



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Meiri Brum Lima

Engenheira de Alimentos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE FONTES NITROGENADAS E DE SAIS
MINERAIS NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE FITASE
POR *ASPERGILLUS***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Prof. Dr. Ranulfo Monte-Alegre
Orientador

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação ou tese defendida por Meiri Brum Lima, aprovada pela comissão julgadora em __/__/__ e orientada pelo Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre.

Assinatura do orientador

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

L628a Lima, Meiri Brum, 1986-
Avaliação do efeito da adição de sais minerais e de fontes nitrogenadas na fermentação em estados sólido para produção de fitase utilizando *Aspergillus* / Meiri Brum Lima. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fermentação. 2. *Aspergillus*. 3. Ácido fítico. 4. Fitase. 5. Fósforo. 6. Farelo de arroz. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the effect of adding mineral and nitrogen sources in solid state fermentation for production of phytase using *Aspergillus*
Palavras-chave em inglês (Keywords):

Fermentation

Aspergillus

Phytic acid

Phytase

Phosphorus

Rice bran

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Andréia Fonseca de Faria

Rodrigo de Oliveira Moraes

Data da defesa: 20/03/2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes

Prof.^a Dr.^a Andreia Fonseca de Farias

Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo

Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte

Aos meus pais Anaide Maria e Sidnei

Minha tia Lacilda e

Meu vô Elimar

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela oportunidade concedida, confiança na minha capacidade, apoio, orientação e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Tratamento de Efluentes e Processos Fermentativos Luana Moraes, Cesar Augusto Aguirre, Oswaldo Kameyama, Sylvia Carolina, Renato Coelho, Maria Domingos, Priscila Nunes e Cláudia Vianna pelo apoio, momentos de descontração e amizade.

Aos meus familiares pelo incentivo nas minhas escolhas profissionais.

Ao meu avô Elimar e minha tia Lacilda pelo amor e força.

As minhas amigas-irmãs Helena Zorzi, Marina Pelissari e Luiza Tavares pelo amor incondicional, desde que eu me conheço por gente.

As amigas Bruna Gonzales, Tatiane Gonzales, Mariana Silveira, Nina Porepp, Nydia Porepp, Pamela Marroni, Aline Rotta Almeida, Eduarda Monteiro e Kellen Zanfonato pelo apoio e amizade apesar da distância.

Ao meu amigo e namorado Felipe Sampaio pelo estímulo, paciência, companheirismo e amor.

Aos amigos especiais, conhecidos em Campinas Thiago Gracias, Renata Vardanega Francisco de Paula, Isabel Debien e Lidia Glanzmann pelos momentos de alegria.

As mineiras Marcela Cravo, Aline Álvares, Janaína Barbosa, Bruna Lage, Helena Carneiro, Mariana Barros e Mariana Machado pela amizade, ajuda nos momentos de tensão e divertimento.

Aos colegas da Casa II Lorena Aires, Susan Duarte e Mariano Michelin por terem sido muito mais que amigos, mas minha família em Campinas.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição valiosa à melhoria do trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Laboratório de Tratamento de Efluentes e Processos Fermentativos pela possibilidade de realização deste trabalho.

A todos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela contribuição na formação pesquisadora e apoio à minha pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo concedida.

A todos aquele que de forma direta ou indireta contribuíram para concretização deste trabalho.

As pessoas sem as quais nada disso seria possível, aos meus realizadores de sonhos, meus pais, Anaide Maria Brum Lima e Sidnei Munhoz Lima.

“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.

Steve Jobs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVO	5
3.1 Objetivos específicos.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1 Enzimas	6
4.2 Fitase	6
4.3 Ácido fítico.....	10
4.4 Fósforo.....	12
4.5 Fermentação em estado sólido (FES)	13
4.6 Características do substrato para FES	15
4.7 Fungos filamentosos	15
4.8 Animais monogástricos	16
4.9 Farelo de arroz.....	17
4.10 Aplicação da fitase	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1 Micro-organismo.....	20
5.2 Meio de manutenção	Erro! Indicador não definido.
5.3 Preparo do inóculo	20
5.4 Substrato para FES.....	20
5.5 Fermentação	20
5.6 metodologias analíticas	24
5.7 Aplicação da fitase em ingredientes para rações animais	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

6.1 Caracterização do Substrato	31
6.2 Caracterização das fontes nitrogenadas	31
6.4 Efeito da adição de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por <i>Aspergillus niger</i>	39
6.5 Efeito da adição de fontes nitrogenadas na fermentação em estado sólido para produção de fitase por <i>Aspergillus oryzae</i> e determinação do melhor tempo de fermentação	41
6.6 Efeito da adição de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por <i>Aspergillus oryzae</i>	48
6.8 Caracterização da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i>	54
6.9 Aplicação da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i> em diferentes ingredientes vegetais utilizados no preparo de rações animais	57
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula de fitase	7
Figura 2: Reação catalisada pela fitase	8
Figura 3: Conformação energética mais favorável do ácido fítico	9
Figura 4: Fermentação em Erlenmeyer.....	21
Figura 5: Extração enzimática - etapa de agitação em <i>skaker</i>	26
Figura 6: Extração enzimática - filtração do substrato suporte fermentado	26
Figura 7: Substrato suporte fermentado.....	28
Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus niger</i>	33
Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 72 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus niger</i>	35
Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus niger</i>	37
Figura 11: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus niger</i> utilizando sais minerais.....	40
Figura 12: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus oryzae</i> utilizando fontes nitrogenadas.	43
Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 72 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus oryzae</i> utilizando fontes nitrogenadas.	45
Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus oryzae</i> utilizando fontes nitrogenadas.	47
Figura 15: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por <i>Aspergillus oryzae</i> utilizando sais minerais.....	50

Figura 16: Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade de fitase de <i>A. niger</i>	52
Figura 17: Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade da fitase de <i>A. niger</i> . 54	
Figura 18: Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade da fitase de <i>A. oryzae</i>	56
Figura 19: Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade da fitase de <i>A. oryzae</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo de fitato em diferentes ingredientes utilizados na fabricação de rações	12
Tabela 2: Composição do farelo de arroz desengordurado.....	18
Tabela 3. Tabela de níveis do Planejamento Experimental inicial para avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas na fermentação.....	22
Tabela 4. Matriz do planejamento experimental inicial	22
Tabela 5. Tabela de níveis do planejamento experimental inicial (Plackett – Burmann)...	23
Tabela 6: Matriz do planejamento experimental inicial (Plackett-Burmann de 8 ensaios). 23	
Tabela 7: Composição do farelo de arroz utilizado como substrato no presente trabalho	31
Tabela 8: Teor de nitrogênio das fontes nitrogenadas utilizadas no presente estudo	31
Tabela 9: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> (extração enzimática após 36 horas de fermentação)	32
Tabela 10: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	33
Tabela 11: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> (extração enzimática após 72 horas de fermentação)	34
Tabela 12: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	35
Tabela 13: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> (extração enzimática após 96 horas de fermentação)	36
Tabela 14: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	37
Tabela 15: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> (extração enzimática após 36 horas de fermentação)	39
Tabela 16: Coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3 e 4 (KCl, $MgSO_4$, $CaCl_2$ e $ZnSO_4$) e suas interações	40
Tabela 17: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i> (extração enzimática após 36 horas de fermentação)	42

Tabela 18: Coeficientes de regressão para as variáveis N ₁ , N ₂ e N ₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	43
Tabela 19: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i> (extração enzimática após 72 horas de fermentação)	44
Tabela 20: Coeficientes de regressão para as variáveis N ₁ , N ₂ e N ₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	45
Tabela 21: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i> (extração enzimática após 96 horas de fermentação)	46
Tabela 22: Coeficientes de regressão para as variáveis N ₁ , N ₂ e N ₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações	47
Tabela 23: Atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus oryzae</i> (extração enzimática após 96 horas de fermentação)	49
Tabela 24: Coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3 e 4 (KCl, MgSO ₄ , CaCl ₂ e ZnSO ₄) e suas interações	50
Tabela 25: Efeito do pH na estabilidade enzimática de fitase produzida por <i>A. niger</i>	51
Tabela 26: Efeito da temperatura na estabilidade enzimática de fitase produzida por <i>A. niger</i>	53
Tabela 27: Efeito do pH na estabilidade enzimática de fitase produzida por <i>A. oryzae</i>	55
Tabela 28: Efeito da temperatura na estabilidade enzimática da fitase produzida por <i>A. oryzae</i>	56
Tabela 29: Teor de fósforo liberado nos ingredientes de origem vegetal após tratamento com fitase produzida a partir de Fermentação em Estado Sólido por <i>Aspergillus oryzae</i> utilizando farelo de arroz.....	58

RESUMO

Processos biotecnológicos para produção de enzimas apresentam acentuado crescimento devido à necessidade de maximização dos processos biológicos industriais e à contribuição para reduzir impactos ambientais. Entretanto, a utilização e purificação das enzimas envolve inúmeras variáveis e custo de produção relativamente alto. A fitase hidrolisa o ácido fítico, ácido orgânico componente natural das sementes e oleaginosas, em inositol e fosfato inorgânico disponibilizando o fósforo antes não disponível e resultando melhor aproveitamento destes alimentos. O uso da fitase como aditivo em rações animais é obrigatório na Europa, Sudoeste Asiático, Coreia do Sul, Japão e Taiwan para reduzir o efeito ambiental provocado pelo excesso de fósforo excretado pelos animais. Nos últimos anos, além da adição em rações animais, a aplicação da fitase na dieta humana surgiu como alternativa potencial, pois estudos demonstram seus benefícios à saúde. O potencial de mercado mundial para fitase é de U\$ 500 milhões, onde a China se destaca como o maior produtor chegando a U\$ 200 milhões de acordo com estudo da Indústria de Rações da China (2008). Entretanto, essa enzima ainda não é produzida no Brasil. Este estudo tem por objetivo estudar o processo fermentativo para produção de fitase determinando parâmetros que auxiliarão na identificação da melhor condição de cultivo para sua produção. Propôs-se ainda a utilização de farelo de arroz como substrato a fim de agregar valor a esse subproduto da indústria de beneficiamento do arroz. Foram realizados ensaios de produção por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* em frascos Erlenmeyer e usando de planejamento experimental para verificar a influência da adição de fontes de nitrogênio e sais minerais na fermentação. Foi feita a caracterização da atividade enzimática em função do pH e da temperatura, bem como a escolha da melhor cepa para produção de fitase.

Palavras-chave: fermentação, *Aspergillus*, ácido fítico, fitase, fósforo e farelo de arroz.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de enzimas é um crescente domínio da biotecnologia, com vendas anuais de aproximadamente 2 bilhões de dólares. Nos últimos 40 a 50 anos o uso de fungos filamentosos para produção industrial de enzimas cresceu rapidamente. Entre esses, os fungos do gênero *Aspergillus* são os mais empregados na produção de enzimas extracelulares.

A fermentação submersa era o método mais comumente utilizado para este fim, entretanto a fermentação em estado sólido vem despertando o interesse, uma vez que este tipo de processo apresenta vantagens sobre a fermentação submersa. Entre as vantagens da fermentação submersa estão a obtenção de produtos concentrados, que necessitam de menor quantidade de solvente para extração, a redução dos problemas de contaminação e o uso de substratos de baixo custo. Esse tipo de fermentação caracteriza-se pelo crescimento microbiano sobre material orgânico sólido que funciona como substrato.

A fitase (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase) hidrolisa o ácido fítico em inositol e fosfato inorgânico reduzindo a afinidade do ácido fítico por certos minerais. Esta enzima está distribuída nos tecidos animais e vegetais, em varias espécies de fungos e em algumas bactérias. Entretanto, a síntese da fitase efetuada pela membrana celular de micro-organismos é a forma mais promissora para sua produção.

A adição de fitase em rações animais tem sido muito utilizada porque dispensa a adição de fontes inorgânicas de fósforo reduzindo os custos de produção. Associada à economia, existe ainda a vantagem ambiental, pois a adição desta enzima altera a absorção de nutrientes pelo organismo, reduzindo a poluição provocada pelo excesso de fósforo no meio ambiente.

A utilização de substratos de baixo custo reduz os custos de produção da fitase e torna o processo ainda mais atrativo à aplicação industrial. O farelo de arroz possui baixo valor comercial devido à toxicidade atribuída e à indisponibilidade de alguns nutrientes, sendo assim um promissor substrato para produção de fitase considerando-se ainda a alta produção nacional desse grão. Além da adição em rações animais, essa enzima pode

ser aplicada na alimentação humana, pois estudos recentes demonstram o efeito positivo do mio-inositol fosfato na dieta.

2. JUSTIFICATIVA

A adição de enzimas, como a fitase, na nutrição animal tem se tornado cada vez mais comum devido às vantagens para o animal e para o meio ambiente. A fitase permite que os nutrientes inorgânicos que os animais tem dificuldade em absorver e gastam energia para eliminar do organismo sejam fornecidos em menor quantidade, auxiliando na digestão. Assim, utilizando-se essa enzima como suplemento em rações animais, é possível diminuir a adição de fontes de fósforo inorgânico, alterando o fluxo biológico e interferindo na absorção de outros componentes, como zinco, cálcio e cobre. Absorvendo mais nutrientes, a excreção destes elementos minerais nas fezes diminui em até 20%. Os animais que não ingerem rações tratadas com fitase para absorção do fósforo excretam este elemento. Se não forem corretamente tratadas, as fezes seguem para os cursos d'água onde a poluição com o fósforo é prejudicial, podendo acarretar na eutrofização (excesso de nutrientes) de rios e lagos, gerando assim o crescimento de algas e causando a mortalidade de peixes.

Além da possibilidade de se adicionar a fitase na produção de rações animais, sabe-se que grande parte dos cereais e leguminosas são ricos em ácido fítico, que devido a sua capacidade de formar complexos com os cátions bivalentes (Ca, Zn, Mg, etc) pode gerar desequilíbrio no balanço mineral. Assim, a fitase seria uma alternativa para aumentar a bio-disponibilidade desses minerais na dieta humana. Estudos recentes demonstram ainda que isômeros do mio-inositol fosfato são benéficos à saúde, atuando na prevenção de diabetes, tendo efeito antiinflamatório, protegendo contra vários tipos de câncer (em especial câncer do cólon), controlando o colesterol e prevenindo da formação de pedras renais.

Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) 2009, a safra de arroz no Brasil nos anos de 2008 e 2009 foi de 12.602,6 mil toneladas. O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz que apresenta baixo valor comercial, sendo muitas vezes descartado. Entretanto, o farelo de arroz apresenta alto teor de ácido fítico (aproximadamente 20%), podendo ser um promissor substrato para a produção de fitase.

Assim, tendo-se em vista as vantagens associadas ao uso da fitase na nutrição animal, na dieta humana e ainda a importante contribuição ambiental, verifica-se a importância de determinar as melhores condições de cultivo para sua produção, avaliando-se a influência da adição de nitrogênio e de sais minerais ao substrato sólido da fermentação, a fim de satisfazer as exigências nutricionais dos micro-organismos e aumentar a produção da enzima. O baixo custo e a disponibilidade das matérias-primas tornam o Brasil um potencial produtor competitivo de fitase no contexto internacional.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo produzir fitase em escala laboratorial por fermentação em estado sólido em frascos Erlenmeyer utilizando farelo de arroz como substrato e *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho das linhagens das duas espécies de *Aspergillus* na produção da fitase;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio (água de maceração de milho, uréia e extrato de levedura) no meio de fermentação;
- Avaliar a influencia da adição de sais minerais (KCl, MgSO₄, CaCl₂.2H₂O, ZnSO₄.7. H₂O) no meio de fermentação;
- Caracterizar a atividade e a estabilidade enzimática em função do pH e da temperatura;
- Aplicar a enzima fitase em diferentes ingredientes utilizados no preparo de rações animais.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Enzimas

Segundo Lenhninger et al. (1993), enzimas atuam como catalisadores biológicos, diminuindo a energia de ativação e acelerando a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo. As enzimas são muito específicas quanto ao tipo de reação catalisada. Entre os fatores que interferem na atividade catalítica das enzimas estão o pH e a temperatura ótimos, condição em que a atividade enzimática será máxima. Com respeito à concentração de substrato, quanto maior a concentração de substrato maior a velocidade da reação, até que a enzima esteja saturada.

De acordo com o tipo de reação que catalisam, as enzimas podem ser classificadas em: óxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (LENHINGER et al., 1993). As aplicações das enzimas estão vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e para uso analítico e científico (SHIMIDELL et al., 2001).

4.2 Fitase

A enzima mio inositol-hexafosfato fosfohidrolase (fitase, mostrada na Figura 1) é uma monoester fosfatase específica que catalisa a reação de hidrólise do ácido fítico em inositol e fosfato inorgânico e pode ser encontrada em cereais, legumes, oleaginosas e tecidos animais. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada e a União Internacional de Bioquímica, a fitase pode ser reconhecida em duas categorias diferentes conforme a posição onde a hidrólise do fitato é iniciada: 3-fitase, que inicia removendo um grupo ortofosfato na posição C3 e a 6-fitase que faz a remoção na posição C6 da molécula de mioinositol hexafosfato (PANDEY et al., 2001).



Figura 1: Molécula de fitase

Fonte: SILVA (2010)

A Figura 2 mostra a reação catalisada pela fitase.

1: *Mio*-inositol hexafosfato + H_2O = D-*mio* - inositol 1,2,3,4,5,6 – pentafofato + ortofosfato

2: *Mio*-inositol hexafosfato + H_2O = D-*mio* - inositol 1,2,3,4,5 – pentafofate

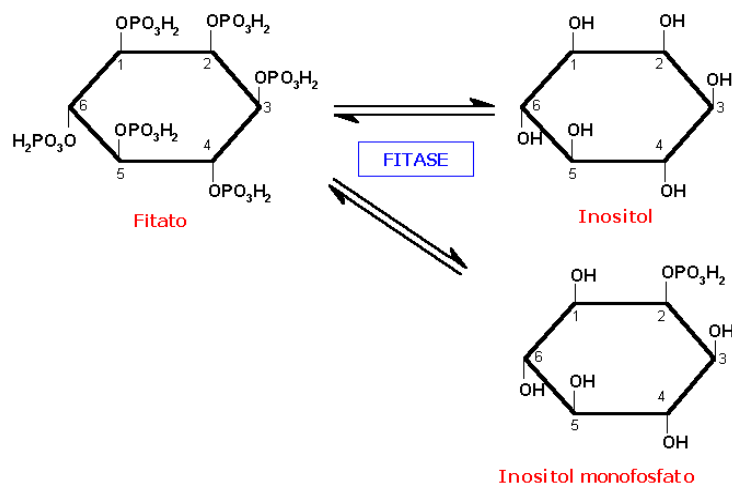


Figura 2: Reação catalisada pela fitase

Fonte: SILVA (2002)

A fitase catalisa a hidrólise de fosfomonoésteres de ácido fítico (mio inositol hexaquisfosfato) retirando o grupo fosfato e formando, sequencialmente, mio-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis-, e mono-fosfatos, assim como fosfato inorgânico (PANDEY et al., 2001).

O fitato possui 6 grupos fosfatos que podem ser liberados, dependendo da fitase utilizada, em velocidades e ordem diferentes. Na conformação energética mais favorável do fitato, cinco dos grupos fosfatos estão em posição equatorial, enquanto o outro está em posição axial. As fitases fúngicas e de *E. coli* conseguem liberar somente cinco dos seis grupos (somente os que estão em posição equatorial), sendo que os produtos finais são fosfato e mio-inositol 2-monofosfato. A Figura 3 mostra a conformação energética mais favorável do ácido fítico (PANDEY et al., 2001).

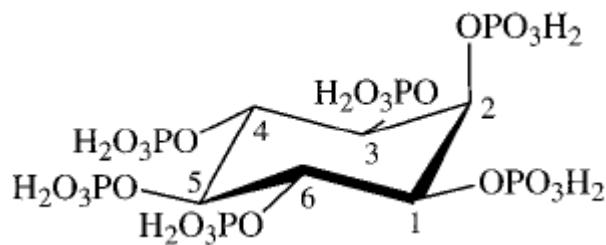


Figura 3: Conformação energética mais favorável do ácido fítico

Mitchell et al (2008) estudaram a retirada dos fosfatos e observaram que a retirada dos grupos fosfato equatoriais ocorre rapidamente, enquanto a hidrólise do grupo axial acontece tão lentamente que a conversão total do fitato a mio-inositol monofosfato estava completa antes do aparecimento do mio-inositol livre. A especificidade da enzima pelos intermediários da reação também muda.

A fitase é uma enzima termoestável, com máxima atividade próximo a 60 °C e pH ótimo entre 5 e 6,5 (mas permanece estável entre 2 e 7) (Silva et al., 2010). Pode ser produzida por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos. A fitase de origem vegetal geralmente se encontra em menores concentrações. Além disso, a fitase obtida a partir de vegetais caracteriza-se por atuar em faixa de pH menor que a da fitase fúngica e ser menos estável que essa (FIREMAN E FIREMAN, 1998).

As fitases contribuem para melhor digestão de alguns componentes de rações em animais monogástricos devido à redução da afinidade do ácido fítico por certos minerais pela hidrólise dos resíduos deste (FENNEMA, 1993). Além disso, a ação da fitase diminui os níveis de fósforo excretados por esses animais, possibilitando a redução da poluição gerada pelo fósforo depositado no solo e nos recursos hídricos subterrâneos (NOUREDDINI E DANG, 2009).

Segundo Nouredini e Dang (2009), a hidrólise do ácido fítico pela ação da fitase produzida por fungos do gênero *Aspergillus* liberou entre 66% e 90% do fósforo presente em grãos de milho. Silva (2010) produziu fitase a partir de fungos de *Aspergillus niger* utilizando diferentes substratos agroindustriais, tais como farelos de trigo e soja, casca de

café, polpa cítrica e resíduos de mandioca e derivados do milho, obtendo valores de atividade catalítica de até 7,75 FIT.

Greiner et al. (2009) purificaram a fitase produzida por *Aspergillus niger* por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia iônica e filtração com gel obtendo 20,3% de enzima recuperada em relação ao extrato enzimático bruto.

Para processar a fitase em escala industrial, é necessário que o micro-organismo a produza extracelularmente (FIREMAN E FIREMAN, 1998). A fitase já foi produzida por bactérias como *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, mas a maior produção de fitase extracelular é por fungos do gênero *Aspergillus* (GARGOVA E SARIYSKA, 2003). A maioria dos micro-organismos produz fitase intracelularmente. A atividade extracelular da fitase foi observada em apenas 30 organismos, sempre em fungos filamentosos. Desses, 28 pertenciam ao gênero *Aspergillus*, 21 ao grupo *Aspergillus niger*.

4.3 Ácido fítico

O ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) (ácido mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfórico) é um ácido orgânico, componente natural das sementes de leguminosas e cereais, que se forma durante a maturação, sendo encontrado nas mais diversas formas isoméricas (PANDEY et al., 2001). A quantidade de ácido fítico presente em alimentos de origem vegetal depende do tipo de planta, parte da planta usada, tipo de adubação e grau de maturidade. Entre 70 e 80% do fósforo mineral presente nas matérias primas de origem vegetal está na forma de ácido fítico (FENNEMA, 1993). Entretanto, o ácido fítico não é degradado pelos animais monogástricos, como porcos, galinhas e peixes (os complexos cátion-ácido fítico, normalmente solúveis em pH ácido, tornam-se insolúveis no pH neutro do intestino delgado dos animais) gerando efeito negativo no balanço mineral e atuando também como inibidor de protease. Devido ainda à capacidade do ácido fítico de formar complexos com cátions bivalentes como o cálcio, cobre, magnésio, ferro, manganês e zinco, ele impede a absorção desses nutrientes no intestino do animal (LEHNINGER et al., 1993).

Métodos químicos e físicos, como extração, precipitação, tostagem e autoclavagem podem ser utilizados para reduzir a porcentagem de ácido fítico presente

em alguns produtos, porém a aplicação destes métodos provoca perda parcial de alguns nutrientes, como as proteínas e os minerais (Silva et al., 2010).

Assim, o uso da enzima fitase exógena pode auxiliar a solucionar o problema associado ao uso de rações fabricadas a partir de cereais usados na dieta de animais monogástricos (Silva et al., 2010). López et al. (1997) recomenda a inclusão da fitase a fim de promover a hidrólise de grande parte do fitato presente na ração.

No Tabela 1, observa-se o conteúdo de ácido fítico (fitato-P em g/100 g) e a ocorrência de ácido fítico sobre o total de fósforo em diferentes ingredientes utilizados para a formulação de rações:

Tabela 1: Conteúdo de fitato em diferentes ingredientes utilizados na fabricação de rações

Ingrediente	Fitato-P (g/100g MS)	Fitato-P (%) (*)
Farelo de Milho	0,24	72
Cevada	0,27	64
Trigo	0,27	69
Aveia	0,29	67
Sorgo	0,24	66
Milheto	0,19	70
Arroz	0,27	77
Arroz polido	0,09	51
Farinha de arroz	10,31	80
Farinha de trigo	0,92	71
Farelo de arroz	20,42	89
Farelo de soja	0,39	60
Farelo de trigo	0,92	71

(*) Teor de ácido fítico sobre o total de fósforo do ingrediente

Fonte: COUSINS (1999)

4.4 Fósforo

A medida da quantidade total de um elemento mineral em um alimento ou dieta é apenas uma indicação de seu valor nutritivo. O maior significado está na disponibilidade desse elemento para o organismo. Fatores químicos, fisiológicos e individuais determinam a utilização global de um determinado elemento ingerido (FENNEMA, 1993).

Os sais minerais tem grande importância para o organismo e são classificados em dois grupos:

a) macromelementos: cálcio, fósforo, sódio, cloro, potássio, magnésio e enxofre;

b) microelementos: ferro, iodo, cobre, flúor, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, selênio, cromo, estanho, níquel, vanádio e silício (ANDRIGUETTO et al., 1982).

O fósforo, particularmente, tem alta demanda pelo organismo, pois é constituinte dos ácidos nucleicos DNA e RNA, participa da transferência e utilização da energia necessária ao metabolismo celular, como componente do ATP, ADP e AMP, compõe membranas na forma de fosfolipídios, participa do metabolismo das proteínas, participa da construção do esqueleto de animais (suporte do crescimento de órgãos e músculos) e nos animais ruminantes exerce papel fundamental no metabolismo de manutenção e crescimento dos micro-organismos ruminais. Após a ingestão do fósforo uma boa parte desse mineral pode permanecer sem ser absorvida, podendo ser eliminada nos excrementos causando poluição do solo e das águas e eutrofização dos mananciais (ANDRIGUETTO et al., 1982).

O fósforo que faz parte da molécula do ácido fítico (hexa fosfato inositol) é chamado fitato ou fósforo fítico (ANDRIGUETTO et al., 1982).

4.5 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A Fermentação em Estado Sólido possui emergente potencial biotecnológico para produção de alimentos, combustíveis, produtos químicos e fármacos. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para FES é uma alternativa econômica e que apresenta a vantagem de agregar valor em resíduos que normalmente são descartados pelas indústrias. Com a evolução da engenharia bioquímica, dos modelos matemáticos e dos biorreatores, é possível o aumento de escala e produção industrial de insumos por FES (PANDEY et al., 2001).

A Fermentação em Estado Sólido ocorre na superfície ou interior de materiais sólidos os quais possuem a capacidade de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis e ser ou não biodegradáveis, sobre os quais os micro-organismos irão crescer. O suporte sólido pode atuar como fonte de nutrientes ou os nutrientes podem ser solúveis em água e os micro-organismos estarem aderidos a uma matriz sólida, que irá absorver o meio de cultura líquido (DEL BIANCHI et al., 2001).

4.5.1 Fatores que interferem na Fermentação em Estado Sólido

- Umidade

Os micro-organismos possíveis de se desenvolverem na Fermentação em Estado Sólido são aqueles capazes de crescer em meios com baixo teor de água. Na FES a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da fase sólida (Silva et al., 2010).

- Temperatura

A temperatura ótima para fermentação depende do tipo de micro-organismo, mas geralmente o intervalo de temperatura permanece entre 25 e 35 °C. Durante o metabolismo dos microrganismos há geração de calor. A cada mol de CO₂ produzido durante a oxidação são liberadas 673 Kcal. Por isso, em alguns processos de FES é necessário remover o calor a fim de controlar a temperatura do processo (Silva et al., 2010).

- Micro-organismo

Nos processos de FES aproximadamente 50% dos micro-organismos utilizados são fungos filamentosos, já que esses micro-organismos crescem ao natural em substratos sólidos e possuem propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas adequadas ao processo (Silva et al., 2010).

- Aeração

A aeração faz-se necessária para manter a aerobiose do processo, facilitar a dessorção de CO₂ e regular a temperatura e a umidade do substrato (Silva et al., 2010).

- pH

O pH da fermentação pode afetar tanto o crescimento do micro-organismo quanto a produção e estabilidade dos metabólitos produzidos (Silva et al., 2010).

4.6 Características do substrato para FES

Para fermentação em estado sólido (FES) o substrato pode estar na forma natural ou ser um meio quimicamente conhecido, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter determinadas matéria – primas ou dos resultados que se deseja produzir. De forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias – primas ou resíduos agroindustriais, devido ao seu baixo ou nenhum valor comercial. É possível incorporar solução nutriente ao substrato sólido para torná-lo melhor às condições nutricionais do micro-organismo para a fermentação desejada. A matriz sólida (substrato) deve ter características que possibilitem o maior rendimento do processo, como elevado grau de acessibilidade do micro-organismo a todo meio e, para tanto, de suas características mais importantes destacam-se a porosidade, o tamanho e o formato das partículas. O tamanho da partícula deve ser pequeno o suficiente para manter boa área superficial e conseqüentemente maior grau de transformação, mas com granulometria própria, que permita a circulação de ar entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos. Quanto à porosidade, a principal qualidade desta característica é a capacidade de absorção de água, que facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os micro-organismos (DEL BIANCHI et al., 2001).

4.7 Fungos filamentosos

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, que não sintetizam clorofila, armazenam glicogênio como material de reserva e não possuem celulose na parede celular. São seres quimiotróficos, obtendo energia a partir de reações químicas, onde os substratos adequados são oxidados (DEL BIANCHI et al., 2001). A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (PELCZAR et al., 1996). São constituídos por elementos multicelulares em forma de tubo denominados hifas, e ainda formam esporos. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. Nos fungos, os esporos são a forma mais freqüente de reprodução, podendo ser de origem tanto sexuada quanto assexuada (DEL BIANCHI et al., 2001).

Os fungos filamentosos são constituídos, fundamentalmente, por elementos multicelulares na forma de tubo – as hifas que podem ser contínuas, não septadas ou cenocíticas e septadas, e ainda podem conter esporos (LIMA et al., 1987).

Cerca de 50% dos micro-organismos utilizados nos processos de FES são fungos filamentosos, pois esses micro-organismos tem facilidade de crescer ao natural em substrato sólido e absorvem os nutrientes dissolvidos no meio (PELCZAR et al., 1996).

4.7.1 *Aspergillus*

Mais de 200 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* podem ser encontradas na natureza. São fungos aeróbicos, amplamente utilizados na produção de alimentos e produtos como ácidos glucônico, cítrico e gálico.

Aspergillus niger é uma das espécies mais comuns do gênero *Aspergillus*. Tem a capacidade de produzir até 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução ou do substrato. Segundo GARGOVA E SARIYSKA (2003) e DVORAKOVÁ et al. (1997) os fungos desse gênero apresentam elevado potencial para produção de fitase extracelular.

Aspergillus oryzae é um fungo filamentoso utilizado na culinária e na produção de bebidas alcoólicas.

4.8 Animais monogástricos

O uso de dietas vegetais na alimentação de monogástricos aumentou significativamente com a incidência de BSE (encefalopatia espongiforme bovina), também conhecida como doença da vaca louca, quando Brasil e países da Comunidade Européia restringiram a utilização de produtos de origem animal, como farinhas de carne e ossos, na alimentação de ruminantes e monogástricos (SÁ, 2005).

As rações padrão para monogástricos tem como ingredientes principais o milho e o farelo de soja, ingredientes que mais contribuem na composição dos custos das rações. Assim, tem-se utilizado enzimas adicionadas às rações a fim de permitir melhor aproveitamento dos nutrientes presentes nos ingredientes. No entanto, o uso de enzimas exógenas na formulação de dietas requer cuidados para a garantia da eficiência e da ação desejadas, como, por exemplo, a tolerância ao calor. A termoestabilidade da enzima indica se o produto deve ser adicionado após a peletização por meio de pulverização, ou se por aplicação direta na ração (REMUS, 2008)

Um processo alternativo à adição de fitases em dietas vegetais com ingredientes ricos em fitato é o tratamento do cereal antes da inclusão na ração nas condições ótimas da enzima (RIES E MACEDO, 2010).

A razão pela qual os animais monogástricos não podem utilizar o fósforo proveniente do ácido fítico presente na ração é porque não possuem, ou possuem nível muito baixo de atividade da fitase em seu trato intestinal. Assim, esses animais necessitam de adição suplementar de fósforo inorgânico na sua dieta (GARGOVA E SARIYSKA, 2003).

No sistema gastrointestinal dos animais monogástricos, o ácido fítico se liga com minerais, proteínas e enzimas, como a amilase, formando o fitato. O fitato impede que componentes importantes para o desenvolvimento dos animais se unam ao bolo alimentar, sendo então eliminados pelas fezes. Além de reduzir a disponibilidade de fósforo, o fitato aumenta a secreção de muco no intestino destes animais, interferindo nos sistemas de absorção de nutrientes. Dessa forma, a fitase age de forma a impedir que o fósforo seja eliminado nas fezes sem ser aproveitado pelo organismo. Simultaneamente, a interação do ácido fítico com minerais essenciais na dieta (Fe, Zn, Ca, etc.), proteínas e vitaminas limita a disponibilidade desses nutrientes, formando um fator anti-nutricional (GARGOVA E SARIYSKA, 2003).

4.9 Farelo de arroz

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de arroz, ocupando a sexta posição no mercado mundial, com 11,4 milhões de toneladas beneficiadas do grão (base casca) na safra 2009/2010 e estimativa de 12,35 milhões de toneladas beneficiadas na safra 2010/2011 (http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/rice.html).

O farelo, um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, representa de 8 a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento (PARRADO et al., 2006). As características físico-químicas do farelo de arroz dependem de fatores como: cultivar, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado e grau de polimento ao qual o grão foi submetido (BERMUDES, 1994).

A Tabela 2 apresenta a composição do farelo de arroz desengordurado.

Tabela 2: Composição do farelo de arroz desengordurado.

(%)	Farelo de arroz desengordurado
Umidade	9,2
Proteínas	19,2
Lipídios	5,7
Carboidratos	47,1
Fibras	11,7
Cinzas	7,1

Fonte: SILVEIRA E FURLONG (2007)

O farelo de arroz é frequentemente utilizado como substrato para Fermentação em Estado Sólido visando a produção de insumos para indústria de alimentos devido à sua abundância (BERMUDES, 1994).

4.10 Aplicação da fitase

Desde 1968, quando foi descoberta a disponibilidade do fósforo presente no ácido fítico, a fitase vem sendo pesquisada. A fitase foi a primeira enzima a ser adicionada em rações a base de soja (PANDEY et al., 2001).

A fitase microbiana tornou-se disponível comercialmente em 1991, quando a legislação obrigou seu uso nos Países Baixos para controlar a poluição por fosfatos em unidades de criação de suínos e aves, amplificando seu desenvolvimento e aceitação. O que antes era mais restrito aos países que adotavam essa legislação, tornou-se globalmente utilizado com o reconhecimento do perigo ecológico da eutrofização. A proliferação de fitases no mercado gerou redução de custos e a proibição da adição de farelos de carne e ossos de animais na criação de monogástricos gerou aumento na demanda de fósforo de 26 mil toneladas. Entretanto, o elevado custo do processo continua sendo obstáculo para a produção dessa enzima (PANDEY et al., 2001). Van

Beilen e Li (2002) estimaram que no fim do século XX 65% da dieta de aves e 20% da dieta de suínos seriam de rações adicionadas de fitase.

Atualmente, no Brasil, existem algumas indústrias de ração animal, como o Grupo Guabi, que importam a fitase para adicioná-la em seus produtos a fim de disponibilizar o fósforo na dieta dispensando a adição de uma fonte de fósforo (a mais utilizada pelos produtores é o fosfato bicálcio). Entretanto, embora o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de grãos e de resíduos agroindustriais que poderiam ser utilizados como matérias primas para produção de fitase, o país ainda não produz essa enzima.

Outra aplicação seria em cereais e oleaginosas, a fim de se aumentar a disponibilidade de minerais, reduzindo o efeito anti-nutricional do ácido fítico e aproveitando o potencial descrito em artigos para saúde humana a partir do consumo dos produtos da hidrólise do ácido fítico. O mio-inositol fosfato pode diminuir a incidência de doenças cardíacas e diabetes, inibir a produção de radicais livres e atuar como antioxidante e reduzir o nível de colesterol, além de prevenir diversos tipos de câncer (GREINER et al., 2009). Ésteres trifosfatados de inositol tem demonstrado também ação inibitória significativa contra infecções retrovirais como HIV (KEROVUO J., 2000).

Em 2008, uma empresa de agrobiotecnologia da China anunciou a produção de milho transgênico adicionado com fitase para ser vendido comercialmente no mercado doméstico. Neste país o mercado da fitase é de aproximadamente U\$ 200 milhões e seu emprego em rações animais já é obrigatório devido aos benefícios ambientais associados (<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=26707>).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos Fermentativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

5.1 Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados foram o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus oryzae*. As culturas foram cedidas pela NRLL – US Department of Agriculture. As culturas foram mantidas em 8 ml de meio PDA inclinado (ágar batata dextrose) em tubos de ensaio previamente esterilizados na temperatura de 121 °C por 15 minutos.

5.2 Preparo do inóculo

Os esporos das culturas em manutenção foram incubados por 30 °C por 10 dias em Erlenmeyers inclinados contendo PDA estéril. A coleta dos esporos foi feita através da adição de solução Tween 80 (0,1%) e raspagem dos esporos da superfície do meio.

A contagem de esporos da suspensão foi feita e padronizada por contagem direta em câmara de Neubauer. A suspensão, padronizada a 10^7 esporos/mL, foi adicionada ao meio de cultura no valor de 5 % (v/m) do volume total.

5.3 Substrato para FES

O substrato utilizado para fermentação foi o farelo de arroz. A umidade inicial do farelo de arroz foi previamente determinada e então corrigida para 75%. O substrato passou por processo de esterilização a 121 °C por 15 minutos e 1 atm.

5.4 Fermentação

O método de fermentação empregado foi FES (Fermentação em Estado Sólido) utilizando como biorreator frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato com as características previamente descritas, como pode ser visto na Figura 4. As cepas de *Aspergillus niger* foram inoculadas na razão de 10^7 esporos por grama de substrato. A temperatura adotada para fermentação foi 30 °C. O tempo de fermentação foi definido posteriormente para cada um dos microrganismos utilizados.



Figura 4: Fermentação em Erlenmeyer

5.4.1 Avaliação da influência da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio

Para produção de fitase foram avaliadas três fontes de nitrogênio (N_1 : extrato de levedura, N_2 : água de maceração de milho e N_3 : uréia) utilizando planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central a fim de estudar o efeito das variáveis na produção de fitase. O 12º ensaio foi feito utilizando-se água estéril (sem adição das fontes de nitrogênio) na fermentação.

A Tabela 3 apresenta as diferentes concentrações das fontes de nitrogênio. Para extrato de levedura (N_1) e uréia (N_3) foram preparadas soluções nas concentrações de 2, 3 e 4 g/g de substrato. Água de maceração de milho (N_2) foi adicionada aos meios fermentativos nas concentrações de 2, 3 e 4 mL/g de substrato. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento experimental com os níveis das três fontes nitrogenadas que foram adicionados em cada ensaio. Foram adicionados 2 mL de cada uma das fontes de nitrogênio, a fim de se manter a umidade do meio fermentativo em 75% (5% provenientes do inóculo, 10% do farelo de arroz/ substrato e 60% das soluções contendo as fontes de nitrogênio).

Tabela 3. Tabela de níveis do Planejamento Experimental inicial para avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas na fermentação

VARIÁVEIS	-1	0	+1
Extrato de Levedura (g.g^{-1})	2	3	4
Água de Maceração (mL.g^{-1})	2	3	4
Uréia (g.g^{-1})	2	3	4

Tabela 4. Matriz do planejamento experimental inicial

Matriz	Extrato de Levedura (N_1)	Água de Maceração (N_2)	Uréia (N_3)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

5.4.2 Avaliação da influência da adição de sais minerais

Foram feitos ensaios para otimização do processo envolvendo 4 variáveis: KCl, MgSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sais inorgânicos) sendo testadas em diferentes níveis através de planejamento experimental Plackett-Burmann de 8 ensaios mais 3

pontos centrais, para selecionar as variáveis significativas na produção de fitase. Os planejamentos seguintes foram definidos de acordo com os resultados obtidos.

A Tabela 5 apresenta as diferentes concentrações dos sais minerais. Para os sais minerais KCl, MgSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram preparadas soluções nas concentrações 2, 2,5 e 3 mM. A Tabela 6 apresenta a matriz do Planejamento Experimental com os níveis dos cinco sais que foram adicionados em cada ensaio. Foram adicionados 2 mL de cada uma das soluções de sais minerais, a fim de se manter a umidade do meio fermentativo em 75% (5% provenientes do inóculo, 10% do farelo de arroz e 60% das soluções contendo os sais minerais).

Tabela 5. Tabela de níveis do planejamento experimental inicial (Plackett – Burmann)

COMPONENTE	-1	0	1
KCl (mM)	2	2,5	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mM)	2	2,5	3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM)	2	2,5	3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mM)	2	2,5	3

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental inicial (Plackett-Burmann de 8 ensaios)

ENSAIO	KCl	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1	1	-1	-1	1
2	1	1	-1	-1
3	1	1	1	-1
4	-1	1	1	1
5	1	-1	1	1
6	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	-1
8	-1	-1	-1	-1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

5.5 Metodologias analíticas

5.5.1 Análises físico-químicas do substrato

As análises físico-químicas do substrato, relacionadas abaixo, foram feitas de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1995). Todas as análises foram feitas em triplicata e expressas em porcentagem.

5.5.1.1 Determinação da umidade

Foi feita por método termogravimétrico. Primeiramente, as amostras foram pesadas em placas de Petri previamente secas por 2 h em estufa a 105 °C até peso constante e mantidas secas em dessecador. As amostras foram levadas à estufa por 2h a 105 °C ou até peso constante.

5.5.1.2 Determinação do teor de proteínas -Kjeldahl

O teor de proteínas foi determinado pela metodologia de Kjeldahl. Foi pesado 0,2 g de farelo de arroz (amostra) em papel filtro livre de nitrogênio e adicionou-se 2 g de mistura catalítica (Na_2SO_4 e $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) no tubo digestor. Foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico no tubo seguido de agitação. O tubo foi levado à digestão em bloco digestor a 450 °C até o conteúdo do tubo ficar límpido e transparente. Esfriou-se o tubo. A etapa seguinte consistiu na destilação da amônia. Foram colocados 15 mL de água no tubo até dissolver a amostra e esfriou-se o tubo em banho de gelo ou água corrente. O tubo com a amostra digerida foi então levado ao destilador e colocou-se 20 mL de NaOH. O vapor foi borbulhado em 10 mL de ácido bórico 3% em Erlenmeyer com 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila 0,2% e azul de metileno 0,2%). A destilação ocorreu até o aparecimento da cor verde ou até que o volume coletado fosse de 50 mL para garantir o término da evaporação e a condensação de toda amônia presente na amostra. A etapa final consistiu na titulação do borato de amônio com HCl 0,1N. O fator de correção usado foi 6,25.

5.5.1.3 Determinação do teor de lipídeos –Bligh Dyer

Foram pesados 10 g de farelo de arroz (amostra), em Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 50 mL de metanol, 25 mL de clorofórmio e 10 mL de água sobre a amostra. Homogeneizou-se e adicionou-se mais 1 mL de água, seguido de agitação por

mais 1 minuto. A mistura foi filtrada a vácuo e o resíduo foi re-homogeneizado com 10 mL de clorofórmio. O filtrado foi então agitado por mais 20 minutos e adicionaram-se mais 25 mL de clorofórmio e 25 mL de solução sulfato de sódio 1%. Agitou-se a mistura por mais 2 minutos. Transferiu-se a solução com a amostra para um funil de separação e adicionaram-se uma parte de água e outra parte de clorofórmio, formando 2 fases, uma de clorofórmio rica em lipídeos (inferior) e outra de água, contendo os outros componentes da amostra. Após a separação das camadas, a porção lipídica foi colocada em balão de fundo chato previamente seco em estufa a 105 °C com um filtro de Na₂SO₄ para reter a água que poderia ter vindo junto na separação. O solvente foi evaporado com auxílio de rotaevaporador e o balão foi levado a estufa a 100 °C para eliminar qualquer traço de solvente. O balão foi resfriado em dessecador e posteriormente pesado. O teor de lipídios foi então calculado pela diferença de massa.

5.5.2 Caracterização das fontes nitrogenadas

O teor de nitrogênio presente nas fontes de nitrogênio adicionadas aos meios fermentativos foi determinado conforme o item 5.5.1.2.

5.5.3 Extração da enzima (fitase)

Foram adicionados 50 mL de água deionizada a cada frasco contendo o substrato-suporte fermentado. Os frascos foram agitados em *shaker* a 150 rpm e 30 °C por um período de 30 minutos. O conteúdo de cada frasco foi filtrado para obtenção do extrato aquoso da enzima. O extrato foi centrifugado a 2335 g por 8 minutos e o sobrenadante recolhido para posterior dosagem enzimática. A Figura 5 apresenta a etapa de agitação dos frascos contendo o substrato suporte fermentado e a Figura 6 apresenta a filtração do extrato enzimático.



Figura 5: Extração enzimática - etapa de agitação em *shaker*



Figura 6: Extração enzimática - filtração do substrato suporte fermentado

5.5.4 Determinação da atividade enzimática (FIT)

A atividade da fitase (FIT) foi determinada pela mensuração da quantidade de fosfato inorgânico liberado, sendo definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de fosfato inorgânico a partir de um mililitro de solução de fitato de sódio 1,5 mM, por minuto e por mL de extrato enzimático cru, nas condições de temperatura e pH dados. Em tubo de ensaio de 20 mL foi adicionado 1 mL de fitato de sódio (1,5 mM) preparado em tampão acetato 0,2 M (pH 4,8) e 0,5 mL de extrato cru de enzima na diluição 1:1 em água deionizada, seguido da incubação em banho-maria a 60 °C por 10 minutos. A enzima foi inativada levando-se as amostras em banho-maria a 100°C por 5 minutos.

5.5.5 Determinação de fosfato total

Para determinar o fosfato liberado foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 1,5 mL de água destilada em cada tubo de ensaio contendo as amostras. Foram então acrescentados 5 mL de reativo Taussky-Schoor, preparado segundo a metodologia de Harland e Harland (1980) e quantificada a densidade óptica a 660 nm em espectrofotômetro, determinando então a concentração de fósforo através de curva padrão.

5.5.6 Curva padrão de fosfato

A curva padrão foi feita pesando-se 0,7165g de fosfato de potássio (KH_2PO_4), previamente seco em estufa a 105 °C durante 2 h e diluindo-se o fosfato em 100 mL de água destilada. Essa solução contém 0,5 mg de PO_4 por mL e foi chamada de Solução I. Tomou-se 20 mL da Solução I e diluíram-se a 1000 mL de água destilada, sendo essa a Solução II, contendo 0,01 mg de PO_4 por mL. Foram tomados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mL da Solução II e levados a balões volumétricos de 100 mL com água destilada. Foram medidos 3 mL de amostra após agitação e transferiu-se para Erlenmeyers de 125 mL com 2 mL de ácido sulfúrico 0,1 N. Os Erlenmeyers com as amostras foram levados para chapa de aquecimento (ou banho-maria em ebulição) por 90 minutos, mantendo-se o volume constante em 50 mL. Depois de frias, as amostras foram recolhidas em balões volumétricos de 100 mL e foram adicionadas 3 gotas de indicador fenolftaleína e NaOH até ligeira coloração rósea e completou-se o volume do balão com 100 mL com água destilada. Homogeneizou-se. Transferiram-se 50 mL e adicionou-se 0,5 mL de solução de molibdato de amônio, seguido de agitação. Foi adicionado 0,5 mL de ácido amino naftol sulfônico e tornou-se a agitar. Após 5 minutos as densidades ópticas das amostras foram determinadas utilizando-se espectrofotômetro a 690 nm.

5.5.7 Avaliação do efeito da adição de fontes de nitrogênio e de sais na produção de fitase

Para avaliar o efeito da adição das diferentes fontes de nitrogênio nas diferentes concentrações e a influência dos sais minerais na atividade da fitase, os extratos crus da enzima foram diluídos 1:10 (v/v) e foi determinada a atividade enzimática (conforme o item 5.5.4). A Figura 7 apresenta o substrato suporte fermentado.



Figura 7: Substrato suporte fermentado

5.6 Caracterização da fitase

A fitase produzida foi caracterizada quanto a sua estabilidade em diferentes valores de pH e de temperatura de pré-incubação.

5.6.1 Estabilidade enzimática no pH

O extrato enzimático foi obtido a partir de fermentações realizadas conforme o item 5.4 e foi, posteriormente, pré-incubado durante 120 minutos em diferentes tampões de pH (os valores de pH estudados foram: 1.6, 2, 2.6, 3, 4, 4.6, 5, 6, 7 e 8) Foram retiradas alíquotas a cada 30 minutos para determinação da atividade enzimática conforme o item 5.5.3.

5.6.2 Estabilidade enzimática na temperatura

O extrato enzimático foi obtido a partir de fermentações realizadas conforme o item 5.4 e foi, posteriormente, pré-incubado durante 120 minutos em banho-maria em diferentes temperaturas (as temperaturas estudadas foram 50, 60, 70, 80 e 90 °C). Foram retiradas alíquotas a cada 30 minutos para determinação da atividade enzimática conforme o item 5.5.3.

5.7 Aplicação da fitase em ingredientes para rações animais

A fim de se avaliar o aumento da disponibilidade de fósforo nos cereais utilizados para fabricação de rações após o tratamento com fitases, o extrato enzimático bruto obtido a partir das fermentações foi aplicado em farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de milho.

5.7.1 Produção do inóculo e fermentação para produção do extrato enzimático

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o item 5.3.

5.7.2 Produção do extrato enzimático

Para produção do extrato enzimático bruto que foi aplicado nos ingredientes das rações foram realizadas fermentações utilizando *Aspergillus oryzae*. As fermentações foram conduzidas a 30 °C, durante 96 horas com umidade inicial de 75%. O substrato utilizado na fermentação foi o farelo de arroz.

5.7.3 Extração do extrato enzimático bruto

A cada frasco contendo o substrato fermentado foram adicionados 50 ml de solução tampão pH 6 (pH ótimo) e os frascos foram agitados em *shaker* durante 30 minutos. O conteúdo de cada frasco foi então filtrado e as amostras foram levadas a centrifugação por 10 minutos a 2335 g, obtendo-se assim o extrato enzimático bruto.

5.7.4 Tratamento do ingrediente vegetal

O ingrediente foi incubado com extrato enzimático na proporção 1:5 (p/v), pH 6 (ótimo), com agitação a fim de facilitar a ação da enzima. A agitação foi feita em *shaker* a 150 rpm a 40 °C durante 30 minutos.

5.7.5 Análise do teor de fósforo

A ação enzimática foi determinada mensurando-se o teor de fósforo liberado nos ingredientes das rações após o tratamento com a fitase obtida. O teor de fósforo foi medido utilizando-se a metodologia de Taussky-Shoor proposta por Harland e Harland (1980), descrita no item 5.5.5.

A atividade enzimática (FIT₂) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de fósforo por ml de extrato enzimático por minuto por grama do ingrediente vegetal.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se às fermentações utilizando *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

6.1 Caracterização do Substrato

A tabela 7 mostra os resultados da determinação da umidade, do teor de proteínas e do teor de lipídeos do farelo de arroz.

Tabela 7: Composição do farelo de arroz utilizado como substrato no presente trabalho

Amostra	Umidade (%) *	Proteína (%)*	Lipídeos (%)*
Farelo de arroz	10,96 ± 0,22	17,16 ± 1,82	4,67 ± 0,28

* médias de triplicatas

6.2 Caracterização das fontes nitrogenadas

A Tabela 8 apresenta os resultados do teor de nitrogênio das fontes nitrogenadas adicionadas às fermentações: extrato de levedura (N₁), água de maceração de milho (N₂) e uréia (N₃).

Tabela 8: Teor de nitrogênio das fontes nitrogenadas utilizadas no presente estudo

Extrato de levedura	Água de maceração de milho	Uréia
12,5	42	46

6.3 Efeito da adição de fontes nitrogenadas na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus niger* e determinação do melhor tempo de fermentação

As Tabelas 9, 11 e 13 apresentam os valores de atividade fitásica (fosfato liberado) obtidos a partir do Planejamento Fatorial 2³ completo com triplicata do ponto central nos diferentes tempos de fermentação (36, 72 e 96 horas). As fermentações foram

realizadas em meios suplementados de fontes nitrogenadas, conforme o item 5.4.1 de Material e Métodos.

Tabela 9: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* (extração enzimática após 36 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	36,24
2	4	2	2	26,50
3	2	4	4	47,51
4	4	4	2	29,68
5	2	2	4	32,52
6	4	2	4	29,57
7	2	4	4	28,80
8	4	4	4	21,91
9	3	3	3	22,57
10	3	3	3	26,18
11	3	3	3	27,82
12	0	0	0	34,71

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software “Statistica” 7.0.

A Tabela 10 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N₁, N₂ e N₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações e a Figura 8 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 36 horas de fermentação.

Tabela 10: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.-85%	Lim. conf.+85%
Média	29,93	1,48	20,17	0,00	27,29	32,57
N_1	-9,35	3,48	-2,68	0,05	-15,54	-3,16
N_3	-6,78	3,48	-1,94	0,12	-12,97	-0,59
2X3	-6,45	3,48	-1,85	0,13	-12,64	-0,26

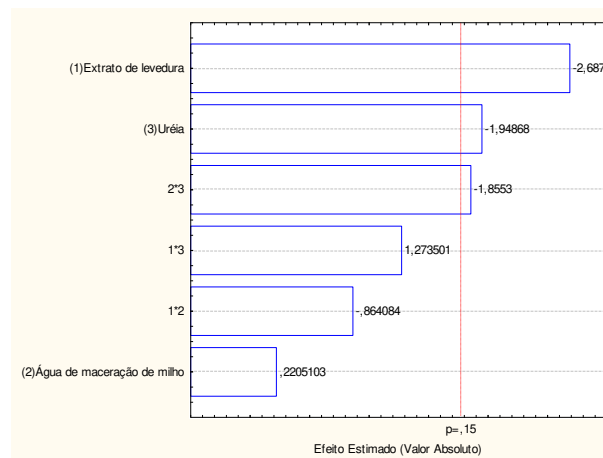


Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus niger*.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que a variável N_2 (água de maceração de milho) não foi significativa dentro do limite de confiança de 85%. A interação entre as variáveis N_1 e N_2 e N_1 e N_3 também não apresentou efeito significativo. Melhores atividades fitásicas são obtidas quando se utiliza os menores níveis das variáveis N_1 e N_3 ou a interação entre as variáveis N_2 e N_3 . Como o efeito da interação foi negativo, sugere-se utilizar N_2 e N_3 em níveis opostos. Logo, deve-se utilizar N_2 no maior nível e N_3 no menor nível.

O modelo empírico deste planejamento é:

$$FIT = 29,93 - 9,35(N_1) - 6,78(N_3) - 6,45(N_2 \cdot N_3)$$

Substituindo-se $N_1 = -1$, $N_2 = 1$ e $N_3 = -1$ obtêm-se a máxima resposta esperada, dentro do campo estudado. Assim, utilizando-se N_1 e N_3 nos menores níveis e N_2 no maior nível, é possível alcançar atividade enzimática de 52,51 FIT.

Tabela 11: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* (extração enzimática após 72 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	5,19
2	4	2	2	1,88
3	2	4	2	2,76
4	4	4	2	2,19
5	2	2	4	1,80
6	4	2	4	1,69
7	2	4	4	1,42
8	4	4	4	1,38
9	3	3	3	1,62
10	3	3	3	4,36
11	3	3	3	4,62
12	0	0	0	4,05

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software “Statistica” 7.0.

A Tabela 12 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações e a Figura 9 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 72 horas de fermentação.

Tabela 12: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.-85%	Lim. conf.+85%
Média	2,62	0,47	5,57	0,00	1,78	3,46

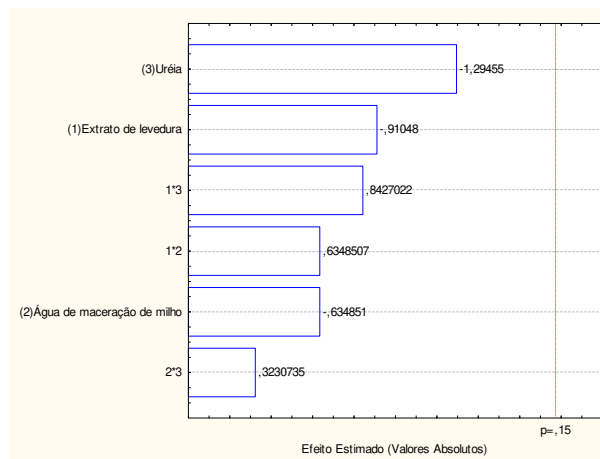


Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 72 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus niger*.

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que nenhuma das variáveis estudadas, ou a interação entre elas, apresentou efeito significativo dentro do limite de confiança de 85% na atividade da fitase produzida em 72 h por *A. niger*. Assim, o modelo empírico que apresenta a máxima resposta esperada é:

$$\text{FIT} = 2,62$$

Tabela 13: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* (extração enzimática após 96 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	1,21
2	4	2	2	0,96
3	2	4	2	1,99
4	4	4	2	0,79
5	2	2	4	2,19
6	4	2	4	2,71
7	2	4	4	2,74
8	4	4	4	1,27
9	3	3	3	2,54
10	3	3	3	2,08
11	3	3	3	3,02
12	0	0	0	2,01

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software “Statistica” 7.0.

A Tabela 14 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N₁, N₂ e N₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações e a Figura 10 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 96 horas de fermentação.

Tabela 14: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.-85%	Lim. conf.+85%
Média	1,95	0,21	9,11	0,00	1,57	2,33
N_3	0,99	0,50	1,96	0,12	-0,09	1,88

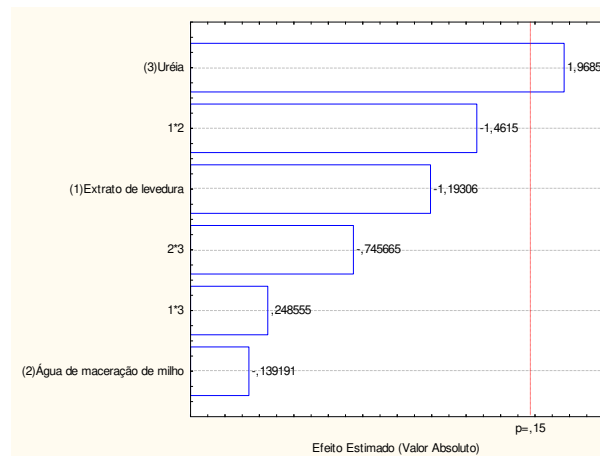


Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus niger*.

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram que N_3 foi a única variável que apresentou efeito significativo na atividade da fitase produzida em 96 horas de fermentação, dentro do limite de confiança de 85%. Melhores respostas na atividade da enzima são esperadas quando N_3 é utilizada no maior nível. Assim, o modelo empírico para este planejamento é:

$$FIT = 1,95 + 0,99(N_3)$$

A partir do modelo, conclui-se que é possível produzir fitase com atividade de até 2,94 FIT utilizando N_3 (uréia) no maior nível empregado.

Se os valores da razão “p” forem menores que o nível de significância escolhido, no caso 15% ou 0,15 há diferença significativa em relação ao fator estudado, e quanto menor o valor de p, maior a influência desse fator com relação aos demais. Assim,

observou-se que em 36 h de fermentação o extrato de levedura e a uréia apresentaram efeito significativo, assim como a interação entre as variáveis água de maceração de milho e uréia, ao nível de 85% de confiança (Figura 8). A melhor atividade da fitase é obtida quando são adicionados na fermentação extrato de levedura ou uréia na menor concentração (2 g.g^{-1}) ou água de maceração de milho na máxima concentração (4 mL.g^{-1}), juntamente com uréia na menor (2 g.g^{-1}). Nessas condições, a atividade fitásica é de 52,5 FIT.

Em 72 h de fermentação, nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo (Figura 9), no limite de 85% de confiança, na atividade da fitase produzida. A máxima atividade enzimática nesse tempo foi de 2,72 FIT. Em 96 h de fermentação apenas a adição de uréia apresentou efeito significativo (Figura 10). Quando uréia é adicionada no máximo nível (4 g.g^{-1}) a melhor resposta para atividade fitásica produzida é 2,94 FIT.

Assim, comparando-se a atividade da enzima produzida nos diferentes tempos de fermentação, observa-se que o melhor resultado (52,5 FIT) foi obtido em 36 h, tendo a atividade da enzima diminuído nos tempos de 72 e 96 h. Considerando-se ainda que o tempo é um dos fatores econômicos a serem levados em consideração na produção industrial da enzima, adotou-se 96 h como o tempo de fermentação para produção de fitase por *Aspergillus niger* nos ensaios seguintes.

SOCCOL et al (2002) produziram fitase por Fermentação em Estado Sólido utilizando também *Aspergillus niger* e obtiveram uma atividade enzimática de 70 FIT em 48 horas. SILVA et al (2010) em processo de fermentação em estado sólido semelhante, utilizando *Aspergillus japonicus* e bagaço de mandioca como substrato, durante 96 horas produziu fitase com atividade enzimática máxima de 26,41 FIT. PESSOA et al. (2010) produziram fitase com atividade máxima de 26 FIT a partir de processo de fermentação em estado sólido semelhante ao feito neste trabalho, utilizando como substrato diferentes tipos de sementes.

A partir dos resultados encontrados, observa-se que a concentração de fósforo liberado pela fitase produzida nesse trabalho foi alta, pois os processos fermentativos descritos na literatura tiveram maior duração.

6.4 Efeito da adição de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus niger*

A Tabela 15 apresenta os valores da atividade fitásica (fosfato liberado) após 36 horas de fermentação obtidos a partir do planejamento experimental Plackett Burman de 8 ensaios com triplicata do ponto central, cujos meios foram suplementados com adição de sais, conforme item 5.4.2 de materiais e métodos.

Tabela 15: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* (extração enzimática após 36 horas de fermentação)

Ensaio	KCl (mM)	MgSO ₄ .7H ₂ O (mM)	CaCl ₂ .2H ₂ O (mM)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (mM)	Atividade da fitase (FIT)
1	3	2	2	3	19,94
2	3	3	2	2	19,94
3	3	3	3	2	18,74
4	2	3	3	3	22,02
5	3	2	3	3	22,68
6	2	3	2	3	21,58
7	2	2	3	2	22,13
8	2	2	2	2	27,38
9	2,5	2,5	2,5	2,5	15,45
10	2,5	2,5	2,5	2,5	17,86
11	2,5	2,5	2,5	2,5	17,86

As análises dos efeitos foram feitas utilizando o programa “Statistica” versão 7.0.

A Tabela 16 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3, 4 (KCl, MgSO₄, CaCl₂ e ZnSO₄) e suas interações e a Figura 11 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 36 horas de fermentação.

Tabela 16: Coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3 e 4 (KCl, MgSO₄, CaCl₂ e ZnSO₄) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.-85%	Lim. conf.+85%
Média	20,50	1,02	19,91	0,00	18,80	22,20

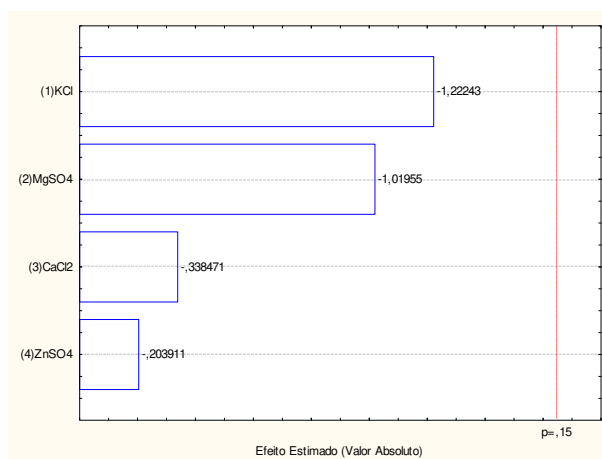


Figura 11: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus niger* utilizando sais minerais.

Para avaliação da adição de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase não houve efeito significativo de nenhuma das variáveis estudadas, ou mesmo da interação entre elas, dentro do limite de confiança de 85%. O modelo empírico do planejamento experimental é:

$$\text{FIT} = 20,50$$

Se os valores da razão “p” forem menores que o nível de significância escolhido, no caso 15% ou 0,15 há diferença significativa em relação ao fator estudado, e quanto menor o valor de p, maior a influência desse fator com relação aos demais. Assim, observou-se que em 36 h de fermentação nenhum dos 4 sais adicionados ao processo fermentativo apresentou efeito significativo, ou mesmo a interação entre estes, ao nível de 85% de confiança (Figura 11).

Na literatura foram encontradas poucas referências de avaliação da suplementação de sais minerais na fermentação para produção de fitase.

RIES e MACEDO (2010) avaliaram o efeito da adição de sais minerais na atividade fitásica da enzima produzida por fermentação em estado sólido por *Saccharomyces cerevisiae* e observaram que a adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} também não apresentou efeito significativo na atividade da enzima.

6.5 Efeito da adição de fontes nitrogenadas na Fermentação em Estado Sólido para produção de fitase por *Aspergillus oryzae* e determinação do melhor tempo de fermentação

As Tabelas 17, 19 e 21 apresentam os valores de atividade fitásica (fosfato liberado) obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 completo com triplicata do ponto central nos diferentes tempos de fermentação (36, 72 e 96 horas). As fermentações foram realizadas em meios suplementados com adição de fontes nitrogenadas, conforme item 5.4.1 de Material e Métodos.

Tabela 17: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* (extração enzimática após 36 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	8,19
2	4	2	2	8,01
3	2	4	2	7,69
4	4	4	2	8,19
5	2	2	4	7,81
6	4	2	4	8,06
7	2	4	4	8,28
8	4	4	4	7,85
9	3	3	3	7,96
10	3	3	3	7,98
11	3	3	3	8,15
12	0	0	0	6,07

As análises dos efeitos foram feitas utilizando o programa “Statistica” versão 7.0.

A Tabela 18 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N₁, N₂ e N₃ (extrato de levedura, água de maceração de milho e uréia) e suas interações e a Figura 12 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 36 horas de fermentação.

Tabela 18: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.-85%	Lim. conf.+85%
Média	8,01	0,07	105,52	0,00	7,88	8,15

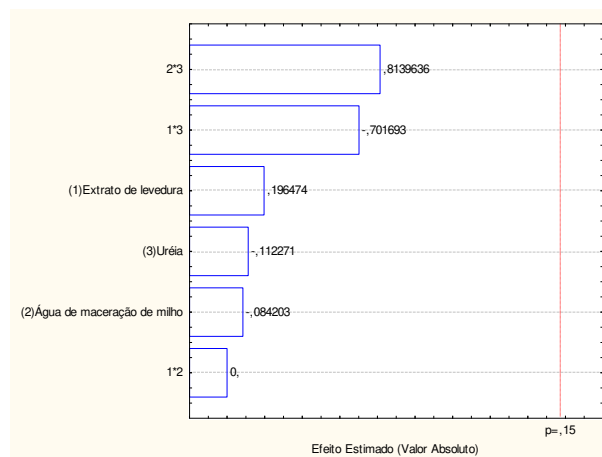


Figura 12: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 36 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus oryzae* utilizando fontes nitrogenadas.

Os resultados apresentados na Tabela 18 indicam que nenhuma das variáveis estudadas, ou a interação entre elas, são significativas dentro do limite de confiança de 85% (Figura 12). Assim, a maior resposta prevista para atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* é 8,01 FIT.

Tabela 19: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* (extração enzimática após 72 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	31,83
2	4	2	2	30,70
3	2	4	2	32,16
4	4	4	2	33,23
5	2	2	4	31,09
6	4	2	4	31,77
7	2	4	4	32,61
8	4	4	4	31,80
9	3	3	3	30,79
10	3	3	3	33,08
11	3	3	3	31,77
12	0	0	0	31,80

As análises dos efeitos foram feitas utilizando o programa “Statistica” versão 7.0.

A Tabela 20 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (extrato de levedura, água de maceração de milho e uréia) e suas interações e a Figura 13 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 72 horas de fermentação.

Tabela 20: Coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.- 85%	Lim. conf.+85%
Média	31,89	0,31	101,51	0,00	31,33	32,45

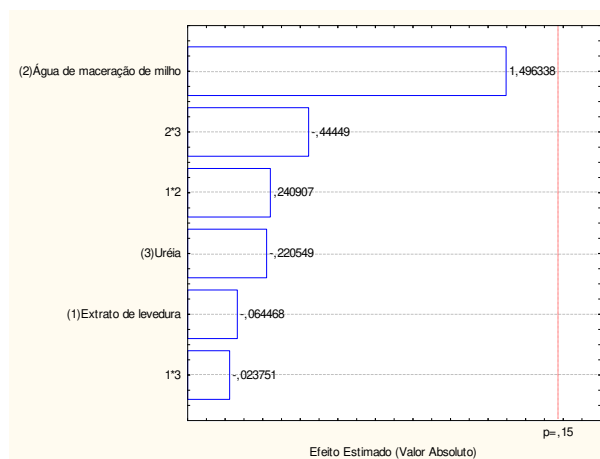


Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 72 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus oryzae* utilizando fontes nitrogenadas.

A Tabela 20 indica que nenhuma das variáveis, ou a sua interação, teve efeito significativo na atividade enzimática da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* com limite de confiança de 85% (Figura 13). A máxima atividade enzimática prevista é de 31,89 FIT.

Tabela 21: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* (extração enzimática após 96 horas de fermentação)

Ensaio	Extrato de Levedura (g.g ⁻¹)	Água de Maceração (mL.g ⁻¹)	Uréia (g.g ⁻¹)	Atividade da fitase (FIT)
1	2	2	2	31,60
2	4	2	2	35,16
3	2	4	2	32,87
4	4	4	2	38,16
5	2	2	4	36,59
6	4	2	4	32,72
7	2	4	4	35,64
8	4	4	4	36,73
9	3	3	3	36,38
10	3	3	3	39,29
11	3	3	3	34,42
12	0	0	0	41,13

As análises dos efeitos foram feitas utilizando o programa “Statistica” versão 7.0.

A Tabela 22 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis N_1 , N_2 e N_3 (extrato de levedura, água de maceração de milho e uréia) e suas interações e a Figura 12 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 96 horas de fermentação.

Tabela 22: Coeficientes de regressão para as variáveis N₁, N₂ e N₃ (água de maceração de milho, extrato de levedura e uréia) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(4)	p valor	Lim. conf.- 85%	Lim. conf.+85%
Média	35,41	0,67	52,40	0,00	34,21	36,61
1X3	-2,90	1,58	-1,83	0,14	-5,72	-0,08

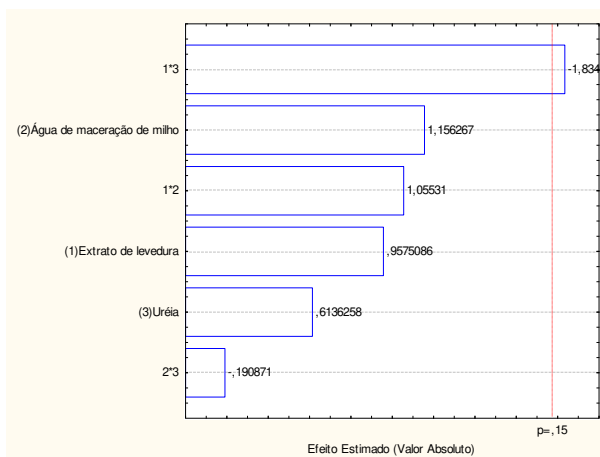


Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus oryzae* utilizando fontes nitrogenadas.

A Tabela 22 apresenta que nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo na atividade enzimática da fitase produzida por *Aspergillus oryzae*. Apenas a interação entre as variáveis N₁ e N₃ apresentou efeito significativo no limite de confiança de 85% (Figura 14). O efeito da interação é negativo, indicando que as variáveis devem ser utilizadas uma no maior e outra no menor nível para obtenção da melhor resposta. O modelo previsto a partir do planejamento experimento é:

$$FIT = 35,41 - 2,90(N_1 * N_3)$$

Assim, o maior valor de atividade fitásica após 96 h de fermentação utilizando *Aspergillus oryzae* e a interação entre as variáveis N1 e N3 (em níveis opostos) é 38,31 FIT.

Se os valores da razão “p” forem menores que o nível de significância escolhido, no caso 15% ou 0,15 há diferença significativa em relação ao fator estudado, e quanto menor o valor de p, maior a influência desse fator com relação aos demais. Assim, observou-se que em 36 h e 72 h de fermentação nenhum dos 4 sais adicionados ao processo fermentativo apresentou efeito significativo, ou mesmo a interação entre estes, ao nível de 85% de confiança (Figuras 12 e 13). Nesses tempos de fermentação, a máxima atividade esperada da enzima seria 8,01 e 31,89 FIT.

Em 96 h de fermentação, a interação entre os sais KCl e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, adicionados um no menor (2 mM) e outro no maior (3 mM) níveis apresentou efeito na atividade da enzima produzida. Nessa condição, a máxima atividade enzimática esperada é de 38,31 FIT.

Considerando-se que a atividade da enzima produzida por *Aspergillus oryzae* aumentou conforme foi aumentado o tempo de fermentação para sua produção, foi definido como 96 h o tempo de fermentação para os próximos ensaios utilizando esse micro-organismo.

Os valores de atividade da fitase produzida nas condições de fermentação testadas foram satisfatórios. Considerando-se ainda baixa toxicidade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* (LICHTENBERG et al. 2011), o fato de que a aplicação da enzima produzida a partir deste micro-organismo não requer custos dispendiosos com processos de purificação e aos valores de atividade enzimática encontrados terem sido semelhantes aos para *Aspergillus niger*, a fitase de *Aspergillus oryzae* apresenta-se como uma alternativa viável para adição em rações animais e até mesmo alimentação humana.

6.6 Efeito da adição de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus oryzae*

A Tabela 23 apresenta os valores da atividade fitásica (fosfato liberado) após 96 horas de fermentação obtidos a partir do planejamento experimental Plackett Burman de 8 ensaios com triplicata do ponto central, cujos meios foram suplementados com adição de sais, conforme item 5.4.2 de Material e Métodos.

Tabela 23: Atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* (extração enzimática após 96 horas de fermentação)

Ensaio	KCl (mM)	MgSO ₄ .7H ₂ O (mM)	CaCl ₂ . 2H ₂ O (mM)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (mM)	Atividade da fitase (FIT)
1	3	2	2	3	31,89
2	3	3	2	2	29,81
3	3	3	3	2	32,19
4	2	3	3	3	33,32
5	3	2	3	3	29,72
6	2	3	2	3	31,18
7	2	2	3	2	34,15
8	2	2	2	2	32,34
9	2,5	2,5	2,5	2,5	32,70
10	2,5	2,5	2,5	2,5	32,70
11	2,5	2,5	2,5	2,5	34,33

As análises dos efeitos foram feitas utilizando o programa “Statistica” versão 7.0.

A Tabela 24 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3, 4 (KCl, MgSO₄, CaCl₂ e ZnSO₄) e suas interações e a Figura 15 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a atividade da fitase produzida em 96 horas de fermentação.

Tabela 24: Coeficientes de regressão para as variáveis 1, 2, 3 e 4 (KCl, MgSO₄, CaCl₂ e ZnSO₄) e suas interações

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(6)	p valor	Lim. conf.- 85%	Lim. conf.+85%
Média	32,21	0,4457	72,27	0,00	31,47	32,94
1	-1,84	1,04	-1,76	0,12	-3,56	-0,12

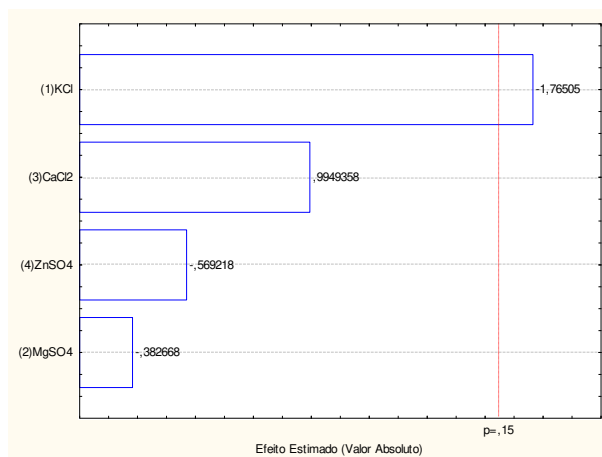


Figura 15: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a atividade fitásica durante as 96 h de fermentação do farelo de arroz por *Aspergillus oryzae* utilizando sais minerais.

Os resultados apresentados na Tabela 24 indicam que apenas o efeito principal da variável 1 (KCl) teve efeito significativo na atividade enzimática da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* em 96 horas, no nível de confiança de 85% (Figura 15). Melhores atividades enzimáticas são esperadas quando se utiliza o KCl no menor nível. O modelo empírico que apresenta a máxima resposta esperada é:

$$\text{FIT} = 32,21 - 1,84(1)$$

Assim, a máxima atividade enzimática esperada para a fitase produzida nessas condições é 34,05 FIT.

6.7 Caracterização da fitase produzida por *Aspergillus niger*

A Tabela 25 mostra a atividade remanescente da fitase de *Aspergillus niger* em relação ao pH de pré-incubação.

6.7.1 Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade enzimática

Tabela 25: Efeito do pH na estabilidade enzimática de fitase produzida por *A. niger*

pH	Minutos				
	0	30	60	90	120
1,6	35,77	36,1	36,13	35,6	35,51
2	35,85	36,17	36,37	35,64	35,66
2,6	35,91	35,77	35,82	35,19	35,19
3	35,95	35,8	35,88	35,3	35,25
4	35,98	35,92	35,99	35,4	35,35
4,6	36,09	36,03	35,99	35,49	35,47
5	36,2	36,07	36,09	35,58	35,61
6	37,45	37,44	37,53	36,35	36,32
7	36,68	36,7	36,92	36,25	36,19
8	36,29	36,36	36,6	35,86	35,84

As propriedades das enzimas são importantes na determinação de seu uso potencial nas aplicações industriais. As fitases ideais, de acordo com Andlid e Sandberg (2004) devem apresentar: pH e temperatura ótimos desejáveis; estabilidade a baixos valores de pH; estabilidade a altas temperaturas; resistência a enzimas proteolíticas; alta atividade específica; atividade extracelular; fácil cultivo e purificação; elevado nível de expressão; ausência de capacidade alergênica e ausência de toxicidade.

Observa-se que fitase de *Aspergillus niger* apresentou atividade em ampla faixa de pH, com máxima atividade em pH 6. Observou-se também, que para substrato fitato de

sódio, a fitase manteve-se estável por até 60 minutos, sendo sua atividade diminuída em aproximadamente 1 FIT a partir desse tempo, mas ainda assim mantendo a sua atividade.

Existem dois tipos de fosfatases: ácidas e alcalinas. A síntese de fosfatases ácidas é regulada pela concentração de fósforo no meio de cultivo. A síntese de fosfatases alcalinas se dá por mecanismos semelhantes, porém é detectada após permeabilização do substrato nas células.

A maioria das fitases está ativa em faixa de pH de 4,5 a 6 e sua estabilidade enzimática decresce em valores de pH abaixo de 3 ou acima de 7,5. Fitases de fungos mostram pH ótimo entre 4,5 e 6,5 e as fitases de origem bacteriana tem pH ótimo entre 6,5 e 7,5. A linhagem mesófila de *A. niger* produz 2 tipos de fitase: phytA e phytB, com valores de pH ótimos de 5,5 e 2, respectivamente (HOWSON & DAVIS, 1983).

A Figura 16 apresenta o efeito do pH de pré-incubação na estabilidade da fitase produzida por *Aspergillus niger* no pH. Os gráficos da atividade fitásica normatizados (relacionando a atividade enzimática inicial com a atividade remanescente após a incubação) ficaram remontados e não serão apresentados.

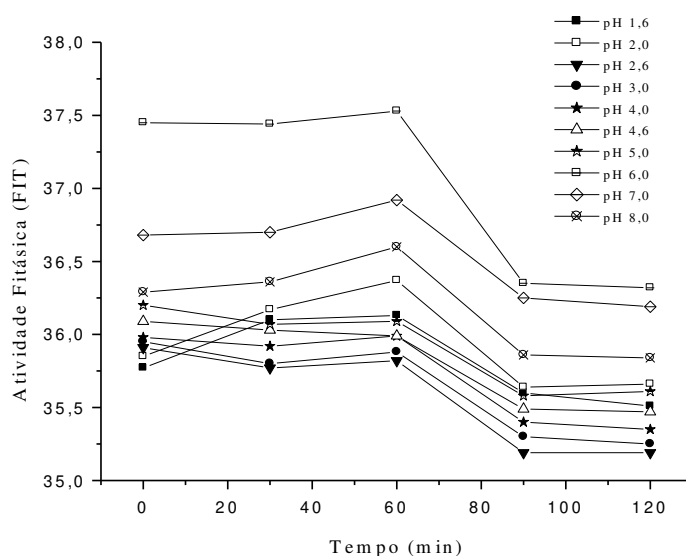


Figura 16: Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade de fitase de *A. niger*.

6.7.2 Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade enzimática

A Tabela 26 mostra a atividade remanescente da fitase de *Aspergillus niger* em relação à temperatura de pré-incubação.

Tabela 26: Efeito da temperatura na estabilidade enzimática de fitase produzida por *A. niger*

Temperatura °C	Minutos				
	0	30	60	90	120
50	31,86	31,83	30,38	30,23	30,17
60	43,92	31,92	30,65	30,59	30,38
70	41,73	40,98	40,57	40,89	37,33
80	31,7	39,1	38,91	38,08	35,1
90	36,17	36,38	34,89	34,6	34,48

Durante os 120 minutos de pré-incubação a fitase produzida por *Aspergillus niger* manteve-se estável na temperatura, tendo atividade na faixa de 50 à 80 °C.

Howson e Davis (1983) concluíram que a fitase de *A. fumigatus* é termo-resistente, mantendo até 90% de sua atividade inicial após ser aquecida a 100° por 20 minutos. A fitase de *A. niger* possui muito menos resistência térmica, mas maior atividade específica e melhor perfil de pH. Essas duas fitases apresentam homologia em 6% de suas sequências, além de estruturas cristalinas muito semelhantes.

A temperatura ótima para fitase está na faixa entre 25-80 °C. Fitases de fungos mesófilos como *Aspergillus* tem atividade ótima em temperatura entre 55 e 70 °C. Nota-se que fungos mesófilos apresentam temperatura ótima na faixa termófila.

A termoestabilidade da fitase é considerada industrialmente útil e é uma característica importante desta enzima. A Figura 17 apresenta o efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade da fitase de *Aspergillus niger*.

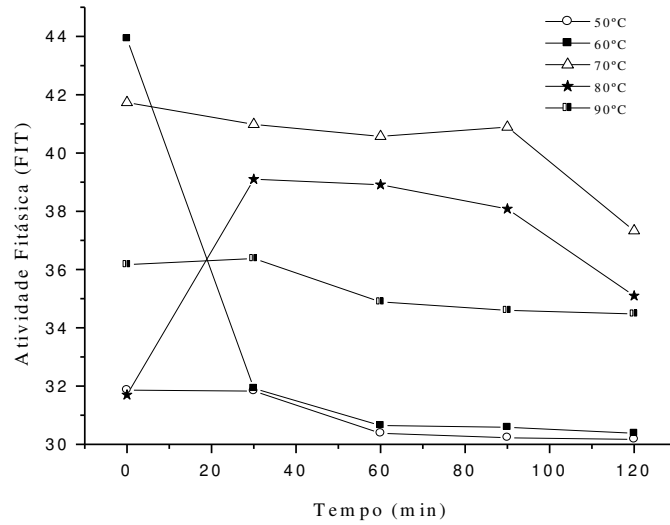


Figura 17: Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade da fitase de *A. niger*.

6.8 Caracterização da fitase produzida por *Aspergillus oryzae*

6.8.1 Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade enzimática

A Tabela 27 mostra a atividade remanescente da fitase de *Aspergillus oryzae* em relação ao pH de pré-incubação.

Tabela 27: Efeito do pH na estabilidade enzimática de fitase produzida por *A. oryzae*

pH	Minutos				
	0	30	60	90	120
1,6	36,47	42,26	38,34	40,20	40,48
2	33,59	38,45	37,17	36,24	34,57
2,6	44,25	43,48	43,73	43,41	39,91
3	51,88	48,43	45,76	44,94	42,62
4	54,86	56,31	53,42	53,46	46,83
4,6	54,86	58,06	54,95	53,28	51,89
5	54,86	51,68	49,61	46,44	48
6	54,86	65,83	53,53	55,20	52,85
7	54,86	59,05	60,12	52,82	52,60
8	54,86	56,49	57,34	56,10	51,28

A fitase de *A. oryzae* possui boa estabilidade na faixa de pH de pré-incubação de 1,6 a 8 durante os 120 minutos. O pH observado como ótimo para atividade da enzima foi 6. Provavelmente os íons presentes no tampão agiram na estrutura mudando a conformação da enzima e proporcionando maior atividade catalítica.

A Figura 18 mostra o efeito do pH de pré-incubação na estabilidade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae*.

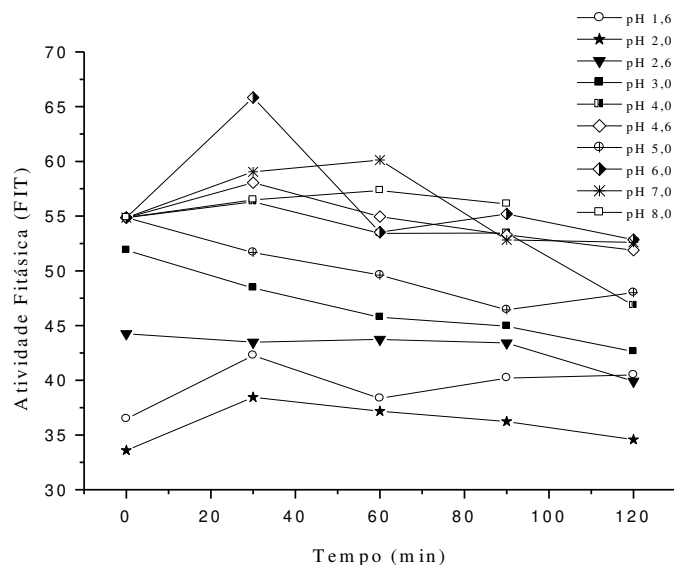


Figura 18: Efeito do pH de pré-incubação na estabilidade da fitase de *A. oryzae*.

6.8.2 Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade enzimática

A Tabela 28 mostra a atividade remanescente da fitase de *Aspergillus oryzae* em relação ao pH de pré-incubação.

Tabela 28: Efeito da temperatura na estabilidade enzimática da fitase produzida por *A. oryzae*

Temperatura °C	Minutos				
	0	30	60	90	120
50	33,29	33,44	32,55	31,71	31,60
60	31,60	31,60	31,39	31,39	31,30
70	33,32	32,67	32,73	32,08	31,87
80	33,34	32,31	31,32	31,79	31,30
90	43,03	42,2	41,04	40,09	32,67

A fitase de *A. oryzae* também mostrou-se termicamente estável na faixa de 50 a 80 °C durante os 120 minutos de tratamento térmico. As enzimas de origem vegetal não resistem ao tratamento térmico, sendo a maioria inativada irreversivelmente em temperaturas superiores a 70 °C. Já as microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação, dependendo do micro-organismo produtor e da linhagem (GREINER, 2009).

A Figura 19 apresenta o efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade enzimática da fitase produzida por *Aspergillus oryzae*.

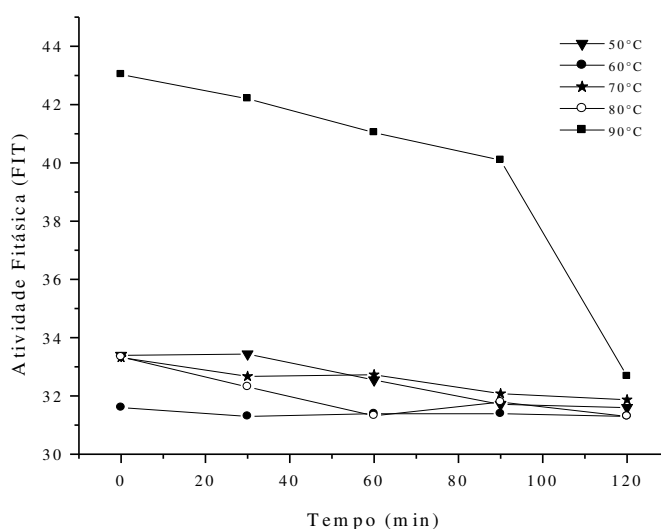


Figura 19: Efeito da temperatura de pré-incubação na estabilidade da fitase de *A. oryzae*

6.9 Aplicação da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* em diferentes ingredientes vegetais utilizados no preparo de rações animais

A fitase produzida por *Aspergillus oryzae* por fermentação em estado sólido foi adicionada em diferentes ingredientes vegetais normalmente utilizados na fabricação de rações animais, a fim de se avaliar a atividade da enzima pela correlação com o teor de fósforo liberado em cada ingrediente. Os ingredientes utilizados foram: farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de milho.

6.9.1 Teor de fósforo liberado nos diferentes ingredientes de origem vegetal

A Tabela 29 apresenta a atividade enzimática do extrato enzimático bruto produzido durante as 96 horas de fermentação em estado sólido, utilizando-se *Aspergillus oryzae* e como substratos da reação enzimática os diferentes ingredientes de origem vegetal.

FIT₂ é a atividade da enzima em µmol por ml de extrato enzimático por minuto por grama de ingrediente vegetal.

Tabela 29: Teor de fósforo liberado nos ingredientes de origem vegetal após tratamento com fitase produzida a partir de Fermentação em Estado Sólido por *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de arroz

Ingrediente Vegetal	(%) P livre antes do tratamento	FIT*	FIT ₂	Fitato/g de ingrediente após tratamento
Farelo de Arroz	20	20,9	0,0092	0,2092
Farelo de Soja	40	20,9	0,0011	0,0039
Farelo de Trigo	29	20,9	0,0015	0,0092
Farelo de Milho	28	20,9	0,0051	0,0024

FIT₂: µmol de fósforo liberados por ml de extrato enzimático por minuto por grama de ingrediente vegetal.

*(atividade da fitase produzida por *Aspergillus oryzae* utilizando, como substrato da reação enzimática, fitato de sódio puro).

A Tabela 29 mostra o baixo teor de fósforo disponível antes do tratamento com a enzima fitase e a quantidade de fitato presente inicialmente nos ingredientes vegetais analisados. Observa-se que após o tratamento dos ingredientes de origem vegetal com a fitase produzida por *A. oryzae* ocorreu um aumento significativo na disponibilidade de fósforo nos farelos.

O farelo de arroz é o ingrediente que possui o maior teor de fósforo total. Entretanto, a maior parte deste fósforo está na forma de ácido fítico o que torna o fósforo

indisponível. Após a adição da fitase, o farelo de arroz foi o ingrediente que mostrou maior quantidade de fósforo livre, seguido dos farelos de milho, trigo e soja.

A fitase pode ser adicionada tanto nas rações animais após o seu preparo ou nos ingredientes que serão utilizados no seu preparo (RIES E MACEDO, 2010). Essa opção reduziria os custos com adição de fontes inorgânicas nas rações animais e otimizaria o aproveitamento das rações. Para atingir os requerimentos nutricionais das aves e dos suínos em dietas à base de milho e farelo de soja é necessário suplementar com outras fontes de fósforo como, por exemplo, o fosfato bicálcico e a farinha de carne, devido à indisponibilidade do fósforo fítico contido nos vegetais (Zhang et al., 1999).

A ação da fitase de micro-organismos sobre o fitato por ser influenciada por fatores como a quantidade de substrato (fitato), a relação entre cálcio/fósforo, os níveis de Ca e a suplementação de vitamina D3 nas dietas. (RIES E MACEDO, 2010)

Optou-se por avaliar a adição nos ingredientes vegetais puros devido à possibilidade de sua adição também nos cereais para dieta humana. É importante ainda salientar, que a adição da fitase, além de aumentar a biodisponibilidade do fósforo, altera a disponibilidade dos sais minerais na dieta devido à ação complexante do ácido fítico com cátions bivalentes como o Cálcio, Manganês, Ferro, Zinco, Cobre; assim como, com proteínas e carboidratos reduzindo também a digestibilidade desses nutrientes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente trabalho mostrou que é possível produzir a fitase exógena a partir do processo de Fermentação em Estado Sólido utilizando o farelo de arroz como substrato. A linhagem que produziu enzima com maior atividade (52,51 FIT) foi *Aspergillus niger*. Entretanto, considerando-se a ausência de toxinas na enzima produzida por *Aspergillus oryzae* e a sua alta atividade (38,31 FIT) considerou-se este o micro-organismo promissor para produção de fitase.

- O melhor tempo de fermentação definido para *Aspergillus niger* foi de 36 horas, enquanto que o melhor tempo de fermentação definido para o *Aspergillus oryzae* foi de 96 horas.

- A adição de diferentes fontes nitrogenadas (extrato de levedura, água de maceração de milho e uréia) na fermentação produziu efeitos significativos. Nas 36 h de fermentação para produção de fitase por *Aspergillus niger* os melhores resultados foram obtidos com adição de extrato de levedura, uréia ou água de maceração de milho juntamente com uréia. Considerando-se o elevado custo do extrato de levedura, as outras opções tornam-se mais atraentes. Nas 96 h de fermentação para produção de fitase por *Aspergillus oryzae*, os melhores resultados foram atingidos na fermentação adicionada de extrato de levedura e uréia.

- A adição de sais minerais (KCl, $MgSO_4$, $CaCl_2$ e $ZnSO_4$) não apresentou efeito significativo na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus niger*. Utilizando-se *Aspergillus oryzae* a suplementação com KCl apresentou efeito positivo na atividade da enzima produzida.

- A fitase produzida por *Aspergillus niger* utilizando farelo de arroz apresenta as seguintes características:

- é uma enzima termoestável, com atividade na faixa de 50 a 80 °C;

- é uma enzima estável em ampla faixa de pH com atividade em valores de 1,6 a 8 e maior estabilidade em pH 6.

- A fitase produzida por *Aspergillus oryzae* utilizando-se farelo de arroz apresenta seguintes características:
 - é uma enzima termoestável, com atividade na faixa de 50 a 80 °C;
 - é uma enzima estável em diversos pHs, na faixa de 1,6 a 8 e com maior estabilidade em pH 6.
- A adição de fitase produzida por *A. oryzae* em diferentes ingredientes de origem vegetal utilizados na fabricação de rações (farelo de arroz, farelo de milho, farelo de trigo e farelo de soja) resultou no aumento da disponibilidade de fósforo livre e redução do teor de ácido fítico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDLID T.A., SANDBERG A., VEIDE J. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces Cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. V. 97, p. 157-169, 2004.

ANDRIGUETTO J. P.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL A.; FLEMMING J.S.; SOUZA, G.A.; BONA, A. Nutrição animal. V.1, p.385, 1982.

BATTAGLINO, R. A. et al. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl. Microbiol. And Biotechnol. V.35, p.292-296, 1991.

BERMUDES, R. F. Avaliação do farelo de arroz integral em rações para terneiros holandes e Jersey desaleitados precocemente. Pelotas, 1994. 242 p. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio Internacional ACAV – Embrapa sobre Nutrição de Aves, I. Concórdia, 17 e 18 nov., 1999. Anais. Concórdia. p.118 – 132, 1999.

DEL BIANCHI, V.L., MORAES, I.O., CAPALDO, D.M.F. Fermentação em Estado Sólido. In: SHIMIDELL, W., LIMA, V.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. V 2. São Paulo. Editora Edgard Blucher, 2001. p 247 – 276.

DVORAKOVÁ, J. *et al.* Characterization of Phytase Produced by *Aspergillus niger*. Folia Microbiol. V.42, p. 349-352, 1997.

FENNEMA, Owen. Química de los alimentos. 1ª ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FIREMAN, A. K. B. A. T.; FIREMAN, F. A. T. Fitase na alimentação de poedeiras. Ciência Rural, Santa Maria. V.28, n.3, p.529-534, 1998.

GARGOVA, S.; SARIYSKA, M. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase on acid phosphatase. *Enzyme and Microbial Technology*. V.32, p.231-235, 2003.

GREINER, R.; SILVA, L.G.; COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Brazilian Journal of Microbiology*. V.40, p.795-807, 2009.

HOWSON S.J., DAVIS R.P. Production and phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 5, p. 377-382, 1983.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MKKAR, H.P.S.;BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. *Food Chemistry*. V. 120, p.945-959, 2010.

PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A. & SOCCOL, V.T. Production purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology*. V.77, p.203 – 214, 2001.

KAISER, V.H.; RUCATTI, E.G.; OLIVEIRA, C.F.; BARATA, T.S. Análise de mercado: Rio Grande do Sul. *Informativo IRGA*. V.1, n.2, p. 1-7, 2005.

KEROVUO J., LAPPALAINEN I., REINIKAINEN T. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V 268, p. 365-369, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, 1993.

LICHTENBERG J., PEDERSEN P.B., ELVIG-JOERGENSEN S.G., SKOV L.K., OLSEN C.L., GLITSOE L.V. Toxicological studies on a novel phytase expressed from synthetic genes in *Aspergillus oryzae*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. V 60, p. 401-411, 2011.

LÓPEZ, S.E., LÓPEZ, J e TEICHMANN, H.F. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo em dietas com farelo de arroz desengordurado para frangos de corte. In: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia (34: 1997: Juiz de Fora). *Anais. Juiz de Fora: SBZ*, 1997. p.51-53, 1997.

NOUREDDINI, H.; DANG, J. Degradation of phytases in distillers grains and corn gluten feed by *Aspergillus niger* phytase. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.159, p.11-23, 2009.

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

PELCZAR, M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS; PELCZAR, M. F. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2ed. São Paulo: Makron Books do Brasil. V. 1, 1996.

REMUS, J. A avicultura e o meio ambiente colhem os benefícios da nova geração de fitases. AveWorld. V27, 2008.

RIES, E.; MACEDO, G. Phytase production by *Sacharomyces cerevisiae* in a mineral and a cost-effective molasses medium: optimization using statistical designs. New Biotechnology. V.25, p.196-197, 2009.

SA, L.M. Ingredientes alternativos na alimentação de suínos – economia e segurança. Poli nutri. 2005

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. Ed. Edgard Blücher. V.1, p.1-29, 2001.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. Ed. Edgard Blücher. V.2, p.247-270, 2001.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. Ed. Edgard Blücher. V.3, p.351-363, 2001.

SILVA, L.T., MOREIRA, K.A., PORTO, T.S., PORTO, A.L.F. Produção de fitases a partir de resíduos agroindustriais em fermentação no estado sólido utilizando fungos do gênero *Aspergillus*. X Jornada de ensino, pesquisa e extensão. Recife, 2010.

SILVA, T.M.; MALLER A.; DAMÁSIO, A.R.L.; JORGE A.J.; TERENCEI, H.P.; POLIZELI, M.L.T.M. Potencial application in animal feed of phytase produced from agro-industrial residues by *Aspergillus japonicus*. Journal of biotechnology. V.150, p.514, 2010.

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

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potencial applications. Biosource Technology. V.99, p.2824-2830, 2008.

SOCOL, C.R.; SILVA, A.R.Z.; GERN, J.C.; FERRER, P.P. Produção de fitase por fermentação no estado sólido utilizando bioresíduos agrícolas para aplicação como aditivo na ração animal. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

VAN BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. Currient opnion in biotechnology. V 13, p.338-344, 2002.

ZHANG, X., ROLAND, D.A., McDANIEL, G.R., RAO, S.K. Effect of Natuphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acid broilers. Poultry science. V 78, p. 1567-1572, 1999.

Disponível em <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=26707>. Acesso em 5 de março de 2010.

Disponível em <http://www.quabi.com.br/> Acesso em fevereiro e março de 2010.

Disponível em <http://www.arroz.agr.br/site/index.php> Acesso em 12 de março de 2010.

ANEXO 1



Presidência da República **Casa Civil** **Subchefia para Assuntos Jurídicos**

DECRETO Nº 76.986, DE 6 DE JANEIRO DE 1976.

[Vide Decreto de 5.9.1991](#)

[Revogado pelo Decreto nº 6.296, de 2007](#)

Regulamenta a Lei n.º 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatória dos produtos destinados à alimentação animal e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, usando da atribuição que lhe confere o artigo 81, item III, da Constituição, e tendo em vista o disposto no artigo 7º, da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974,

DECRETA:

CAPÍTULO I

Dos Órgãos de Fiscalização

Art 1º A Inspeção e a fiscalização dos produtos destinados à alimentação animal são regulados de conformidade com as normas previstas neste Regulamento.

Art 2º A execução da inspeção e da fiscalização de que trata este Regulamento é atribuído, através da Divisão de Nutrição Animal e Agrostologia (DNAGRO), do Departamento Nacional de Produção Animal (DNPA).

Art 3º O Ministério da Agricultura poderá celebrar convênios com os Estados, Distrito Federal e Territórios, para a execução de serviços relacionados com a inspeção e a fiscalização previstas neste Regulamento, com atribuição de receita.

CAPÍTULO II

Dos Produtos e Estabelecimentos

Art 4º Ficam sujeitos à inspeção e à fiscalização todos os produtos empregados ou suscetíveis observadas as seguintes definições:

I - alimento - toda substância que, consumida pelo animal, é capaz de contribuir para a manutenção de sua vida e sobrevivência da espécie à qual pertence;

II - Ingredientes - qualquer matéria-prima utilizável na composição de uma ração, concentrado ou suplemento;

III - ração animal - qualquer mistura de ingredientes capaz de suprir as necessidades nutritivas para manutenção, desenvolvimento e produtividade dos animais a que se destine;

IV - concentrado - mistura de ingredientes, que adicionada a um ou mais alimentos, em proporções adequadas e devidamente especificadas pelo fabricante do concentrado, constitua uma ração animal;

V - suplemento - ingrediente ou mistura de ingredientes capaz de suprir a ração ou concentrado, em vitaminas, aminoácidos ou minerais, sendo permitida a inclusão de aditivos;

VI - sal mineralizado - mistura de micro e macro-elementos minerais, com cloreto de sódio, para ser administrada isolada e diretamente aos animais;

VII - aditivo - substância intencionalmente adicionada ao alimento, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo, como os antibióticos, corantes, conservadores, antioxidantes e outros;

VIII - aditivo incidental - substâncias residuais ou migradas, presentes no alimento como decorrência das fases de produção, beneficiamento, acondicionamento, estovagem e transporte do alimento ou das matérias-primas nele empregadas, tais como defensivos agrícolas e similares;

IX - ração medicamentosa - é a ração animal adicionada de substâncias medicamentosas e destinada exclusivamente ao tratamento de doentes;

X - componente grosseiro - ingredientes de baixo valor nutritivo, tais como: casca de arroz, de amendoim, de aveia e de algodão, palha e sabugo de milho, bagaço de cana e semelhantes.

§ 1º Para efeito deste Regulamento, entende-se como ração balanceada, a ração animal, o concentrado e o suplemento, definidos nos itens III, IV e V deste Artigo.

§ 2º Os grãos e sementes destinados à alimentação animal, quando expostos à venda "*in natura*", ficam dispensados das exigências de que trata este Artigo.

§ 3º. Os fenos, quando expostos à venda, moídos, estão sujeitos às exigências deste Artigo.

§ 4º As matérias-primas dos suplementos, quando utilizados exclusivamente na elaboração dos mesmos, ficam dispensadas das exigências deste Regulamento, a critério da Divisão de Nutrição Animal e Agrostologia (DNAGRO).

~~Art 5º Qualquer alimento para animal, que contenha antibióticos ou outras substâncias medicamentosas, somente será registrado quando tais antibióticos ou substâncias estiverem devidamente registrados na Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA), do DNPA, do Ministério da Agricultura. [\(Revogado pelo Decreto nº 5.053, de 2004\)](#)~~

Art 6º É proibida a adição de hormônios em alimentos para animais, de conformidade com a legislação em vigor.

Art 7º Os produtos definidos no Artigo 4º, itens III, IV, V e VI, só poderão ser importados, quando devidamente comprovada a impossibilidade técnica ou econômica de sua fabricação no Território Nacional ou na hipótese de atendimento insatisfatório do mercado consumidor, ouvida a entidade de classe da indústria respectiva. [\(Vide Decreto nº 78.987, de 1976\)](#)

Parágrafo único. Os produtos previstos no Artigo 4º itens II, III, IV, V, VI, e VII, quando importados somente poderão ser comercializados no País, após serem registrados na Divisão de Nutrição Animal e Agrostologia (DNAGRO), do DNPA.

Art 8º Os estabelecimentos abaixo classificados estão sujeitos ao prévio registro na DNAGRO:

I - Fábrica de ingredientes - Estabelecimento cujos produtos ou subprodutos de sua operação sejam utilizados como ingredientes para alimentação animal, compreendendo os de origem vegetal, animal, mineral e outros;

II - Fábrica de rações, concentrados, suplementos e sal mineralizado - Estabelecimento que se destina à elaboração de rações, concentrados, ou mistura alimentícia de vitaminas ou sais minerais;

III - Remisturador - Estabelecimento que dilui concentrado ou suplemento, produzidos em firmas sob inspeção federal, sendo o produto final igual àquele registrado pelo estabelecimento produtor do concentrado ou suplemento;

IV - Importador - Estabelecimento que importa ingredientes, vitaminas, sais minerais, aditivos, aminoácidos e outros para alimentação animal, para comercialização em embalagem original ou própria;

V - Remanipulador - Estabelecimento que fraciona produtos importados;

VI - Distribuidor, Atacadista ou Varejista - Estabelecimento que comercializa, no atacado ou a varejo, em embalagem original, inviolada ou a granel, produtos para alimentação animal, cujas especificações de qualidade e garantias são fornecidas pelos seus fabricantes, remisturadores ou importadores.

Parágrafo único. Os estabelecimentos licenciados na DDSA ou registrados no Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA, que elaborem suplementos e ingredientes de origem animal, ficam dispensados da exigência deste Artigo, devendo, entretanto, os suplementos ou ingredientes elaborados nos mesmos terem seus rótulos registrados na DNAGRO.

CAPÍTULO III

Do Registro dos Estabelecimentos

Art 9º O pedido de registro dos estabelecimentos a que se refere o Artigo 8º deste Regulamento, deverá ser dirigido ao Diretor da DNAGRO e instruído com os seguintes documentos:

I - cópia da ata do contrato social da firma, devidamente registrada na Junta Comercial;

II - planta baixa, em 3 (três) vias, na escala 1/100, indicando instalações e outras dependências, tais como: sanitários, vestiários e demais compartimentos;

III - planta do terreno, em 3 (três) vias, com indicação da localização em relação às propriedades vizinhas na escala 1/1.000;

IV - memorial descritivo da rotina de fabricação dos diferentes produtos que pretende elaborar;

V - memorial descritivo do estabelecimento;

VI - declaração de responsabilidade do técnico, diplomado em Engenharia Agrônômica ou Medicina Veterinária ou Zootecnia, com o número de seu registro no órgão competente da região em que estiver localizado o estabelecimento, em se tratando de fábricas de rações, concentrados, suplementos e sal mineralizado.

§ 1º Os estabelecimentos distribuidores, atacadistas e varejistas, estão dispensados das exigências a que se refere este Artigo, devendo, no entanto, ser cadastrados pelas Diretorias Estaduais do Ministério da Agricultura, na respectiva Unidade da Federação.

§ 2º Os estabelecimentos remisturadores, para efeito de registro, estão dispensados das exigências constantes dos itens IV e VI deste Artigo, devendo, contudo, juntar autorização do fabricante para execução dessa operação, cabendo a responsabilidade bromatológica ao fabricante, e as demais, previstas neste Regulamento, aos requerentes.

§ 3º Os estabelecimentos fabricantes, já registrados na DNAGRO, poderão ser cadastrados como remisturadores, mediante comprovação da exigência a que alude o parágrafo anterior.

§ 4º Os estabelecimentos importadores estão dispensados das exigências constantes dos itens II, III, IV, V e VI, deste Artigo.

§ 5º. Os estabelecimentos remanipuladores estão dispensados das exigências do item IV deste Artigo.

Art 10. Os prédios em que se instalem as fábricas de alimento para animais devem reunir as seguintes condições:

I - luz natural e artificial adequada e ventilação suficiente em todas as dependências;

II - pisos revestidos com material adequado, entre outros: cimento, ladrilhos hidráulicos, lajes de granito, madeira e outros materiais que a tecnologia aconselhar;

III - sanitários e vestiários, com capacidade proporcional ao número de operários, instalados em compartimentos sem acesso direto às seções de armazenamento, manipulação e expedição dos produtos.

§ 1º As fábricas de alimento para animais terão que possuir maquinaria adequada às suas finalidades.

§ 2º Qualquer modificação das dependências ou instalações dos estabelecimentos industrializadores, a que alude este Artigo, somente poderá ser feita mediante prévia comunicação ao órgão fiscalizador.

Art 11. Em caso de alienação ou arrendamento dos estabelecimentos a que se referem os itens I, II, III e IV do Artigo 8º, o adquirente ou arrendatário deverá requerer a apostila da nova situação jurídica ao órgão que efetivou o registro.

§ 1º Os responsáveis por esses estabelecimentos devem notificar os interessados, por ocasião da compra ou arrendamento, da situação em que se encontram os referidos estabelecimentos, face às exigências deste Regulamento.

§ 2º Enquanto não concretizada a alienação ou arrendamento, as obrigações, perante o órgão fiscalizador, continuam com o responsável pelo estabelecimento em cujo nome esteja registrado.

§ 3º O comprador ou arrendatário que não apresentar, dentro de prazo máximo de 30 (trinta) dias, os documentos necessários, terá suspenso o registro, o qual só poderá ser restabelecido depois de cumprida essa exigência.

§ 4º. Adquirido o estabelecimento, por compra ou arrendamento, obriga-se o adquirente ou arrendatário a cumprir todas as exigências feitas ao responsável anterior, sem prejuízo de outras que venham a ser determinadas.

CAPÍTULO IV

Do Registro dos Rótulos ou Etiquetas

Art 12. Todos os alimentos destinados a animais, expostos à venda, devem estar devidamente identificados, por meio de rótulos ou etiquetas, registrados na DNAGRO.

Parágrafo único. O registro do rótulo ou etiqueta implica na aprovação do produto por ele identificado.

Art 13. Os rótulos ou etiquetas a que se refere o Artigo anterior deverão indicar:

I - marca comercial do produto;

II - nome da firma responsável;

III - carimbo oficial da Inspeção Federal;

IV - data da fabricação codificada ou não;

V - finalidade do produto e espécie a que se destina;

VI - peso líquido do produto expresso em quilograma;

VII - os dizeres "Rótulo Registrado na DNAGRO sob nº. ...";

VIII - localização do estabelecimento fabricante especificado Município e Estado, facultando-se declaração de rua e número;

IX - nome de cada ingrediente e substitutivos que entram na composição do produto, sendo obrigatória a indicação da percentagem do ingrediente que figurar na composição em percentagem superior a 50% (cinquenta por cento);

X - níveis de garantia de composição, de acordo com o Artigo 20 deste Regulamento;

XI - condições de conservação;

XII - número do C.G.C. e inscrições fiscais.

§ 1º Os rótulos ou etiquetas destinados à identificação de ingredientes ficam dispensados das exigências previstas nos itens V e IX deste Artigo.

§ 2º Os nomes de todos os ingredientes e substitutivos devem ser expressos em letras ou tipos do mesmo tamanho.

§ 3º O carimbo de inspeção, previsto no item III deste Artigo, obedecerá às seguintes especificações: forma quadrada, indicando o número de registro do estabelecimento isolado e encimado das palavras: Inspeccionado e Brasil, respectivamente com as seguintes dimensões: 0,03m (três centímetros), nos invólucros de até 5Kg: 0,06m (seis centímetros), nos invólucros de até 30Kg: e 0,09m (nove centímetros), nos invólucros para mais de 30 Kg de produto.

Art 14. Além das indicações obrigatórias a que se refere o Artigo 13, os rótulos e etiquetas deverão conter, quando for o caso, as demais exigências previstas no Capítulo V deste Regulamento.

Art 15. O pedido de registro dos rótulos e etiquetas deverá ser dirigido ao Diretor da DNAGRO, mediante requerimento instruído com os seguintes documentos:

I - exemplares, em 3 (três) vias, de rótulos ou etiquetas;

II - relação, em 3 (três) vias, da composição básica do produto.

§ 1º. Os interessados poderão pedir exame prévio dos croquis dos rótulos e etiquetas que pretendam utilizar, fazendo acompanhar os respectivos pedidos de clara indicação das cores a empregar a demais detalhes.

~~§ 2º. A concessão do registro de que trata este artigo terá validade de 5 (cinco) anos.~~

~~§ 3º. O interessado deverá requerer a revalidação do registro, no prazo de 60 (sessenta) dias antes do término da validade, considerando-se automaticamente cancelado quando excedido esse prazo.~~ [Revogado pelo Decreto nº 99.427, de 1990](#)

Art 16. Quando comercializarem produtos acabados, destinados à alimentação animal, deverão os importadores anexar, na embalagem original dos referidos produtos, etiquetas, em português, contendo índices de garantia, finalidade do produto, número de registro na DNAGRO, nome e endereço do importador.

Art 17. O rótulo ou etiqueta só poderá ser usado no produto para o qual tenha sido registrado e nenhuma modificação poderá ser feita sem prévia aprovação do DNAGRO.

Art 18. Serão permitidas modificações das fórmulas de rações e concentrados aprovados, a juízo do técnico responsável, desde que não resultem em prejuízo de sua eficiência nutritiva e que não sejam alterados os seus níveis de garantia.

Art 19. As embalagens dos produtos elaborados pelos estabelecimentos remisturadores serão as mesmas aprovadas para os produtos finais do fabricante, com adaptações dos dados relativos aos itens II, III, VII, XII do artigo 13, que deverão ser aqueles do estabelecimento remisturador.

CAPÍTULO V

Das Garantias dos Produtos

Art 20. Os produtos para alimentação animal somente poderão ser expostos à venda, quando contenham, em seus rótulos ou etiquetas, os níveis de garantia, observadas as especificações abaixo:

I - Rações e Concentrados

Umidade	Máximo
Proteína Bruta	Mínimo
Extrato Etéreo	Mínimo
Matéria Fibrosa	Máximo
Matéria Mineral	máximo
Cálcio	máximo
Fósforo	mínimo

II - Ingredientes de Origem Animal

Umidade	máximo
Proteína Bruta	mínimo
Extrato Etéreo	mínimo
Cálcio	máximo
Fósforo	mínimo

Acidez - ml de NaOH N/10 por 100 gr. do produto (máximo)

III - Ingredientes de Origem Vegetal

Umidade	máximo
Proteína	mínimo
Extrato Etéreo	mínimo
Matéria Fibrosa	máximo
Mineral	máximo

§ 1º. Os suplementos minerais e sal mineralizado, com ou sem vitaminas, aminoácidos ou aditivos, deverão indicar as quantidades mínimas de sua composição, expressas em percentagem, grama miligrama ou p.p.m. de cada elemento, por quilograma do produto.

§ 2º. Nos suplementos vitamínicos deverão ser indicadas as quantidades mínimas em U.I. para as vitaminas A e D, em micrograma, para a vitamina B-12 e, em miligramas, para as demais vitaminas, por quilograma do produto.

§ 3º. Os suplementos minerais deverão indicar a quantidade máxima de flúor.

Art 21. As farinhas protéicas de origem vegetal deverão indicar o processo de extração utilizado e o solvente empregado, quando for o caso, sendo que, para o farelo de soja, deverá ser indicado se o produto é ou não tostado, e qual seu valor em atividade ureática.

Art 22. Para os farelos suscetíveis ao ataque de micro-organismos toxigenos, deverá constar o respectivo teor de toxina, de acordo com instruções a serem expedidas.

Art 23. Para o caso de rações destinadas a ruminante, é permitido declarar a proteína digestível, bem como os nutrientes digestíveis totais ou seus valores energéticos.

Art 24. Nas rações para aves e suínos, poderá constar o valor energético, em energia metabolizável / quilo, facultando-se referência sobre a proteína animal empregada ou seu equivalente em aminoácidos essenciais.

Art 25. São ingredientes aceitáveis, em rações para ruminantes, a uréia, biureto e sais de amônio, derivados de ácido carbônico e fosfórico.

§ 1º A percentagem máxima do valor, equivalente ao nitrogênio não protéico dos ingredientes de que trata este Artigo, deve aparecer na garantia química, logo abaixo da proteína bruta, e a substância nitrogenada não protéica, constará da lista dos ingredientes.

§ 2º Os concentrados que contenham uréia, biureto e sais de amônio serão permitidos, desde que indiquem claramente seu uso apropriado.

Art 26. Nas rações, deverá constar a quantidade de componentes grosseiros, que não poderá ultrapassar a percentagem de 10% (dez por cento), sendo proibido o seu emprego em concentrado.

Art 27. Somente poderão ser declaradas, na composição de rações e concentrados, as quantidades de vitaminas, minerais menores e aminoácidos que tenham sido adicionados como suplemento, sendo que, no caso de vitamina A, a declaração poderá fazer-se em miligrama de caroteno, quando de fonte natural.

Art 28. Os aminoácidos, aditivos e medicamentos também deverão ter seus níveis de garantia expressos em grama, miligrama ou p.p.m., por quilograma do produto.

Art 29. As rações medicamentosas deverão conter, nos rótulos, o termo "medicamentosa", em destaque, bem como as indicações e modo de usar, e serão elaboradas sob a responsabilidade exclusiva de Médico Veterinário.

Art 30. As rações e concentrados serão garantidos pelo prazo de 30 (trinta) dias, a partir da entrega, desde que sejam conservados e manipulados convenientemente.

Art 31. A DNAGRO, baixará instruções específicas, estabelecendo definições, normas e padrões para os diversos ingredientes e aditivos, empregados na alimentação, de acordo com o que estabelece este Regulamento

CAPÍTULO VI

Das Embalagens

Art 32. Os produtos destinados à alimentação animal só poderão ser acondicionados em embalagens aprovadas pela DNAGRO.

Art 33. As embalagens deverão estar perfeitamente secas e limpas, ser novas e de primeiro uso, devendo ser fechadas de modo a garantir sua inviolabilidade.

Art 34. Será tolerado o reaproveitamento de embalagens, desde que convenientemente esterilizadas, por processo aprovado pela DNAGRO.

Art 35. Na entrega, a granel, de ingredientes, concentrados, rações e suplementos, será aposta, na nota fiscal, a etiqueta do produto devidamente registrada na DNAGRO.

CAPÍTULO VII

Da Inspeção e Fiscalização

Art 36. A inspeção e a fiscalização de que trata o presente Regulamento serão realizados nas fábricas de rações, de suplementos, de sal mineralizado e de aditivos, nas cooperativas e órgãos públicos, nos portos marítimos, fluviais e postos de fronteiras, nos remisturadores, remanipuladores, armazéns, distribuidores, atacadistas e onde quer que se fabriquem, manipulem ou guardem, para fins comerciais, produtos destinados à alimentação animal.

§ 1º. - O registro do estabelecimento, de que trata este Regulamento, dispensa qualquer outro para fins similares, quer de âmbito federal, estadual ou municipal.

§ 2º. - A fiscalização dos importadores, distribuidores, atacadistas e varejistas terá por objetivo reinspecionar os produtos destinados à alimentação animal, previstos neste Regulamento.

§ 3º. - A fiscalização e controle dos subprodutos, elaborados por estabelecimento, sob inspeção do DIPOA, ficarão a cargo daquele órgão.

Art 37. A inspeção industrial, bromatológica, e higiênico-sanitária dos produtos destinados à alimentação animal será exercida nos estabelecimentos constantes dos itens I, II, III e V do artigo 8º, abrangendo:

I - o funcionamento e a higiene geral dos estabelecimentos;

II - o exame do produto acabado;

III - os exames microbiológicos, biológicos, físicos e químicos das rações, ingredientes, concentrados, suplementos e sal mineralizado, coletados na fonte de produção ou comércio;

IV - as fases de recebimento, conservação, manipulação, preparação, acondicionamento, transporte e estocagem de todos os produtos destinados à alimentação animal;

V - a embalagem e rotulagem;

VI - a classificação dos produtos, segundo a espécie animal e a sua finalidade.

Art 38. Os servidores incumbidos da inspeção e da fiscalização, quando em serviço, ficam obrigados a exibir a carteira de identidade funcional, fornecida, para esse fim específico, pela DNAGRO.

§ 1º - Os servidores a que se refere o presente Artigo, no exercício de suas funções, terão livre trânsito em todas as dependências industriais do estabelecimento.

§ 2º - As fábricas de alimento para animais deverão ter um livro de ocorrência, com termo de abertura e páginas rubricadas, destinadas à anotação das visitas de inspeção, das ocorrências e das exigências feitas aos estabelecimentos pela respectiva fiscalização.

CAPÍTULO VIII

Da Análise Fiscal e Pericial

Art 39. A DNAGRO coletará amostras, para fins de análise fiscal, na fonte de produção ou no comércio, mediante auto, lavrado em duplicata, nos termos dos modelos e instruções por ela expedidos.

Parágrafo único - Uma via do auto será entregue ao interessado, contra recibo, e a outra acompanhará as amostras.

Art 40. As amostras, assim obtidas, serão misturadas, homogeneizadas e divididas em quatro partes, de aproximadamente 200 g cada uma, acondicionadas em embalagem inviolável e que só poderão ser abertas por ocasião da análise.

Art 41. O auto de coleta deverá ser, obrigatoriamente assinado pelo proprietário, transportador ou depositário da mercadoria.

Parágrafo único - No caso de recurso de assinatura, o servidor mencionará o fato, que deverá ser testemunhado e assinado por duas pessoas.

Art 42. A coleta deverá ser feita de tal modo que a amostra seja representativa da partida fiscalizada.

§ 1º - As amostras serão colhidas de produtos contidos em embalagem original, não violada, salvo quando de produtos comercializados a granel.

§ 2º - Para produtos embalados, deverá ser observada a seguinte sistemática de amostragem:

I - quando a partida for de até 10 (dez) unidades, coletar 5 (cinco) amostras de unidades diferentes;

II - acima de 10 (dez) até 100 (cem) unidades, de 15% (quinze por cento) da partida, com um número mínimo de 10 (dez) unidades;

III - quando superior a 100 (cem) unidades, de 5% (cinco por cento) da totalidade, com um número mínimo nunca inferior a 15 (quinze) unidades.

§ 3º. - No caso de produto a granel, serão retiradas amostras, de igual quantidade, de diversos pontos da partida, de acordo com o volume.

Art 43. As análises de que trata este Capítulo, quando julgadas necessárias, poderão ser efetuadas através dos órgãos de pesquisa do Ministério da Agricultura, de Universidades ou das Secretarias de Agricultura, previamente credenciados pela DNAGRO.

Art 44. Para cada amostra analisada, o órgão da fiscalização emitirá um Certificado de análise, que concluirá, com base nos resultados analíticos obtidos, se o produto se encontra dentro dos níveis de garantia aprovados pela DNAGRO.

Art 45. Os produtos destinados à alimentação animal, segundo os resultados das análises, são classificados em dentro do padrão, fora do padrão e impróprio para o consumo.

§ 1º - São considerados fora de padrão aqueles produtos cujos resultados da respectiva análise apresentem diferenças para mais ou para menos, sobre os níveis de garantia aprovados pela DNAGRO, assim classificados:

- a) fora de padrão em primeiro grau - 10
- b) fora do padrão em segundo grau - 15%
- c) fora do padrão em terceiro grau - 20%

§ 2º. - São considerados impróprios para o consumo animal os produtos cujos resultados das respectivas análises apresentem:

- a) adulteração ou falsificação.
- b) presença de substâncias tóxicas ou nocivas à saúde dos animais;
- c) qualquer outra matéria estranha à composição do produto, que possa causar prejuízos à economia pecuária.

§ 3º. - Quando a composição do que estabelecem as alíneas " a " e " b " do parágrafo anterior for julgada necessária, recorrer-se-á a provas biológicas.

Art 46. É facultado ao interessado, dentro do prazo de 15 (quinze) dia úteis, a contar da data em que receber o auto de infração, apresentar defesa e requerer à autoridade competente análise pericial.

§ 1º - O Diretor da DNAGRO designará uma Comissão, constituída do técnico que realizou a análise e de mais dois peritos, sendo um indicado pela parte interessada e, o outro, dentre os analistas dos laboratórios oficiais credenciados.

§ 2º - A Comissão terá plena independência de trabalho, podendo analisar, em conjunto ou separadamente, obedecendo sempre aos métodos analíticos consagrados.

§ 3º - A Comissão usará a amostra que se encontrar em poder do interessado, a qual deverá apresentar-se em embalagem inviolável, o que será verificado e atestado pela Comissão.

Art 47. Havendo divergências no resultado, caberá a decisão do Diretor da DNAGRO.

Art 48. As despesas decorrentes da realização da análise pericial correrão por conta do interessado.

CAPÍTULO IX

Das Proibições e Penalidades

Art 49. Fica proibida a comercialização, oferta, distribuição, propaganda e transporte de alimentos para animais, que não atendam as exigências constantes deste Regulamento.

Art 50. Por falta de cumprimento das exigências deste Regulamento, ficarão os infratores sujeitos, sem prejuízo da responsabilidade penal cabível, às seguintes penalidades:

I - Advertência;

II - Multa;

III - Apreensão de matérias-primas e produtos acabados;

IV - Suspensão, impedimento ou interdição temporária ou definitiva de funcionamento;

V - Cassação ou cancelamento do registro ou licenciamento;

VI - Intervenção.

Art 51. O auto de infração deverá ser lavrado em 3 (três) vias, nos termos dos modelos e instruções expedidos, e assinado pelo servidor que verificar a infração e pelo proprietário ou seu representante legal.

§ 1º Sempre que o infrator se negar a assinar o auto de infração, será feita a declaração no mesmo, remetendo-se, posteriormente, uma de suas vias ao estabelecimento infrator.

§ 2º. À vista do auto de infração, será constituído processo administrativo, pelo Diretor Estadual do Ministério da Agricultura, que decidirá sobre a penalidade cabível notificando o infrator.

Art 52. O recurso deve ser interposto, no prazo de 10 (dez) dias, contados do recebimento da notificação, perante a autoridade que houver imposto a penalidade, a qual, depois de o informar, providenciará seu encaminhamento ao Diretor da DNAGRO.

Parágrafo único. No caso de haver multa, o recurso só terá prosseguimento se o interessado o instruir com a prova do respectivo depósito.

Art 53. O valor do depósito ou da multa será recolhido, através de guias próprias, fornecidas ao interessado pelo órgão competente, no prazo de 5 (cinco) dias da data de emissão das respectivas guias, em qualquer Agência do Banco do Brasil S.A., em nome do Fundo Federal Agropecuário (FFAP).

Parágrafo único. Uma das vias da guia de recolhimento ou depósito será devolvida pelo infrator à repartição que a emitiu, até o sexto dia após a sua expedição.

Art 54. A multa será reduzida de 50% (cinquenta por cento), a critério da administração, se o infrator, renunciando ao recurso a recolher dentro do prazo de 10 (dez) dias, contados do recebimento da notificação.

Parágrafo único. Para a expedição da guia, na hipótese prevista neste Artigo, deverá o infrator juntar a notificação com a prova da data de seu recebimento.

Art 55. A pena de advertência será imposta ao infrator primário, atendidas a natureza e a circunstância da infração.

Art 56. A pena de multa, prevista no item II, do artigo 50, será aplicada nos casos de reincidência, observada a seguinte gradação:

I - Multa de até 2 (duas) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975, ao responsável, fabricante ou manipulador de produtos enquadrados na alínea " a ", do parágrafo 1º, do artigo 45 deste regulamento;

II - Multa de até 4 (quatro) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975, ao responsável, fabricante ou manipulador de produtos enquadrados na alínea " b ", do parágrafo 1º, do Artigo 45 deste Regulamento;

III - Multa de até 8 (oito) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975, ao responsável, fabricante ou manipulador de produtos enquadrados na alínea " c ", do parágrafo 1º, do Artigo 45 deste Regulamento;

Art 57. Qualquer produto de que trata este Regulamento, encontrado à venda, sem ter o rótulo registrado na DNAGRO, será apreendido, ficando, ainda, o estabelecimento fabricante ou manipulador, sujeito à multa de até 3 (três) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei número 6.205, de 29 de abril de 1975, aplicada em dobro no caso de reincidência.

§ 1º Dar-se-á, também, a apreensão, sempre que se verificar qualquer das hipóteses previstas no § 2º, do Artigo 45, deste Regulamento.

§ 2º do Infrator será depositário da mercadoria apreendida.

§ 3º Na hipótese de desaparecimento do produto apreendido, o responsável pagará multa equivalente ao valor da mercadoria desaparecida.

Art 58. Os produtos apreendidos poderão ser aproveitados para outros fins, a critério da DNAGRO.

Art 59. Será suspensa por 10 (dez) dias, a fabricação de qualquer produto, se o estabelecimento reincidir, por 3 (três) vezes, na infração prevista no § 1º, alínea "c", do artigo 45, deste Regulamento.

Art 60. Será impedido de funcionar o estabelecimento que não estiver devidamente registrado na DNAGRO.

Parágrafo único. Além da penalidade de que trata este artigo, sofrerá o estabelecimento multa de 10 (dez) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei nº 6.205, de 29 de abril de 1975.

Art 61. Dar-se-á a interdição temporária sempre que o estabelecimento:

I - não apresentar condições higiênico-sanitárias satisfatórias, a critério da DNAGRO;

II - reincidir, por 3 (três) vezes, em qualquer das infrações previstas no § 2º, do artigo 45, deste Regulamento.

Art 62. Dar-se-á a interdição definitiva, que implicará no fechamento do estabelecimento, quando houver:

I - reincidência às infrações previstas no artigo 61;

II - recusa ao cumprimento de penalidade imposta na forma deste Regulamento;

III - violação contumaz de disposições do presente Regulamento.

Art 63. A cassação ou cancelamento do registro ou licenciamento ocorrerá, obrigatoriamente, no caso de interdição definitiva do estabelecimento.

Art 64. Dar-se-á a intervenção quando o estabelecimento concorrer, deliberadamente, para o colapso do abastecimento dos produtos destinados à alimentação animal, de que trata este Regulamento.

Parágrafo único. As condições e o prazo da intervenção serão fixados em ato próprio, baixado pelo Diretor-Geral do DNPA.

Art 65. Compete ao Direto da DNAGRO aplicar as penalidades previstas nos itens III, IV e V, do artigo 50, sendo da competência do Diretor Estadual do Ministério da Agricultura a aplicação das penalidades previstas nos itens I e II, do mesmo artigo.

Art 66. Quando forem verificadas irregularidades nos produtos vendidos em suas embalagens originais, não violadas, serão considerados responsáveis os seus fabricantes ou manipuladores, desde que dentro do prazo de validade aprovado pela DNAGRO.

Art 67. Sempre que julgar necessário, a DNAGRO poderá determinar a substituição ou reforma dos pisos e equipamentos, bem como a raspagem ou pintura das paredes e teto dos estabelecimentos registrados.

Art 68. As criações experimentais e biotérios, quando localizados na mesma área industrial, devem guardar distância e obedecer a cuidados gerais de isolamento, sobretudo em relação às salas de manipulação e aos depósitos de matéria-prima e produtos finais.

CAPÍTULO X

Das Disposições Gerais e Transitórias

Art 69. Será constituída, no Ministério da Agricultura, uma Comissão Especial de Alimentação Animal, composta de representantes da DNAGRO, DDSA, DIPOA, EMBRAPA do Sindicato da Indústria de Rações Balanceadas, do Sindicato da Indústria de Defensivos Animais e de associações de classe de criadores, com as seguintes atribuições:

- a) fornecer subsídios para estabelecimento ou modificação de definições, normas e padrões;
- b) sugerir medidas e providências visando ao aprimoramento da execução do presente Regulamento.

Art 70. Os estabelecimentos que estejam realizando apenas o comércio estadual, na data da publicação deste Regulamento, deverão requerer o seu registro no prazo máximo de 360 (trezentos e sessenta) dias.

Art 71. Os produtos já registrados na DDSA, na data da publicação do presente Regulamento, terão a validade de sua licença assegurada até o final dos seus respectivos prazos.

Art 72. Ficam os estabelecimentos produtores de alimentos para animais obrigados a fornecer, até o dia 15 (quinze) de cada mês, a DNAGRO, através das respectivas Diretorias Estaduais do Ministério da Agricultura, os dados estatísticos de produção do mês anterior.

Art 73. Os trabalhos de inspeção e de fiscalização de produtos, destinados à alimentação animal, serão remunerados pelo regime de preços públicos, fixados pelo Ministro de Estado da Agricultura, que os atualizará sempre que necessário, e disporá sobre o respectivo recolhimento e utilização, na conformidade do disposto nos Artigos 4º e 5º da Lei Delegada nº 8, de 11 de outubro de 1962.

Art 74. As atribuições conferidas, por este Regulamento, aos Diretores Estaduais do Ministério da Agricultura, serão, no Distrito Federal, exercidas pelo Diretor da DNAGRO.

Art 75. Os casos omissos e as dúvidas suscitadas na execução do presente Regulamento serão resolvidos pelo Diretor-Geral do DNPA.

Art 76. Este Regulamento entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Brasília, 6 de janeiro de 1976; 155º da Independência e 88º da República.

ERNESTO GEISEL
Alysson Paulinelli

Este texto não substitui o publicado no D.O.U. de 7.1.1976