadas ao trato gastrointestinal e ao coração.

**Tabela 4 - Determinação de fibras no resíduo de caju (Média  $\pm$  desvio padrão)**

<b>Composição</b>	<b>Amostra 3</b>
FDN (%)	49,23 $\pm$ 053
FDA (%)	38,71 $\pm$ 1,40
Celulose	14,64 $\pm$ 1,16
Hemicelulose	10,19 $\pm$ 1,39
Lignina	24,69 $\pm$ 1,40

Diante dos resultados da caracterização e devido ao fato dos resíduos agroindustriais do processamento da polpa de caju serem susceptíveis de emprego como substrato para fermentação semissólida, sugere-se o enriquecimento proteico através desse tipo de fermentação.

#### 4.2 Enriquecimento proteico a partir da fermentação semissólida

A Tabela 5 apresenta os resultados, nos diversos intervalos de tempo, do comportamento do teor de sólidos solúveis, pH e proteína nas fermentações, com o resíduo do caju, adicionado da levedura *Candida albicans*. A maior produção de proteína com o uso de *C.albicans* foi ao tempo de 48h, onde não apresentou diferença significativa, quando comparada com a amostra de 72h e 96h, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

A maior quantidade de proteína encontrada foi de 2,33%  $\pm$  0,02 no tempo de 48 horas na fermentação com *Candida albicans*. Considerando que na caracterização físico-química do resíduo de caju, a quantidade de proteína desse resíduo foi de 0,8% e utilizando a equação 1 para o cálculo do ganho proteico então a produção de proteína no fermentado com *Candida albicans* no tempo de 48h foi de 2,9 vezes maior que o valor inicial do resíduo in natura.

**Tabela 5 - Valores de Sólidos Solúveis Totais, pH e proteína nos fermentados com resíduo de caju e *Candida albicans***

Tempo	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	pH	Proteína
0h	7,55b <sup>1</sup>	3,32d	1,93b
12h	9,05a	3,47cd	2,04ab
24h	8,00b	3,37d	1,91b
36h	6,20c	3,39cd	1,92b
48h	5,75c	3,46cd	<b>2,33a</b>
60h	4,75d	3,65bc	1,94b
72h	4,45d	3,85b	2,13ab
84h	3,75e	3,90b	2,01b
96h	4,50d	4,20a	2,04ab

<sup>1</sup> Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A Tabela 6 demonstra que a maior produção de proteína com o uso de *Rhizopus microsporus* foi ao tempo de 60h, onde não apresentou diferença significativa, quando comparada com a amostra de 72h, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 6 - Valores de Sólidos Solúveis Totais, pH e proteína nos fermentados com resíduo de caju e *Rhizopus microsporus***

Tempo	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	pH	Proteína
0h	6,45a <sup>1</sup>	4,30bc	1,98d
12h	6,30 <sup>a</sup>	4,04de	2,06cd
24h	5,15b	3,90e	1,96d
36h	4,85b	4,17cd	2,01d
48h	4,35c	4,39ab	2,21bc
60h	4,25cd	4,46a	<b>2,46a</b>
72h	3,95de	4,21c	2,33ab
84h	3,65e	4,20cd	2,24bc
96h	3,70e	4,31abc	2,24b

<sup>1</sup> Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A maior quantidade de proteína encontrada foi de 2,46% ± 0,02DP no tempo de 60 horas na fermentação com *Rhizopus microsporus*. O ganho proteico de acordo com cálculo através da equação 1, no tempo de 60 horas, utilizando o *Rhizopus microsporus* foi 3,1 vezes maior que o valor inicial do resíduo *in natura*. Coelho *et al.* (2001) e Campos *et al.* (2005) ao fermentar o bagaço de caju com *Saccharomyces cerevisiae* também encontrou um aumento de proteína 3 vezes maior que a quantidade inicial.

Um aumento proteico (até 13% vezes o valor inicial proteico) utilizando *Aspergillus niger* e sulfato de amônia no bagaço de caju por fermentação em estado sólido foi encontrado por Pontes (2009). Esse valor mais elevado pode ser associado à adição de sulfato de amônio. O aumento proteico encontrado no resíduo do pedúnculo de caju possibilita a utilização em suplementos proteicos.

A figura 8 e 9 demonstra a relação da variação do pH e dos sólidos solúveis totais no curso das fermentações, onde pode-se verificar que ocorreu variação do pH nos diferentes tempos. A elevação do pH, a partir de 24 horas de fermentação, foi observada por Jay *et al.* (2005) na produção de tempeh com o fungo *Rhizopus oligosporus* e *R. arrhizus* (SUHET & FIOREZE, 2011). A discreta elevação do pH pode estar relacionada com o consumo dos ácidos pelos microrganismos.

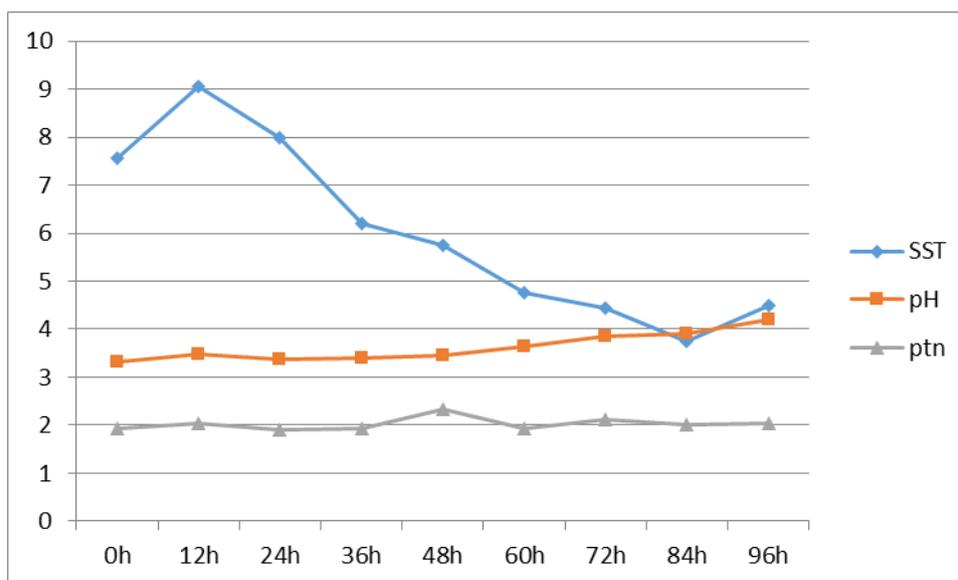


Figura 8 - Caju fermentado com *Candida albicans* nos tempos de 0 a 96h

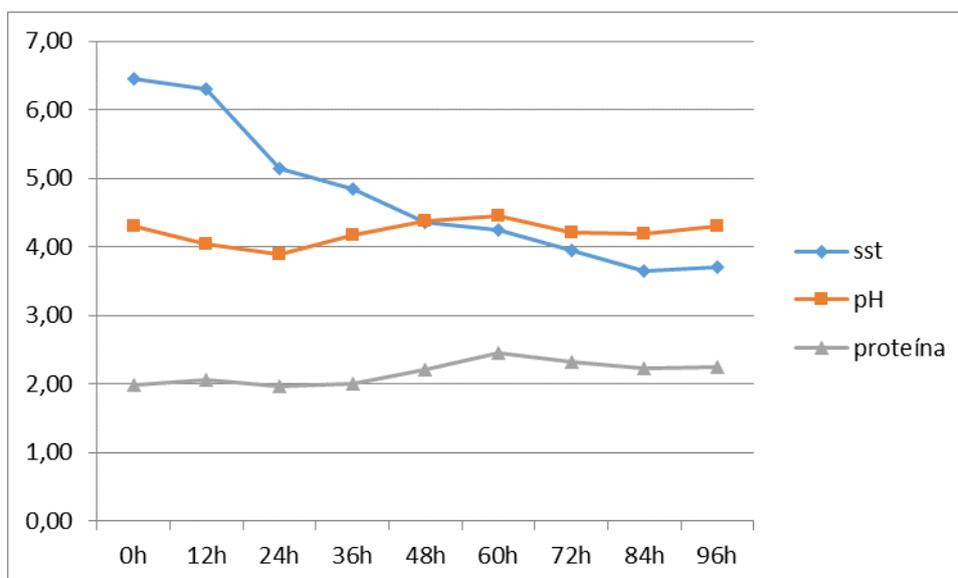


Figura 9 - Caju fermentado com *Rhizopus microsporus* nos tempos de 0 a 96h

A quantidade de sólidos solúveis totais durante a fermentação revelou decréscimo no teor de sólidos solúveis totais no fermentado com *Candida albicans*, indicando o consumo de carboidratos. A variação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) indica o consumo de açúcares durante a fermentação semissólida. O grau Brix é um indicativo do teor de açúcares no meio, sendo que 1°Brix corresponde a aproximadamente 1% da massa em açúcar.

No fermentado com *R. microsporus*, inicialmente ocorreu um leve aumento seguido de decréscimo, seguido de um discreto aumento no tempo final. Resultado similar foi encontrado por Silva *et al.* (2016) em seu estudo sobre enriquecimento proteico no abacaxi verificou houve um declínio da taxa de °Brix em relação ao valor inicial, em seguida um aumento, e novamente um declínio foi observado, esse fato é associado provavelmente devido à presença da levedura no meio, que levou ao consumo de carboidratos durante a fermentação.

A quantidade de água no meio fermentativo semissólido é um fator limitante e afeta diretamente as necessidades do microrganismo, além do tipo de produto final (ALCÂNTARA *et al.*, 2007).

As relações de atividade de água na fermentação em estado semissólido devem ser avaliadas criticamente, pois a  $A_w$  do substrato tem influência determinante na atividade microbiana. Em geral, o tipo de microrganismo que pode crescer em fermentação em estado semissólido é determinado pela  $A_w$ .

O controle deste parâmetro pode ser utilizado para modificar a produção metabólica ou a excreção de um microrganismo (PANDEY, 2003).

O uso de *Rhizopus* em fermentações de alimentos requer um cuidado diferenciado com fungos, que podem ser potencialmente prejudiciais. Os esporangiosporos (esporos), por exemplo, são transportados no ar e a contaminação poderia assim, ocorrer facilmente, tornando a garantia de qualidade importante (JENNESSEN *et al.*, 2008).

Um dos fatores que podem ter influenciado o resultado do estudo foi a granulometria do resíduo de caju, pois foi utilizado da forma proveniente da fábrica de polpa de frutas, ou seja, sua granulometria não foi alterada. Segundo Alcântara *et al.* (2007) o tamanho médio das partículas de resíduo no meio fermentativo deve ser obtido de forma que não se tenha nem partículas grandes, nem partículas pequenas, pois as partículas com tamanho menor promovem uma maior transformação devido a maior área superficial e as partículas maiores promovem mais espaços interpartículas, diminuindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelos microrganismos.

Vale ressaltar que a escolha do uso do resíduo in natura se deu pelo fato de que processos tecnológicos sofisticados para produção de proteína microbiana podem não ser comercialmente atrativos, especialmente em regiões mais carentes, devido ao desenvolvimento econômico da região.

A fermentação do resíduo do caju utilizando o *Rhizopus microsporus* ou *Candida albicans* pode permitir a sua melhor conservação aumentando o tempo de vida desse resíduo, e por outro lado pode permitir obter novos produtos com propriedades nutricionais e sensoriais diferentes das características do resíduo in natura.

## 5 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SOBRE PROTEINA MICROBIANA SOB O ENFOQUE EM DOCUMENTOS DE PATENTES

### 5.1. Introdução

Atualmente, os consumidores estão mudando os seus hábitos alimentares, e entre as novas demandas há um interesse por produtos saudáveis, sustentáveis e confiáveis. O desenvolvimento de produtos com alegação funcional oportuniza as indústrias melhorarem ou desenvolverem novos produtos, além de agregar valor ao produto e trazer inovação e diferencial tecnológico, proporcionando bem-estar ao consumidor.

Uma alimentação saudável associada a outros hábitos saudáveis está diretamente ligada à promoção da saúde e aumento da qualidade de vida. A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm apresentando destaque nos meios científicos. A preocupação se deve ao número de produtos alimentícios existentes e a uma tendência de se ingerir produtos naturais (MOREIRA *et al.*, 1999; BOSQUESI *et al.*, 2016).

Pesquisas indicam que consumidores têm procurado por uma alimentação mais saudável e de qualidade, isto têm sido evidenciado por um significativo aumento na demanda por alimentos nutritivos e seguros. A ingestão de alimentos balanceados é a maneira correta de evitar ou mesmo corrigir problemas de saúde, como: obesidade, diabetes, desnutrição, cardiopatias, entre outros que têm origem, em grande parte, nos erros alimentares (POZZO, 2012; GUYTOSKY, 2006).

A prospecção tecnológica serve como um meio sistemático de mapeamento científico e tecnológico capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (MAYERHOFF, 2008).

Dados como publicações bibliométricas e patentes são comumente utilizados para avaliar o cenário científico e tecnológico mundial, assim como classificar empresas que fazem uso de PD&I. De acordo com o Manual de

Frascatti (OECD, 2005), as patentes representam em maior medida o produto da investigação tecnológica e empresarial, uma vez que protegem os conhecimentos com potencial de interesse econômico. Com relação à publicação de artigos científicos, representa maior aproximação entre o produto e a pesquisa acadêmica (HAYASHI *et al.*, 2006; BORGES *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2016).

Existem alguns estudos sobre prospecção tecnológica no Brasil baseados em publicações de patentes. Reis *et al.* (2011) em seu estudo objetivou mapear as pesquisas desenvolvidas com filmes incorporados de glicerol como plastificante em uma matriz biodegradável, obtida a partir de amido, e que tenham propriedades funcionais. Machado *et al.* (2012) realizou estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil.

Machado *et al.* (2012) em seu estudo sobre o mapeamento tecnológico da goma xantana detectou que o Brasil ainda possui poucas patentes na área, sendo necessários mais incentivos que visem aumentar o cenário inovativo do país.

O desenvolvimento de produtos com alegação funcional oportuniza as indústrias melhorarem ou desenvolverem novos produtos, além de agregar valor ao produto e trazer inovação e diferencial tecnológico, proporcionando o bem-estar ao consumidor.

Dentro desse contexto, esse trabalho teve como objetivo realizar um estudo de prospecção tecnológica relacionado ao desenvolvimento e obtenção de proteína microbiana a partir de diferentes fontes, através da análise de documentos de patentes depositados em todo o mundo.

## 5.2. Metodologia

Para a pesquisa da tecnologia de interesse, protegida ou descrita em documentos de patentes, foi elaborada uma estratégia de busca utilizando a opção *Smart Search-Topic* da ferramenta Thomson Innovation© que definiu como as palavras-chaves utilizadas para a busca os seguintes termos: "SOLID FERMENTATION", "MICROSPORUS", "RHIZOPUS", "CASHEW", "PROTEIN", "UNICELLULAR", "CANDIDA ALBICANS", "RESIDUE", "SEMI SOLID",

"INDUSTRIALIZATION", visto que estas palavras poderiam representar a forma como o desenvolvimento e obtenção de proteína unicelular poderiam ser encontrados nos documentos de patentes.

A base de patentes em questão compila o acervo de patentes depositados em todo o mundo. O levantamento foi realizado a partir da pesquisa dos termos selecionados no título e resumo dos documentos de patentes. A obtenção dos gráficos foi realizada pela plataforma Thomson Innovation© - THOMSON REUTERS (USA) do SENAI CIMATEC que possui licença para a utilização. A pesquisa foi realizada em abril de 2017. Destaca-se que o termo documentos de patentes envolve as patentes depositadas, expiradas ou concedidas.

### 5.3. Resultados

Foi identificado um registro de 1.000 documentos principais encontrados em um universo de 106.647.583 documentos pesquisados. Os documentos em questão estavam distribuídos em 330 famílias de interesse. Considera-se uma família de patentes o conjunto de documentos de patente publicados em diferentes países relacionados com uma mesma invenção, dessa forma, os documentos duplicados não foram considerados.

Com os dados do levantamento na base de patentes da tecnologia de interesse, foi possível identificar a evolução anual do depósito de patentes, os principais países depositantes, bem como, as principais empresas e pesquisadores depositantes da tecnologia pesquisada, além da distribuição das principais áreas de aplicação de acordo com a classificação internacional de patentes.

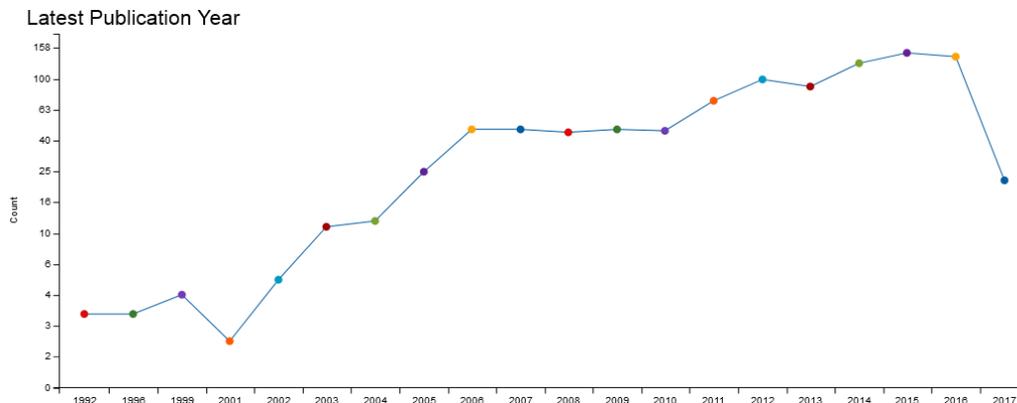
De acordo com a evolução anual do depósito de patentes da tecnologia pesquisada, pode-se observar um aumento considerável do número de patentes a partir de 2002 (Figura 10), chegando a 158 patentes no ano de 2015. O ano de 2017 se apresenta com poucas patentes, provavelmente pelos dados terem sido coletados em abril do ano corrente e também devido ao período de sigilo das patentes (18 meses).

O crescimento de registros de patentes pode estar associado ao aumento da conscientização ambiental visando minimizar resíduos sólidos de

agroindústrias, além de agregar qualidade nutricional ao produto final visto que os resíduos podem ser fontes de nutrientes e servir de ingredientes na fabricação de novos produtos.

Coelho *et al.* (2016) em estudo prospectivo, nos Bancos de dados do *European Patent Office* (EPO) no Espacenet®, e no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), avaliando a utilização do fruto e casca do maracujá concluíram que o reaproveitamento do resíduo do maracujá é uma alternativa para explorar o seu alto valor nutricional e para a obtenção de produtos inovadores de alto potencial de mercado, onde o maior destino industrial para aproveitamento das cascas de maracujá tem sido em produtos alimentícios (68%).

No estudo sobre prospecção tecnológica de alimento em forma de barras de cereais utilizando resíduos, Uchoa & Caminha (2015) encontrou um registro de patente sobre a utilização de resíduos da indústria de polpa de manga na composição da barra de cereal e foi depositada pela Universidade Estadual de Maringá, Brasil.



**Figura 10 - Evolução anual do depósito de patentes da tecnologia pesquisada entre os anos de 1992 e 2017.**

Fonte: Thomson Innovation©

A utilização de resíduos agroindustriais para enriquecimento proteico é percebida por diversos autores através de pesquisas em artigos científicos sobre a utilização do resíduo de caju. Monteiro *et al.* (2015) avaliou a cinética do enriquecimento de proteínas por *Saccharomyces cerevisiae*, de misturas constituídas de resíduo de caju, abacaxi e maracujá em câmara com condições controladas de umidade relativa do ar (UR). Campos *et al.* (2005) estudaram o

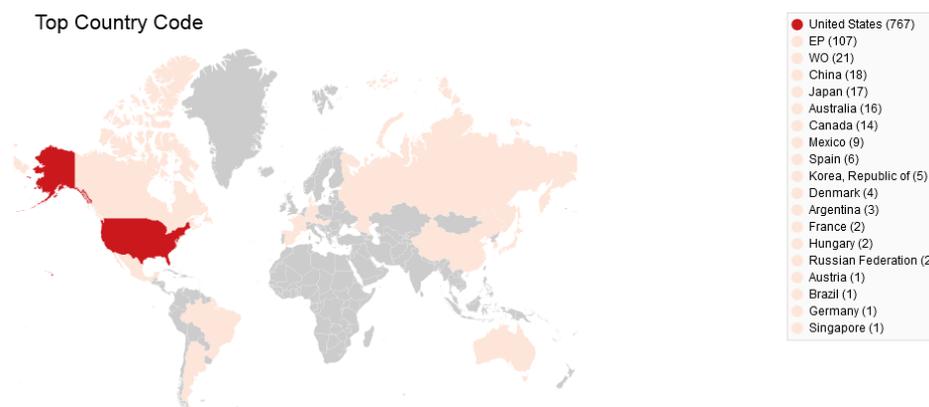
enriquecimento proteico utilizando apenas o bagaço do pedúnculo do caju por fermentação semissólida.

Já Lima *et al.* (2015) estudaram a pré-hidrólise e hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo do caju e a remoção dos compostos tóxicos do licor hidrolisado usando a lignina residual como adsorvente e fermentação alcoólica dos licores para a produção de bioetanol de segunda geração.

Em relação aos principais países depositantes, os Estados Unidos se destaca por ser o principal detentor dos documentos de patentes acerca do desenvolvimento e obtenção de proteína unicelular (Figura 11). O Brasil possui apenas uma patente depositada no período pesquisado, esse resultado pode estar associado a pouco incentivo no desenvolvimento de novas tecnologias e a promoção de inovação no mercado brasileiro.

Os Estados Unidos também se destaca em outras áreas do conhecimento como maior detentor de patentes, a exemplo: do processo para obtenção de nanocristais, principais fontes e aplicação dos mesmos em filmes biodegradáveis (COSTA *et al.*, 2016); na área de produção, caracterização e aplicações da goma xantana (MACHADO *et al.*, 2012); e, se destaca, ainda, acerca dos filmes biodegradáveis plastificados por glicerol e com propriedades específicas (REIS *et al.*, 2011).

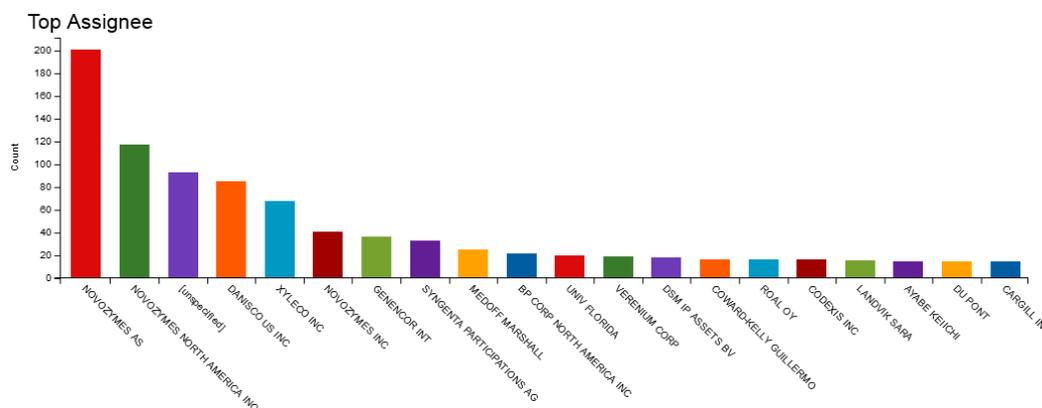
Ainda de acordo com a Figura 11, os países asiáticos encontram-se como o segundo detentor de patentes acerca do assunto pesquisado. Fato justificável, pois em sua cultura existe o hábito de consumir alimentos fermentados a partir do uso de fungos filamentosos, a exemplo do *tempeh*, *misso*, *sake* ou a *combuca*.



**Figura 11 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana por país de origem/região dos depositantes entre 1992 e 2017 (WO = PCT: *Patent Cooperation Treaty*; EP: *Organização Europeia de Patentes*).**

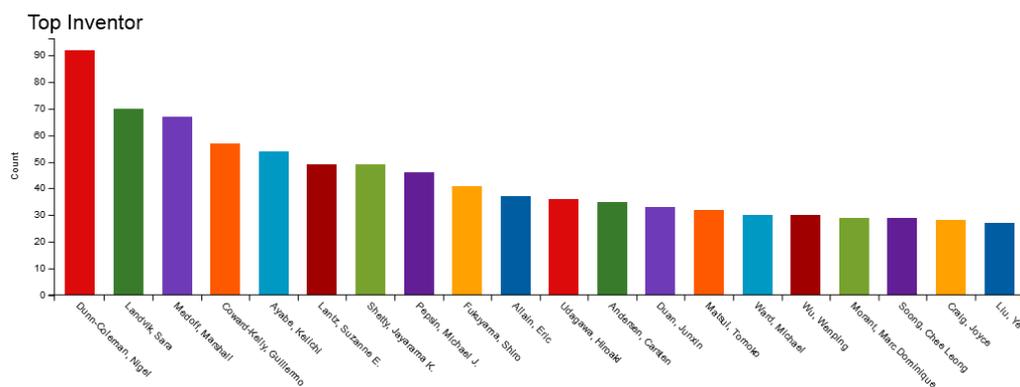
Fonte: Thomson Innovation©

Dentre os principais depositantes de patentes na tecnologia pesquisada encontram-se empresas de desenvolvimentos de ingredientes para alimentos e de soluções tecnológicas e biotecnologia (Figura 12), tendo destaque em numero de patentes as empresas Novozymes®, as quais possuem domínio sobre o mercado mundial de enzimas, e os principais inventores encontram-se ligados a essas empresas (Figura 13).



**Figura 12 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana relacionados aos principais depositantes.**

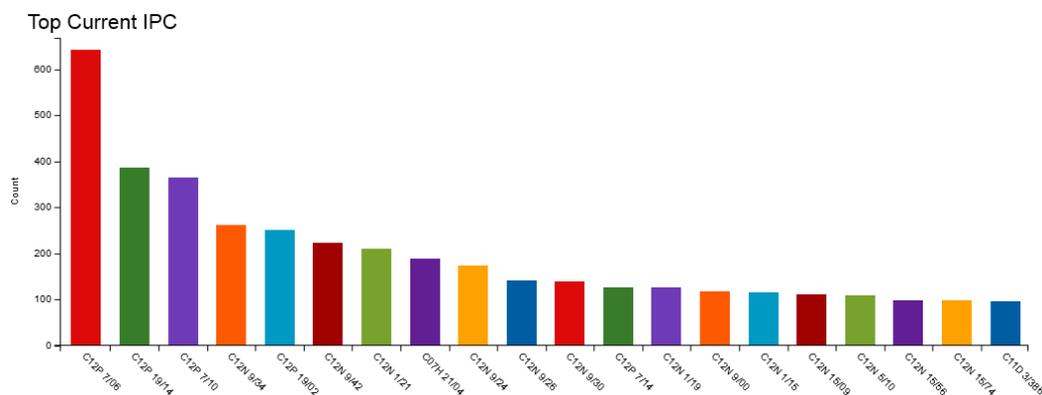
Fonte: Thomson Innovation©



**Figura 13 - Depósitos de patentes relacionadas à proteína microbiana relacionados aos principais inventores.**

Fonte: Thomson Innovation©

Notou-se que a IPC mais empregada nos documentos de patentes foi o C12N e C12P (Figura 14), a qual está dividida em diferentes subgrupos de acordo com a IPC correspondente. Vale salientar que um único documento pode ser classificado em diferentes categorias, incluindo classes, subclasses e subgrupos distintos.



**Figura 14 - Distribuição dos principais códigos de classificação internacional de patentes (IPC) identificados nos documentos sobre proteína microbiana.**

Fonte: Thomson Innovation©

De acordo com a Tabela 7, o código C12N refere-se a microrganismos ou enzimas e suas composições, já o código C12P a processos de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica.

**Tabela 7 – Descrição dos códigos da Classificação Internacional de Patentes – IPC**

<b>IPC</b>	<b>Descrição da Classificação Internacional de Patentes – IPC</b>
C12N	MICRO-ORGANISMOS OU ENZIMAS; SUAS COMPOSIÇÕES (biocidas, repelentes ou atrativos de pestes, ou reguladores do crescimento de plantas contendo micro-organismos, vírus, fungos microbianos, enzimas, fermentados, ou substâncias produzidas por, ou extraídas de, micro-organismos ou material animalA01N 63/00; preparado medicinaisA61K; fertilizantesC05F); PROPAGAÇÃO, CONSERVAÇÃO, OU MANUTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS; ENGENHARIA GENÉTICA OU DE MUTAÇÕES; MEIOS DE CULTURA (meios de ensaio microbiológicoC12Q 1/00)
C12P	PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO OU PROCESSOS QUE UTILIZEM ENZIMAS PARA SINTETIZAR UMA COMPOSIÇÃO OU COMPOSTO QUÍMICO DESEJADO OU PARA SEPARAR ISÔMEROS ÓPTICOS DE UMA MISTURA RACÊMICA [3]
C07H	AÇÚCARES; SEUS DERIVADOS; NUCLEOSÍDEOS; NUCLEOTÍDEOS; ÁCIDOS NUCLEICOS (derivados dos ácidos aldônicos ou sacarícosC07C,C07D; ácidos aldônicos, ácidos sacáricosC07C 59/105,C07C 59/285; cianidrinasc07C 255/16; glicaisC07D; compostos de constituição desconhecidaC07G; polissacarídeos, seus derivadosC08B; DNA ou RNA concernentes à engenharia genética, vetores, p. ex. plasmídeos ou seu isolamento, preparação ou purificaçãoC12N 15/00; indústria do açúcarC13).
C11D	COMPOSIÇÕES DE DETERGENTES; USO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS COMO DETERGENTES; SABÃO OU FABRICAÇÃO DO SABÃO; SABÕES DE RESINA; RECUPERAÇÃO DO GLICEROL

Fonte: Publicação Oficial Classificação Internacional de Patentes (IPC) - INPI

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Conclusões

O resíduo de caju *in natura* possuía umidade de  $88,77\% \pm 0,37DP$ ; atividade de água de  $0,95 \pm 0,01DP$ ; lipídios de  $0,85 \pm 0,11 DP$ ; proteína de  $0,80 \pm 0,05 DP$  e sólidos solúveis totais de  $4,07^\circ\text{Brix} \pm 0,12DP$ .

Nas condições que a fermentação foi conduzida, neste estudo, maiores quantidades de proteína bruta no resíduo da industrialização do caju foram obtidas utilizando  $10^6$  de esporos/ml de *C.albicans*, considerando pH de 3,46, o tempo de fermentação foi de 48 horas, com produção de proteína bruta de 2,33%, aumentando em 2,9 vezes seu conteúdo e para *R.microsporus* a produção de proteína bruta foi de 2,46%, aumentando em 3,1 vezes seu conteúdo.

A partir do mapeamento tecnológico realizado neste estudo, percebe-se que o desenvolvimento e obtenção de proteína unicelular são estudados há algumas décadas e tem registros crescentes de patentes. Os Estados Unidos possui mais patentes do que os demais países, onde algumas empresas na área de biotecnologia e desenvolvimento de ingredientes para alimentos se destacam no registro de patentes.

### 6.2. Atividades Futuras de Pesquisa

Recomenda-se como atividades futuras realizar:

- Estudos de otimização do processo de enriquecimento proteico de a partir de resíduos de caju;
- Pesquisa visando realizar o escalonamento do processo otimizado para escala piloto e posteriormente, para escala industrial e,
- Estudos sobre a inserção da proteína microbiana fabricada à partir de resíduos agroindustriais em produtos, tendo em vista que

a formulação de barra nutricional proteica utilizando a proteína microbiana é uma opção para o aumento da demanda de produção de alimentos com potencial de alimento funcional. Essa barra pode possuir vantagens de ser prática de transportar e armazenar, além de ser uma opção de lanche útil e rápido, necessitando de estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- ADEDAYO, M. R. et al. Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. **Advances in Applied Science Research**, London, v. 2, n. 5, p. 396-409, 2011.
- AGGELOPOULOS, T. et al. Discarded Oranges and Brewer' s Spent Grains as Promoting Ingredients for Microbial Growth by Submerged and Solid State Fermentation of Agro-industrial Waste Mixtures. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 170, n. 8, p. 1885–1895, Aug. 2013.
- AGGELOPOULOS, T. et al. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710–716, Feb. 2014.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. 2003. 103 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 9, n. 2, p. 137-142, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (Brasil). **Manual técnico de promoção da saúde e prevenção de riscos e doenças na saúde suplementar**. 3. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro : ANS, 2009.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA. Research review paper: Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459–479, Nov. 2000.
- AQUARONE, E. et al (coord.). **Biotecnologia industria: volume 4: Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Blucher, 2001.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase: Revisão: DST. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BATISTA, R. R. **Rotas de aproveitamento tecnológico de resíduo orgânico agrícola: casca de coco, casca de cacau e casca de café: destinadas à geração de energia**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2014.
- BHARGAV, S. et al. Solid-state fermentation: An overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49-70, Jan. 2008.
- BLIGHT, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem.** V. 37, n. 8, p. 911- 917, 1959.

BORGES, C. B.; SANTOS, V. J. B.; GALINA, S. V. R. Resultado da inovação em multinacionais estrangeiras: análise de patentes nos BRICs. **FACEF Pesquisa**, v. 13, n. 1, 2010.

BOSQUESI, R. M.; CAMISA, J.; SANTOS, F. C. Avaliação dos teores de proteínas e lipídios em barras proteicas. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 10, n. 55, p. 24-30, jan./fev. 2016.

BRANDÃO, M. C. C. et al. Análises físico-químicas e sensoriais de pedúnculo de caju submetidos à desidratação osmótico solar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 139-145, 2003.

IBOPE INTELIGÊNCIA. O perfil do consumo de alimentos no Brasil. In: BRASIL Food Trend 2020. São Paulo: FIESP, Campinas: ITAL, 2010. cap. 4, p. 49-61.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica: módulo VII. Brasília, 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_7_2004.pdf)> Acesso em: 17 nov. 2016.

\_\_\_\_\_. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília, 2013.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 maio 1999.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 maio 1999

BUTOLO, J. E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras formas de nutrientes. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Ital, 1997. p. 70-89.

CAMPOS, A. R. N. et al. Enriquecimento Protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2005.

CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, dez. 2010.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos Em Análise de Alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1999.

CHEN, H. **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer, 2013.

COELHO, Emanuela Monteiro; AZÊVEDO, Luciana Cavalcanti; UMSZA-GUEZ, Marcelo A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 347-361, jul./set.. 2016.

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, jan./jun. 2001.

COSTA, S. S. et al. Estudo Prospectivo sobre a Obtenção e Incorporação de Nanocristais de Celulose em Filmes Biodegradáveis. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n. 4, p. 1104-1114, 29 jul. 2016.

CRUZ, I. L. **Desenvolvimento de um inóculo seguro, eficiente e padronizado para a produção de tempeh em pequena escala a partir de diferentes leguminosas**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

DANTAS FILHO, L. A. **Valor nutritivo do subproduto do pseudofruto do cajueiro tratado ou não com uréia em dietas para ovinos**. 2010. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

ESCARAMBONI, B. **Produção de amilases pelo cultivo em estado sólido de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose**. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2014.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia em alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FEITOZA, E. D. A. et al. Produtos fermentados a base de soja (glycine max). **Revista saúde e ciência On line**, Campina Grande, v. 3, n. 3, p. 263-274, set./dez. 2014.

FERREIRA, A. C. H. et al. Características químicas e fermentativas do capim-elefante ensilado com níveis crescentes de subproduto da agroindústria do caju. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 4, p. 723-731, out./dez. 2007.

FERREIRA, A. C. H. et al. Valor Nutritivo das Silagens de Capim-Elefante com Diferentes Níveis de Subprodutos da Indústria do Suco de Caju. **R. Bras. Zootec.**, Piracicaba, v. 33, n. 6, p. 1380-1385, 2004.

GOWTHAMANA, M. K. et al. Fungal solid state fermentation: an overview. In: AGRICULTURE AND FOOD PRODUCTION. **Applied Mycology and Biotechnology**, v. 1, p. 305-352, 2001.

GUTKOSKI, L. C. et al. Desenvolvimento de barras de cereais á base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27. p. 355-363, 2007.

HAYASHI, M. C. P. I. et al. Indicadores de CT&I no Pólo Tecnológico de São Carlos: Primeiras Aproximações. **Revista Digital de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, Campinas, v. 3, n. 2, 2006.

HOLANDA, J. S. et al. **Da carne de caju à carne de cordeiro**. Natal: Emparn, 2010. 42 p. (Emparn. Boletim de pesquisa, 35).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. (Versão eletrônica).

JENNESSEN, J. et al. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group, **Mycological Research**, v. 12, p. 547-563, 2008.

JIN, B. et al. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 32, p. 678–686, 2005.

KLEEKAYAI, T.; SUNTORNSUK, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 1145–1154, 2011.

KLEPÁRNÍK, K.; FORET, F. Recent advances in the development of single cell analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 800, p. 12–21, Oct. 2013.

LIMA, E. E. et al. Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pendúculos do caju. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 2, p. 26-35, abr./jun. 2015.

LIMA, L. M. O. et al. Utilização de fibras obtidas do bagaço de frutas tropicais no enriquecimento de biscoitos regionais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002. 1 CD-ROM.

LIMA, Urgel de Almeida. **Agroindustrialização de frutas**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2008.

LOUSADA JÚNIOR, J. E. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 37, n. 1, p. 70-76, 2006.

MACHADO, B. A. S. et al. Uso de Indicadores de Patentes como Metodologia para Avaliação do Desenvolvimento da Tecnologia de Extração Supercrítica. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n. 4, p. 1079-1093, 2016.

MACHADO, B. A. S. et al. Mapeamento Tecnológico da Goma Xantana sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009. **Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 2, p. 154, 2012.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v. 2, n.3, p. 221-235, 2012.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Mapeamento tecnológico da goma xantana sob o enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v. 2, n. 2, p. 154-165, 2012.

MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. **Waste Biomass Valor**, v. 5, p. 529–549, 2014.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365–373, 2011.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma Análise Sobre os Estudos de Prospecção Tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2008.

MÉLO, B. C. A. et al. Avaliação do resíduo agroindustrial de acerola para produção de celulases por fermentação em estado sólido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABEQ, 2014.

MIRANDA, J. C. **Bioconversão energética da folha e bagaço de mandioca pelo fungo *Rhizopus oligosporus* para obtenção de alimento funcional**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2014.

MONTEIRO, L. F. et al. Efeito da umidade relativa do ar durante o processo de enriquecimento proteico de mistura de resíduos. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Articulados, 37., 2015, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2015.

MORAES, Francisca Pereira. **Polpa desidratada de caju amarelo (*Anacardium occidentale* L.) por atomização em spray Dryer: Caracterização físico-química, bioativa e estudo da vida de prateleira do produto**. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

MOREIRA, S. R. et al. Análise microbiológica e química de iogurtes Comercializados em Lavras - MG. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, n. , p.147-

152, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000100027>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

NASSERI, A. T. et al. Proteína única célula: Produção e Processo. **American Journal of Food Technolog**, V. 6, p. 103-116, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIGAM, P. S. Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam P. S.; Pandey A. (ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. 1. ed. Netherlands: Springer; 2009. p. 129-45.

OBOH, G. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp solid media fermentation techniques. **Electronic J Biotechnol**, v. 9, n. 1, p. 46-49, 2006.

ODUGUWA, O. O.; EDEMA, M. O.; AYENI, A. O. Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1816–1820, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Oslo Manual: Guidelines for Collecting and Interpreting Innovation Data**. 3. ed. Oslo: OECD Publishing, 2005.

OLIVEIRA, J. H. S.; COSTA, M. T.; ABUD, A. K. S. Uso do planejamento experimental para avaliar a produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20., 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABEQ, 2014.

OLIVEIRA, V. H. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 1-3, mar. 2008.

OPTIMAL HEALTH NETWORK, INC. **Figura: Candida albicans**. Disponível em: <<http://www.optimalhealthnetwork.com/What-Is-Candidiasis-Candida-Symptoms-s/202.htm>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

PACHECO, C. S. V. et al. Aproveitamento da semente da jaca para a obtenção de endoglucanase a partir de *Aspergillus Níger* por fermentação em estado sólido. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 1, p. 25-59, 2012.

PACHECO, M. **Tabela de equivalentes, medidas caseiras e composição química dos alimentos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.

PAIVA, F.F. de A.; GARRUTI, D. dos S.; SILVA NETO, R.M. da. **Aproveitamento Industrial do caju**. Fortaleza: Embrapa, CNPAT, SEBRAE, 2000. 88 p. (Embrapa - CNPAT. Documentos, 38).

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation, **Process Biochem**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

PINHEIRO, A. M. et al. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online], v. 26, n. 1, p. 98-103, 2006.

PINHO, L. X. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (Anacardium occidentale L.) para alimentação humana**. 2009. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PONTES, C. R. **Enriquecimento Protéico do Bagaço de Caju através de Fermentação Semi-Sólida Utilizando *Aspergillus Niger***. 2009. Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

POZZO, D. N. O perfil do consumidor de alimentos funcionais: um estudo bibliográfico das tendências mundiais. **Revista Cadeia Produtiva**, v. 1, n. 1, 2012.

QUINTELLA, C. M. et al. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 406, 2011.

REIS, Letícia Caribé Batista et al. Filme biodegradável incorporado com glicerol e aditivos naturais. **Cadernos de Prospecção**, v. 4, n. 4, p. 23-32, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.9771/S.CPROSP.2011.004.003>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, A. M., SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semisólida. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, v. 21, n. 1, p. 57-62, 2001.

SANCHO, Soraya de Oliveira et al. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 878-882, out./dez. 2007.

SANTANA, M. de F. S.; SILVA, I. Cunha. Elaboração de Biscoitos com Resíduo da Extração de Suco de Caju. **Comunicado técnico EMBRAPA**, Belém, v. 214, 2008.

SANTOS, S. F. de M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SILVA, Gabriela Muricy de Souza et al. Enriquecimento proteico do resíduo de abacaxi mediante fermentação semissólida. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.11, n. 5, p. 39-44, 2016.

SILVA, P.S.L. et al. Distribuição do teor de sólidos solúveis totais em frutos de algumas espécies de clima temperado. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 15, n. 1/2, p.19-23, 2002.

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

SOCIEDADE AMERICANA DE MICROBIOLOGIA. Figura: *Rhizopus microsporus*. Disponível em: <<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

SOUSA, B. A. de A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (Ananas comusus L.) e goiaba (Psidium guajava L.)**. 2009. 118 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY; NORTH WEST EUROPEAN MICROBIOLOGICAL GROUP. **Inhibition of and inactivation of vegetative microbes**. London: Academic Press, 1976.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 313-324, 2004.

SUHET, Maria Isabel; FIOREZE, Romeu. Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 5, n. 2, p. 584-592, 2011.

TESFAW, A.; ASSEFA, F. Co-culture: A great promising method im single cell protein production. **Biotechnology and molecular biology reviews**, v. 9, n. 2, p. 12-20, Jun. 2014.

TOUCHSPIN DESIGN. *Rhizopus microsporus*: [figura]. Disponível em: <<http://biology.touchspin.com/images/Rhizopus.B.jpg>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

UCHOA, A. M. A. et al. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

VAN SOEST, P. J; WINE, R. H. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. In: Determination of plant cell wall constituents. **J Assoc Off Anal Chem**,

1967; 50: 50. Disponível em: <[http://catalogo.latu.org.uy/doc\\_num.php?explnum\\_id=1418view=article&id=10757](http://catalogo.latu.org.uy/doc_num.php?explnum_id=1418view=article&id=10757)>. Acesso em: 16 nov. 2016.

ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídios e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC – UPF**, v. 6, n. 2, p.40-47, 2014.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, p. 459, 2010.