

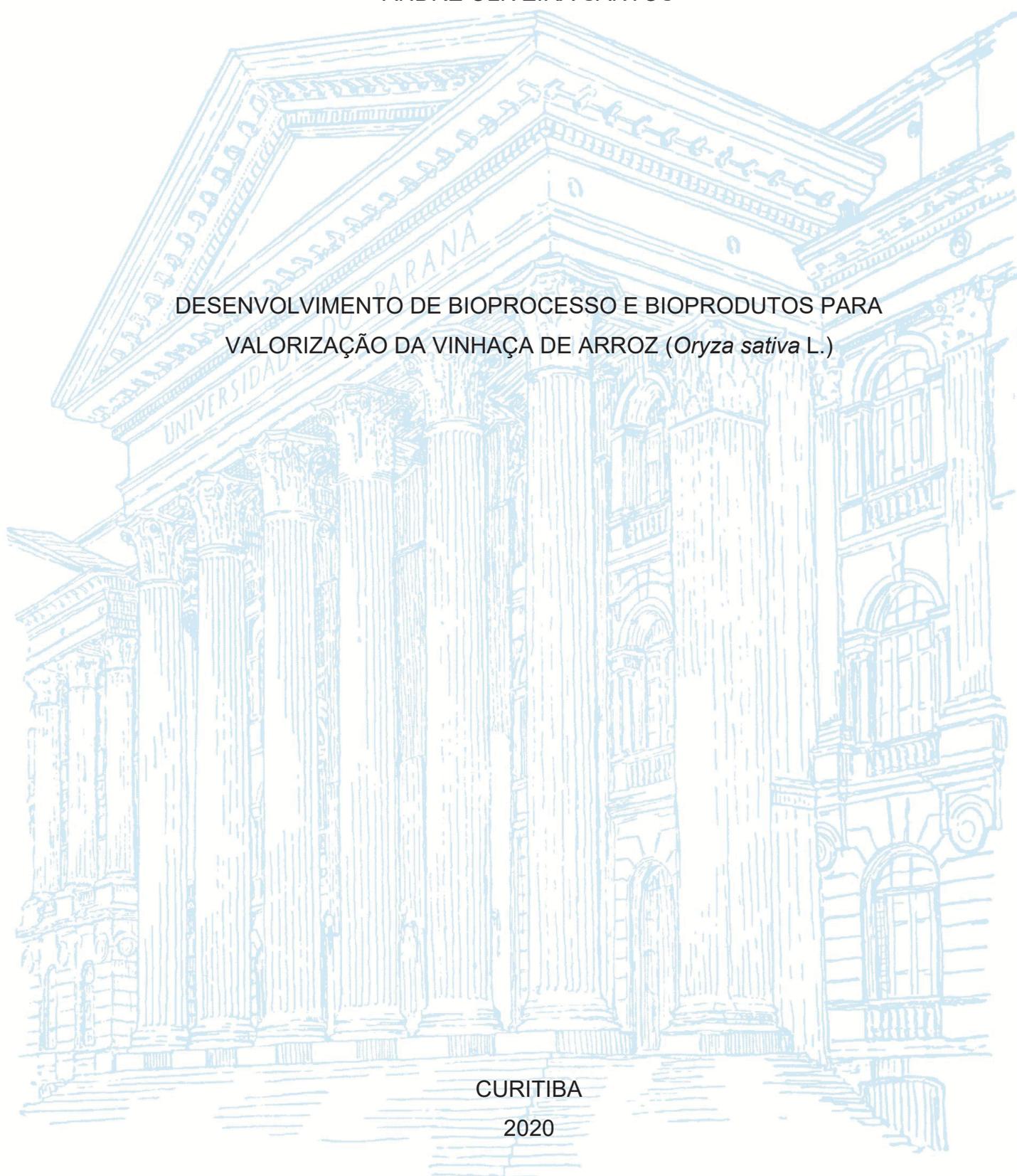
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO E BIOPRODUTOS PARA  
VALORIZAÇÃO DA VINHAÇA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

CURITIBA

2020



ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO E BIOPRODUTOS PARA  
VALORIZAÇÃO DA VINHAÇA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. M. Eugênia Duarte Nosedá

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Jenifer Mota Rodrigues

CURITIBA

2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Santos, André

Desenvolvimento de bioprocesso e bioprodutos para valorização da  
vinhaça de arroz (*Oryza sativa* L.) / André Santos. – CURITIBA, 2020.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Nosedá

Coorientadora: Profa. Dra. M. Eugênia Duarte Nosedá

Coorientadora: Dra. Jenifer Mota Rodrigues

1. Bioestimilantes. 2. Bactérias do Solo. 3. Beneficiamento de Subproduto.  
4. Microalgas. I. Nosedá, Miguel. II. Nosedá, Maria Eugênia. III. Rodrigues,  
Jenifer. IV. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. V. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

**ATA Nº150**

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

No dia trinta de setembro de dois mil e vinte às 14:00 horas, na sala Teams, Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS**, intitulada: **Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos para valorização da vinhaça de arroz (*Oryza sativa* L.)**, sob orientação do Prof. Dr. MIGUEL DANIEL NOSEDA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MIGUEL DANIEL NOSEDA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ADRIANO GONÇALVES VIANA (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA), LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), CRISTINE RODRIGUES (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LEONARDO MAGALHAES CRUZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MIGUEL DANIEL NOSEDA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 09:34:08.0  
MIGUEL DANIEL NOSEDA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 14:04:14.0  
ADRIANO GONÇALVES VIANA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:44:05.0  
LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:59:12.0  
CRISTINE RODRIGUES  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:51:47.0  
LEONARDO MAGALHAES CRUZ  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS** intitulada: **Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos para valorização da vinhaça de arroz (*Oryza sativa* L.)**, sob orientação do Prof. Dr. MIGUEL DANIEL NOSEDA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 09:34:08.0  
MIGUEL DANIEL NOSEDA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 14:04:14.0  
ADRIANO GONÇALVES VIANA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:44:05.0  
LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:59:12.0  
CRISTINE RODRIGUES  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
01/10/2020 10:51:47.0  
LEONARDO MAGALHÃES CRUZ  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## RESUMO

Considerando as proteínas do arroz (*Oryza sativa* L.) e seus extratos hidrolisados como moléculas de interesse comercial com possibilidade de integrar vários bioprocessos em distintos segmentos industriais, o presente trabalho objetivou obter produtos com potencial biotecnológico a partir do hidrolisado de vinhaça do álcool de arroz, avaliando o potencial bioestimulante, atuação como extrato base para meios de cultura de *Azospirillum brasilense* e *Desmodesmus subspicatus*, e também como bioestimulante rico em fitormônios oriundos de prévia fermentação do hidrolisado com *A. brasilense*, além do potencial antioxidante. Para a obtenção dos hidrolisados, foi desenvolvido, em parceria com a Bio4 Soluções Biotecnológicas, um processo de imobilização enzimática inovador e de baixo custo, utilizando um suporte lignocelulósico de tecnologia própria, no qual enzimas livres e em combinação foram adsorvidas no material e aprisionadas com quitosana 1%. Este processo de imobilização garantiu eficácia na manutenção da atividade enzimática entre 53–78%. Após processo de imobilização de proteases, a vinhaça de arroz foi submetida a processos de digestão enzimática, seguido por associação ou fermentação com *A. brasilense*, gerando os bioprodutos HV (hidrolisado de vinhaça de arroz) HVF (hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado com *A. brasilense*), e HVI (hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com *A. brasilense*). Resultados dos bioensaios com sementes de milho (*Zea mays* L.) mostraram que HV (2,5% v/v) obteve resultados superiores aos obtidos para o controle positivo, quanto ao comprimento, volume e diâmetro das raízes. Resultados dos bioensaios com plantas de alface (*Lactuca sativa*) mostraram ganho expressivos em área foliar, peso seco e enraizamento com aplicação de HVI (1 e 2,5% v/v), HVF (1:4 e 1:8) e HV (5% v/v), respectivamente. Avaliação dos meios de cultura formulados para o cultivo de *A. brasilense*, mostraram que meio contendo HV (20% v/v; lac-50 mM) obteve resultados significativamente melhores que o controle positivo. Quantificação de fitormônios por HPLC-MS demonstraram que a utilização dos meios HV10 (B|C) e HV40 (B|C) estimularam a produção de ácido indolacético, zeatina e zeatina ribosídeo pelo micro-organismo. Formulação de meio de cultura para cultivo da microalga *D. subspicatus* mostraram que meio contendo HV (20% v/v) estimulou a produção de biomassa microalgal, obtendo resultados superiores aos apresentados com o meio sintético CHU. Avaliação da inibição dos radicais livres, pelo método de DPPH, mostraram que os hidrolisados de vinhaça obtidos com as enzimas HP e 7089 apresentam potencial antioxidante superior ao controle positivo BHT. Testes de detecção da presença de quebras de fita única (SSB) de DNA (teste do cometa) mostraram que os hidrolisados de vinhaça obtidos com a enzima P100000, gerou resultado acima do controle neutro, demonstrando assim capacidade de neutralização de radicais livres. Todos os resultados em conjunto 112

Palavras-chave: Vinhaça de arroz. Imobilização enzimática. Hidrolisado proteico. Atividade bioestimulante. *A. brasilense*. Potencial antioxidante.

## ABSTRACT

Considering rice (*Oryza sativa* L.) proteins and their hydrolyzed extracts as molecules of commercial interest with the possibility of integrating various bioprocesses in different industrial segments, the present work aimed to obtain products with biotechnological potential from the hydrolysate of rice alcohol vinasse, evaluating the biostimulant potential, its role as a base extract for culture media of *Azospirillum brasilense* and *Desmodesmus subspicatus*, as well as a biostimulant rich in phytohormones derived from previous fermentation of the hydrolysate with *A. brasilense*, in addition to its antioxidant potential. To obtain the hydrolysates, an innovative and low-cost enzymatic immobilization process was developed in partnership with Bio4 Soluções Biotecnológicas, using a proprietary lignocellulosic support, in which free and combined enzymes were adsorbed on the material and entrapped with 1% chitosan. This immobilization process ensured effectiveness in maintaining enzymatic activity between 53–78%. After protease immobilization, rice vinasse was subjected to enzymatic digestion processes, followed by association or fermentation with *A. brasilense*, generating the bioproducts HV (rice vinasse hydrolysate), HVF (rice vinasse hydrolysate fermented with *A. brasilense*), and HVI (rice vinasse hydrolysate associated with *A. brasilense*). Results from bioassays with maize (*Zea mays* L.) seeds showed that HV (2.5% v/v) obtained superior results compared to the positive control, regarding root length, volume, and diameter. Bioassays with lettuce (*Lactuca sativa*) plants showed significant gains in leaf area, dry weight, and rooting with the application of HVI (1 and 2.5% v/v), HVF (1:4 and 1:8), and HV (5% v/v), respectively. Evaluation of culture media formulated for the cultivation of *A. brasilense* showed that medium containing HV (20% v/v; lac-50 mM) obtained significantly better results than the positive control. Quantification of phytohormones by HPLC-MS demonstrated that the use of HV10 (B|C) and HV40 (B|C) media stimulated the production of indoleacetic acid, zeatin, and zeatin riboside by the microorganism. Formulation of culture medium for the cultivation of the microalga *D. subspicatus* showed that medium containing HV (20% v/v) stimulated the production of microalgal biomass, obtaining superior results compared to the synthetic CHU medium. Evaluation of free radical inhibition by the DPPH method showed that vinasse hydrolysates obtained with HP and 7089 enzymes have antioxidant potential superior to the positive control BHT. Tests detecting the presence of single-strand DNA breaks (SSB) (comet assay) showed that vinasse hydrolysates obtained with the P100000 enzyme generated results above the neutral control, thus demonstrating the ability to neutralize free radicals. All results together demonstrate the biotechnological application potential of rice vinasse hydrolysates, being a promising source for the production of biostimulant products, antioxidants, and as culture medium.

**Keywords:** Rice vinasse; Enzymatic immobilization; Protein hydrolysate; Biostimulant activity; *Azospirillum brasilense*; Antioxidant potential.

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

μmol – Micro moles

ABA - Cis, trans-ácido abscísico

AIA - Ácido Indolacético

ANOVA - Análise da Variância

aW - Atividade de água

AZO - *Azospirillum*

BA - Benzeladenina

BAR - Benzeladenosina

BHT - Di-terc-butil metil fenol

COD - Demanda Química de Oxigênio

Cys - Resíduo de Cisteína

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DNAs - Ácidos Desoxirribonucleicos

DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

DZ - Dihidrozeatina

DZR - Dihidrozeatina Ribosídeo

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GA3 - Ácido Giberélico

HBTP – Complexo enzimático formulado pelo autor

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HV - Hidrolisado de Vinhaça

HVF - Vinhaça de Arroz Fermentada

HVI - Vinhaça de Arroz Inoculada com *Azospirillum brasiliense*

iP - Isopentiniladenina

KR - Cinetina Ribosídeo

MAPA - Ministério da Agricultura

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MIXs – Mistura (*Mixture*) de proteases

MSR - Metodologia de Superfície de Resposta

PBS - Bioestimulantes de Plantas

PGPR - Rizobactérias Protetoras de Crescimento de Plantas

PHs - Hidrolisados de Proteínas

TCA - Ácido Tricloroacético

TI - Testemunha Negativa Inoculada

TN - Testemunha Negativa

TP - Testemunha Positiva em Concentração Baixa

TPH - Testemunha Positiva em Concentrações Altas

TPHI - Testemunha Positiva de Alta Concentração Inoculada

TPI - Testemunha Positiva Inoculada

tZ - Trans-zeatina

U - Unidades de Atividade Enzimática

UE - União Europeia

UFCs - Unidades Formadores de Colônia

UHPLC-MS - Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas

UV - Ultra Violeta

VIS - Visível

ZR - Trans-Zeatina Ribosídeo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 OBJETIVOS .....	9
1.1.1 Objetivo geral .....	9
1.1.2 Objetivos específicos.....	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1 VINHAÇA DE ARROZ .....	11
2.2 BIOESTIMULANTES VEGETAIS .....	13
2.3 UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS E SÍNTESE DE HORMÔNIOS VEGETAIS	18
2.4 AÇÃO ANTIOXIDANTE DE MOLÉCULAS PRESENTES NO ARROZ .....	21
2.5 PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNAS.....	25
2.5.1 Proteases .....	26
2.5.1.1 Classificação de proteases .....	29
2.5.2 Imobilização Enzimática .....	31
2.5.2.1 Adsorção Seguida de Envolvimento por Membrana.....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 MATÉRIA PRIMA: VINHAÇA DO ÁLCOOL DE ARROZ .....	36
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE ARROZ BRUTA.....	36
3.2.1 Determinação dos sólidos totais e percentual de umidade .....	36
3.2.2 Determinação do pH e Atividade de água (Aw).....	37
3.2.3 Determinação do Teor de Cinzas .....	37
3.2.4 Determinação de Açúcares Redutores.....	38
3.2.5 Determinação de Lipídios Totais .....	38
3.2.6 Determinação de Proteínas Totais .....	39
3.2.7 Análise de Íons .....	39
3.3 ENZIMAS UTILIZADAS E FORMULAÇÃO DE MIXS .....	40
3.4 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLISADOS DE VINHAÇA COM MIXS ENZIMÁTICOS .....	41
3.5 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
3.6 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DAS ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS .....	42
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	45

3.8 DELINEAMENTO DO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 <sup>3</sup> (DCCR) PARA OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	45
3.9 OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DE VINHAÇA DE ARROZ .....	46
3.9.1 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz (HV) .....	47
3.9.2 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz Fermentado com <i>Azospirillum brasilense</i> (HVF) .....	48
3.9.3 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz em Associação com <i>Azospirillum brasilense</i> (HVI).....	48
3.10 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULANTE .....	49
3.10.1 Bioensaios com sementes de Milho ( <i>Zea mays</i> L.) .....	49
3.10.2 Bioensaios com alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) .....	50
3.10.2.1 Teste de crescimento de plantas de alface utilizando os produtos HV, HVF, HVI como fertilizantes foliares .....	50
3.10.2.2 Teste de enraizamento de plantas de alface utilizando os produtos HV e HVF	51
3.10.2.3 Testes de germinação de sementes de alface com os produtos HV, HVI e HVF	51
3.11 MEIO PARA CULTIVO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> À BASE DE HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ E MELAÇO DE CANA .....	52
3.11.1 Contagem de UFC das culturas de <i>A. brasilense</i> nos meios de cultivo formulados.....	52
3.11.2 Comparação do crescimento de <i>A. brasilense</i> em meio NFb suplementado com HV .....	52
3.11.3 Avaliação da suplementação de HV com fonte de carbono, nitrogênio e fósforo para o crescimento de <i>A. brasilense</i> .....	53
3.11.4 Substituição da fonte de carbono por melaço de cana.....	54
3.12 QUANTIFICAÇÃO DE FITORMÔNIOS, EM MEIOS À BASE DE HIDROLISADO DE VINHAÇA FERMENTADOS, POR CROMATOGRAFIA DE ULTRA ELEVADA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-MS) .....	54
3.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DE VINHAÇA DE ARROZ	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE ARROZ BRUTA.....	58
4.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	60

4.3 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLIZADOS DE VINHAÇA COM MIXS ENZIMÁTICOS .....	64
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	67
4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	
69	
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS DA VINHAÇA DE ARROZ	
71	
4.7 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> EM MEIO NFB SUPLEMENTADO COM HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ .....	73
4.8 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HV COM FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E FÓSFORO PARA CRESCIMENTO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> .....	74
4.9 SUBSTITUIÇÃO DA FONTE DE CARBONO DE LACTATO PARA MELAÇO DE CANA	76
4.10 DEFINIÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> E DETECÇÃO DE FITORMÔMIOS NO MEIO.....	78
4.11 EFEITO DO HIDROLISADO DA VINHAÇA DE ARROZ (HV) NO ENRAIZAMENTO DE MILHO.....	84
4.11.1.1 Avaliação do crescimento de plantas de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) utilizando HV, HVI e HVF como fertilizantes foliares .....	87
89	
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>PRODUTO DO PRESENTE TRABALHO DE TESE .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor de arroz fora do continente asiático, ocupando a nona colocação mundial. Segundo acompanhamento de safras do Levantamento Sistemático Agrícola (LSPA), do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), na safra 2017/2018, a produção total de arroz foi 12,3 milhões de toneladas, colhidas em 2,1 milhões de hectares (CONAB, 2018). O arroz branco, após passar por inúmeros processos, tanto de preparo do grão, quanto de logística, se torna o principal componente da alimentação de milhões de brasileiros (EMBRAPA, 2004).

No processo de beneficiamento do arroz, o farelo de arroz se destaca como importante subproduto agroindustrial rico em nutrientes, o qual vem sendo subaproveitado no montante de mais de um milhão de toneladas/ano (IRGA, 2008, CHAUD; ARRUDA; DE ALMEIDA FELIPE, 2009). Sua obtenção se dá na etapa de brunição, uma das etapas do processo de beneficiamento do arroz, onde o arroz já descascado é raspado por maquinário com pedras abrasivas que retiram o farelo (composto pelo germe e película do grão), gerando o arroz polido (CHAUD; ARRUDA; DE ALMEIDA FELIPE, 2009).

As aplicações do farelo de arroz são diversas, incluindo usos na indústria farmacêutica de ponta com peptídeos bioativos na área dos cosméticos, na área da saúde por meio de moléculas antioxidantes, composição nutricional de meios de cultura, produção de óleo, produção de insumos para alimentação animal, suplementos para humanos e produção de fertilizantes. Além disso, pode ser incluído como substrato na cadeia produtiva do álcool de cereal, passando por processo de cozimento e hidrólise enzimática do amido nele contido, formando um mosto fermentescível rico em glucose pode ser metabolizado por leveduras sucroalcooleiras, gerando assim um tipo de álcool mais valorizado para determinados fins comerciais.

Durante o processo de destilação deste álcool forma-se a vinhaça de arroz (parte não volátil retida pós destilação). A riqueza de nutrientes da vinhaça de arroz, consiste principalmente em fontes de vitaminas, minerais e proteínas. Seu aproveitamento biotecnológico abre perspectivas econômicas de maior valor agregado para sua utilização em diferentes segmentos industriais. Embora a literatura não contemple com abundância as aplicações da vinhaça de arroz, as

proteínas presentes no farelo, em sua grande parte, são preservadas durante o processo de fabricação do álcool, já que o processo fermentativo consumirá os açúcares livres provenientes do amido

Por essa razão torna-se relevante o desenvolvimento de um bioprocesso que agrega valor a esse subproduto, envolvendo despolimerização parcial das proteínas presentes na vinhaça do arroz, por meio de proteases, para obtenção de bioprodutos ricos em peptídeos e aminoácidos, biomoléculas comercialmente atrativas. Adicionalmente, a pesquisa por novas moléculas bioativas produzidas a partir de vinhaça de arroz permite o conhecimento de novas fontes com potencial biológico provenientes de um subproduto de baixo custo e alta disponibilidade no Brasil.

Tendo em vista que a agregação de valor para subprodutos da indústria é uma prática em constante crescimento e desenvolvimento, a utilização da vinhaça de arroz produzida no sul do país como matéria prima na elaboração de bioprodutos de valor agregado é estratégia viável para enriquecer a cadeia produtiva de arroz no país.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Obter produtos com potencial biotecnológico (fertilizantes, meio de cultura e fertilizantes) a partir do hidrolisado de vinhaça do arroz (*Oryza ativa* L.).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a vinhaça de arroz;
- Submeter vinhaça de arroz a tratamento proteolítico;
- Caracterizar os produtos da hidrólise enzimática;
- Otimizar o processo de hidrólise enzimática;
- Avaliar a celulose como suporte de imobilização enzimática;
- Imobilizar complexos enzimáticos para geração de Aminoácidos;

- Avaliar o potencial dos hidrolisados da vinhaça como biofertilizante organomineral;
- Avaliar o potencial do hidrolisado da vinhaça como meio de cultura para bactérias;
- Avaliar o potencial do hidrolisado da vinhaça como meio de cultura para microalgas;
- Determinar atividade antioxidante dos hidrolisados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VINHAÇA DE ARROZ

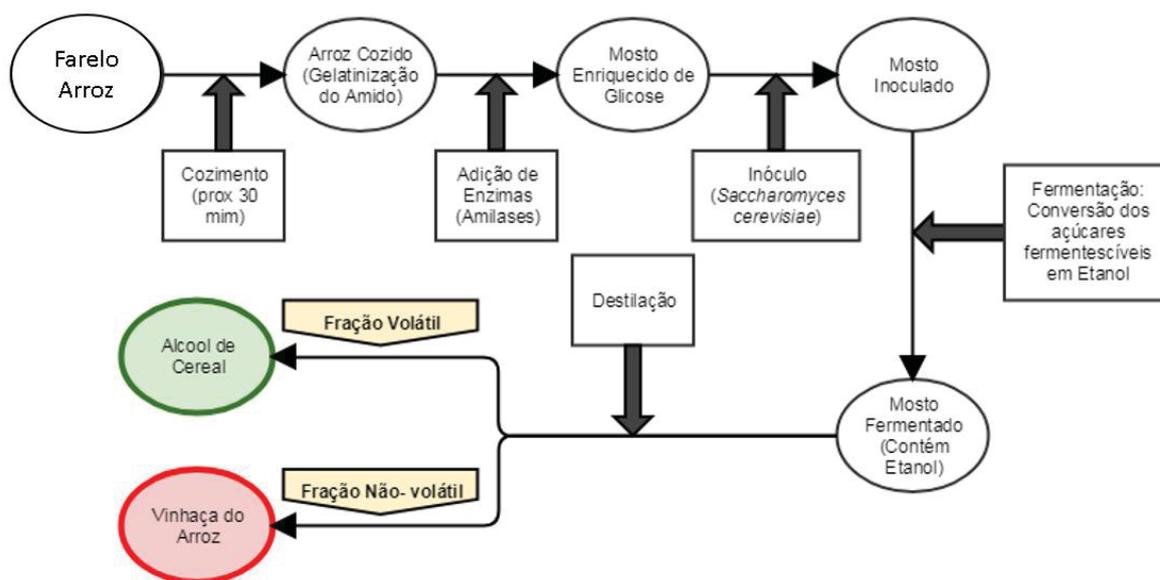
Bioetanol produzido a partir de biomassas de cereais são considerados combustíveis atrativos por reduzir a dependência do petróleo e diminuir as emissões de dióxido de carbono (GNANSOUNOU; DAURIAT, 2011; HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). A superprodução de cereais, melhoramento da tecnologia avançada na produção de sementes, aprimoramento de técnicas de cultivo, semeadura, colheita e armazenamento, permitiram o uso dos cereais como fonte de energia alternativa, explorando o potencial energético do amido presente nos grãos (GAWANDE; PATIL, 2014).

Um dos principais custos na produção de bioetanol e outras bio-commodities é o substrato utilizado na fermentação. Por essa razão, faz-se necessário a utilização de culturas energéticas de baixo custo, resíduos de alimentos, resíduos processados da indústria alimentícia, ou então resíduos agrícolas e florestais (FAVARO; CAGNIN; BASAGLIA; PIZZOCCHERO *et al.*, 2017).

O Brasil situa-se em 9º lugar dentre os países que produzem arroz no mundo, com uma produção correspondente a 1,5% da mundial (SILVA; WANDER; FERREIRA, 2021). Anualmente, milhões de toneladas de subprodutos derivados do processo e beneficiamento do arroz são desperdiçados, incluindo casca, farelo e grãos quebrados, imaturos ou descolorados (ABBAS; ANSUMALI, 2010). Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) o mercado mundial de arroz totalizou cerca de 745 milhões de toneladas em 2014, gerando cerca de 50 milhões de toneladas de farelo de arroz, 45 milhões de toneladas de grãos quebrados, 30 milhões de toneladas de grãos imaturos e 7 milhões de toneladas de grãos descoloridos (FAO, 2020).

A fim de diminuir a perda dessas frações que não chegam à mesa do consumidor, esses grãos quebrados ou defeituosos do arroz passaram a ser utilizados na indústria alcooleira para produção de bioetanol, no entanto, um novo resíduo ou subproduto foi gerado, denominado vinhaça do álcool de arroz (FIGURA 1). A produção de etanol a partir de outras fontes ricas em carboidratos simples (beterraba, cana-de-açúcar, melado etc.), oligopolissacarídeos (milho, trigo, arroz, mandioca etc.) e/ou material celulósico (bagaço de cana, colheita e resíduos de madeira) produzem também um volume considerável de vinhaça. Em média, 10 a 15 litros de vinhaça são gerados por litro de etanol produzido, dependendo do equipamento da destilaria (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

FIGURA 1 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DA VINHAÇA DE ARROZ NA CADEIA DO ALCOOL DE CEREAL



FONTE: O AUTOR

A vinhaça é um resíduo rico em nutrientes (DOS SANTOS; DA SILVA; DA LUZ COSTA; SCHEIDT *et al.*, 2013). Sua composição e características são dependentes das matérias-primas utilizadas no processo de produção do álcool. De modo geral, a vinhaça caracteriza-se por ser uma pasta de baixo pH (entre 3,5–5,0), de coloração marrom escura, odor forte, e alto conteúdo orgânico (ESPANA-GAMBOA; MIJANGOS-CORTES; BARAHONA-PEREZ; DOMINGUEZ-MALDONADO *et al.*, 2011). Os açúcares são consumidos em sua grande parte durante o processo

de fermentação do mosto, no entanto, muitas outras moléculas, constituintes da matéria-prima, permanecem presentes enriquecendo a vinhaça resultante. O arroz branco possui em média 8% de teor de proteínas (SHIH; DAIGLE, 2000).

Ao final do processo de produção do álcool de arroz, a vinhaça de arroz resultante possuirá uma maior concentração de matéria orgânica do que a vinhaça convencional de cana-de-açúcar (pobre em proteínas). Proteínas do arroz (presentes também na vinhaça do álcool de arroz) são reconhecidas como altamente nutritivas, não alergênicas e são particularmente saudáveis para o consumo humano (MORITA; KIRIYAMA, 1993).

No Brasil a utilização da vinhaça em solo agrícola por meio da fertirrigação é uma prática comum. Este uso é uma maneira barata de descartar tais subprodutos, no entanto, a utilização na forma bruta pode comprometer a qualidade do solo ou levar à salinização dos lençóis freáticos (DOS SANTOS; DA SILVA; DA LUZ COSTA; SCHEIDT *et al.*, 2013; HASSUDA, 1989). Se tratada adequadamente, pode-se reduzir os níveis de matéria orgânica da vinhaça, adequar o pH, incluir moléculas de interesses agrícolas, como aminoácidos e fitormônios, podendo assim facilmente ser utilizada como biofertilizante, atuando como alternativa aos fertilizantes químicos largamente utilizados na agricultura atual (PINTO, 1999).

## 2.2 BIOESTIMULANTES VEGETAIS

Em face da crescente população mundial, aumento da escassez de recursos e os desafios da mitigação das mudanças climáticas, há uma crescente necessidade de adaptação na agricultura e nos sistemas agrícolas em direção a práticas que levam à “Intensificação Sustentável” (TOWNSEND; RAMSDEN; WILSON, 2016; WILSON, 2014). Além disso, prevê-se que a mudança climática levando a pressões abióticas, como o aumento das secas e outros estresses correlacionados à temperatura mais alta, aumentem em sua severidade e frequência (MYERS, 2017; ROSENZWEIG; ELLIOTT; DERYNG; RUANE *et al.*, 2014), comprometendo seriamente a produtividade das culturas (COLEMAN-DERR; TRINGE, 2014). De fato, o estresse abiótico pode reduzir o rendimento das colheitas em mais de 60% para as principais culturas (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK; GROVER; KAPOOR; LAKSHMI; AGARWAL *et al.*, 2001; SINGHAL; JAN; AZAM; HAQ, 2016; TREVISAN; MANOLI; QUAGGIOTTI, 2019).

Na última década, o interesse em bioestimulantes de plantas (PBs) tem crescido, impulsionado pelo crescente interesse dos pesquisadores, indústria privada e agricultores na integração destes produtos na matriz de ferramentas ecologicamente corretas que garantem melhor safra, produtividade e estabilidade de rendimento sob estresses ambientais (COLLA; CARDARELLI; BONINI; ROUPHAEL, 2017; ERTANI; SCHIAVON; MUSCOLO; NARDI, 2013; HALPERN; BAR-TAL; OFEK; MINZ *et al.*, 2015; PAUL; SORRENTINO; LUCINI; ROUPHAEL *et al.*, 2019; ROUPHAEL; CARDARELLI; BONINI; COLLA, 2017; ROUPHAEL; SPÍCHAL; PANZAROVÁ; CASA *et al.*, 2018; YAKHIN; LUBYANOV; YAKHIN; BROWN, 2017).

Baseado no novo regulamento da União Europeia, os PBs são definidos como "produtos que estimulam os processos fisiológicos das plantas independentemente do seu teor de nutrientes, melhorando uma ou mais das seguintes características da planta, de sua rizosfera ou filosfera: eficiência do uso de nutrientes, tolerância ao estresse abiótico, qualidade da cultura, disponibilidade de nutrientes confinados no solo e rizosfera, humificação e degradação de compostos orgânicos no solo" (Comissão, 2016; PAUL; SORRENTINO; LUCINI; ROUPHAEL *et al.*, 2019). No Brasil, o Ministério da Agricultura (MAPA) define, pelo Decreto n. 4954 de 2004, biofertilizante como "produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante".

Os hidrolisados de proteínas (PHs), uma importante categoria de PBs, são principalmente produzidos por hidrólise química (com ácidos fortes ou alcalis) e/ou hidrólise enzimática de proteínas contidas em biomassas vegetais ou subprodutos agroindustriais de origem animal ou vegetal (COLLA; NARDI; CARDARELLI; ERTANI *et al.*, 2015). Os PHs enzimaticamente produzidos a partir de biomassa vegetal foram introduzidos recentemente e representam menos de 10% do total do mercado de PHs que atualmente é dominado pelos produtos derivados da hidrólise química de proteínas animais (COLLA; NARDI; CARDARELLI; ERTANI *et al.*, 2015). Do ponto de vista ambiental e econômico, PHs obtidos a partir de subprodutos agroindustriais representam uma solução sustentável para o problema do desperdício de sua produção, gerando produtos com maior valor agregado e minimizando os impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado de biomassas residuais (BAGLIERI; CADILI; MONTERUMICI; GENNARI *et al.*, 2014; KASPARKOVA; KOLOMAZNIK;

BURKETOVA; SASEK *et al.*, 2009; PECHA; FÜRST; KOLOMAZNÍK; FRIEBROVÁ *et al.*, 2012).

Cabe destacar que além de aminoácidos e peptídeos, os PHs contêm outros compostos que podem contribuir para a ação bioestimulante e desempenham um papel importante no metabolismo energético e defesas contra estresse oxidativo. Estes compostos incluem lipídeos, carboidratos, fenólicos, elementos minerais, fitohormônios e outros compostos orgânicos como poliaminas (COLLA; NARDI; CARDARELLI; ERTANI *et al.*, 2015).

Bioestimulantes à base de PHs podem ser aplicados a qualquer variedade de vegetais através de aplicação foliar ou encharcamento de solo/substrato em qualquer tipo de cultura vegetal. Aminoácidos e peptídeos, presentes nos PHs, são absorvidos pelas raízes e folhas em processos fisiológicos de transporte de nutrientes diferentes, considerando-se o tempo e a forma do deslocamento dos nutrientes (NACHTIGALL; NAVA, 2010). Os bioestimulantes pulverizados de maneira foliar atingem as células do mesófilo por absorção através da cutícula, células epidérmicas e estômatos (FERNÁNDEZ; EICHERT, 2009), enquanto na aplicação via encharcamento do solo, a absorção ocorre por meio das células epidérmicas da raiz e é redistribuída através do xilema (PAUL; SORRENTINO; LUCINI; ROUPHAEL *et al.*, 2019; SUBBARAO; AFTAB HUSSAIN; GANESH, 2015).

É necessário pontuar que a disponibilidade de aminoácidos e peptídeos para as raízes podem ser fortemente reduzida pela atividade microbiana do solo (WILSON, 2014). Um estudo conduzido por Moe (2013) mostrou que a microbiota do solo consumiu todo o conteúdo de aminoácidos disponíveis em apenas 12 h, reduzindo assim a absorção de aminoácidos e peptídeos pelas raízes. O uso de aminoácidos marcados com isótopos de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  em trigo e tomate mostraram que as raízes absorvem apenas 6–25% dos aminoácidos aplicados externamente, enquanto a aplicação foliar garantiu internalizada nos tecidos da planta de 48–52% da carga de aminoácidos aplicada (MOE, 2013; UMEMIYA; FURUYA, 2001).

Colla *et al.* (2017) e Lucini *et al.* (2020) resumiram os principais mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na ação bioestimulante de PHs. Direta e indiretamente os mecanismos incluem: 1. estimulação do metabolismo C e N por meio de enzimas-chave, 2. aumento das defesas antioxidante, 3. acionamento de atividades semelhantes a hormônios e, 4. modulação do aparelho do sistema

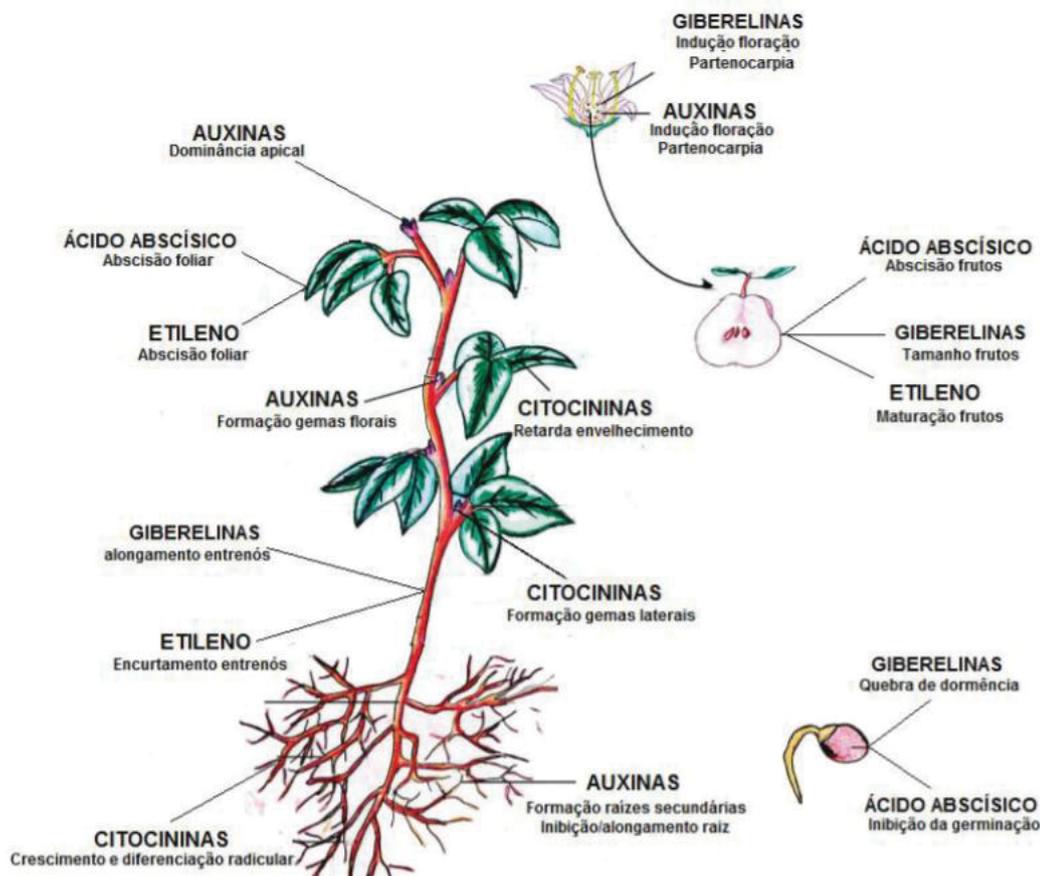
radicular, aumentando assim a absorção/assimilação de nutrientes e, conseqüentemente, aumentando a produtividade da cultura.

Diversos estudos têm mostrado a melhora do desempenho de culturas hortícolas em decorrência da utilização de PHs, sendo observado aumento de brotamentos, biomassa de raízes e produtividade (CARILLO; COLLA; FUSCO; DELL'AVERSANA *et al.*, 2019; CARUSO; TRAU; MÖHWALD; RENNEBERG, 2000; ERTANI; NARDI; FRANCIOSO; SANCHEZ-CORTES *et al.*, 2019; LUCINI; MIRAS-MORENO; ROUPHAEL; CARDARELLI *et al.*, 2020; ROUPHAEL; COLLA; GIORDANO; EL-NAKHEL *et al.*, 2017).

PHs são aplicados no tratamentos de sementes, especialmente para culturas de campo, como trigo, milho e soja (ROUPHAEL; SPÍCHAL; PANZAROVÁ; CASA *et al.*, 2018). A aplicação de PHs estimula a absorção de macro e micronutrientes e ajuda no rápido crescimento das plantas e no acúmulo de biomassa, interferindo nas atividades metabólicas de carbono e nitrogênio (COLLA; CARDARELLI; BONINI; ROUPHAEL, 2017; ERTANI; CAVANI; PIZZEGHELLO; BRANDELLERO *et al.*, 2009; PAUL; SORRENTINO; LUCINI; ROUPHAEL *et al.*, 2019). Portanto, melhorar as características metabólicas e fisiológicas por meio de tratamentos com PHs fornece novas estratégias para maximizar a produção de biomassas (DUDITS; TÖRÖK; CSERI; PAUL *et al.*, 2016).

Os PHs também podem interferir na produção de fitohormônios de plantas, influenciando assim cadeias metabólicas devido a presença de peptídeos específicos e precursores de fitohormônios, como é o caso do triptofano (COLLA; ROUPHAEL; CANAGUIER; SVECOVA *et al.*, 2014). Diversos trabalhos científicos relatam que a aplicação de hidrolisados proteicos derivados de plantas provocaram atividades semelhantes às auxinas e giberelinas (FIGURA 2), promovendo melhora do crescimento, enraizamento e ganho de peso seco de diferentes culturas (CARILLO; COLLA; FUSCO; DELL'AVERSANA *et al.*, 2019; ERTANI; NARDI; FRANCIOSO; SANCHEZ-CORTES *et al.*, 2019; LUCINI; MIRAS-MORENO; ROUPHAEL; CARDARELLI *et al.*, 2020). Além disso, vários peptídeos bioativos, exógenos, foram identificados com atividades semelhantes a hormônios e estimulantes, participando de inúmeras rotas metabólicas essenciais para as plantas (ITO; NAKANOMYO; MOTOSE; IWAMOTO *et al.*, 2006; KONDO; SAWA; KINOSHITA; MIZUNO *et al.*, 2006).

FIGURA 2 – PRINCIPAIS EFEITOS DOS HORMÔNIOS VEGETAIS NAS PLANTAS



FONTE: (SILVA)

Diferentes estudos mostram que a aplicação de PHs eleva a resistência de cultivares, no que diz respeito a estresse térmico, hídrico, salino, de alcalinidade ou deficiência de nutrientes (CASADESÚS; PÉREZ-LLORCA; MUNNÉ-BOSCH; POLO, 2020; ERTANI; NARDI; FRANCIOSO; SANCHEZ-CORTES *et al.*, 2019; LUCINI; ROUPHAEL; CARDARELLI; BONINI *et al.*, 2018; LUCINI; ROUPHAEL; CARDARELLI; CANAGUIER *et al.*, 2015; VISCONTI; DE PAZ; BONET; JORDÀ *et al.*, 2015; ZHU; ZHOU; QIAN, 2006). Os benefícios máximos dos PHs podem ser obtidos em diferentes níveis de dosagens e são dependentes da espécie do cultivar, condições ambientais, tempo e modo de aplicação (raiz ou foliar), e permeabilidade foliar ao bioestimulante (ERTANI; PIZZEGHELLO; FRANCIOSO; SAMBO *et al.*, 2014; KAUFFMAN; KNEIVEL; WATSCHKE, 2007; KUNICKI; GRABOWSKA; SEKARA; WOJCIECHOWSKA, 2010). Uma vez que os bioestimulantes geralmente são foliarmente aplicados é crucial que eles sejam compostos por moléculas de baixo peso

molecular, para que a absorção na parte aérea da planta seja eficiente (PECHA; FÜRST; KOLOMAZNÍK; FRIEBROVÁ *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, os PHs derivados de plantas produzidos por hidrólise enzimática têm recebido maior atenção de agricultores devido ao seu alto valor agronômico e à falta de limitação de sua aplicação em lavouras organicamente produzidas (COLLA; ROUPHAEL; CANAGUIER; SVECOVA *et al.*, 2014; NARDI; PIZZEGHELLO; SCHIAVON; ERTANI, 2016). Vale lembrar que por razões de segurança alimentar, a União Europeia proibiu, por meio do regulamento 354/2014, a aplicação de produtos derivados de origem animal em partes comestíveis de cultivos orgânicos (COLLA; ROUPHAEL; CANAGUIER; SVECOVA *et al.*, 2014).

### 2.3 UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS E SÍNTESE DE HORMÔNIOS VEGETAIS

O termo rizobactérias, introduzido por Kloepper (1978), refere-se à colônias bacterianas benéficas que quando cultivadas em associação com as plantas hospedeiras, podem estimular o crescimento do hospedeiro (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). O atual conceito de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR) determina que as cepas bacterianas devem cumprir pelo menos dois de três critérios, sendo eles: colonização massiva, estimulação do crescimento das plantas e controle de estresse físico (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; VESSEY, 2003; WELLER; RAAIJMAKERS; GARDENER; THOMASHOW, 2002). Além disso, as PGPB também exercem um papel no controle de fitopatógenos. Conseqüentemente, em razão destas características, as PGPB são promissores biofertilizantes. Elas podem ser classificadas de acordo com o tipo de interação com as plantas: simbióticas, que vivem dentro das plantas e trocam metabólitos com elas diretamente, e rizobactérias de vida livre, que vivem fora das células das plantas. A maioria das bactérias simbióticas permanecem no espaço intercelular da planta hospedeira, mas algumas bactérias são capazes de formar interações mutualísticas e penetrar nas células das plantas (COTTA; VEJAN; ABDULLAH; KHADIRAN; ISMAIL *et al.*, 2016).

PGPB podem ser classificados em direto ou indireto, de acordo com a forma de como auxiliam o fito-crescimento. Os mecanismos indiretos são compostos por ações de biocontrole, que abrangem a redução no impacto de doenças, ação antibiótica, indução do sistema de resistência e a competição por nutrientes. Por outro lado, os mecanismos diretos estão relacionados a facilitação na aquisição de recursos

e modulação dos níveis hormonais da planta, o que inclui estimulação do crescimento da raiz, controle do estresse, biofertilização, rizoremediação. (COTTA, 2019; GRAY; SMITH, 2005; VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018). As abordagens das PGPB para a promoção do crescimento de plantas incluem: produção de fitormônios, aumento na captação de nutrientes, tolerância ao estresse abiótico, produção de compostos orgânicos voláteis e produção de enzimas de proteção, disponibilização de sideróforos (COTTA; VEJAN; ABDULLAH; KHADIRAN; ISMAIL *et al.*, 2016). Mecanismos de promoção do crescimento estão esquematizados na figura 2.1.

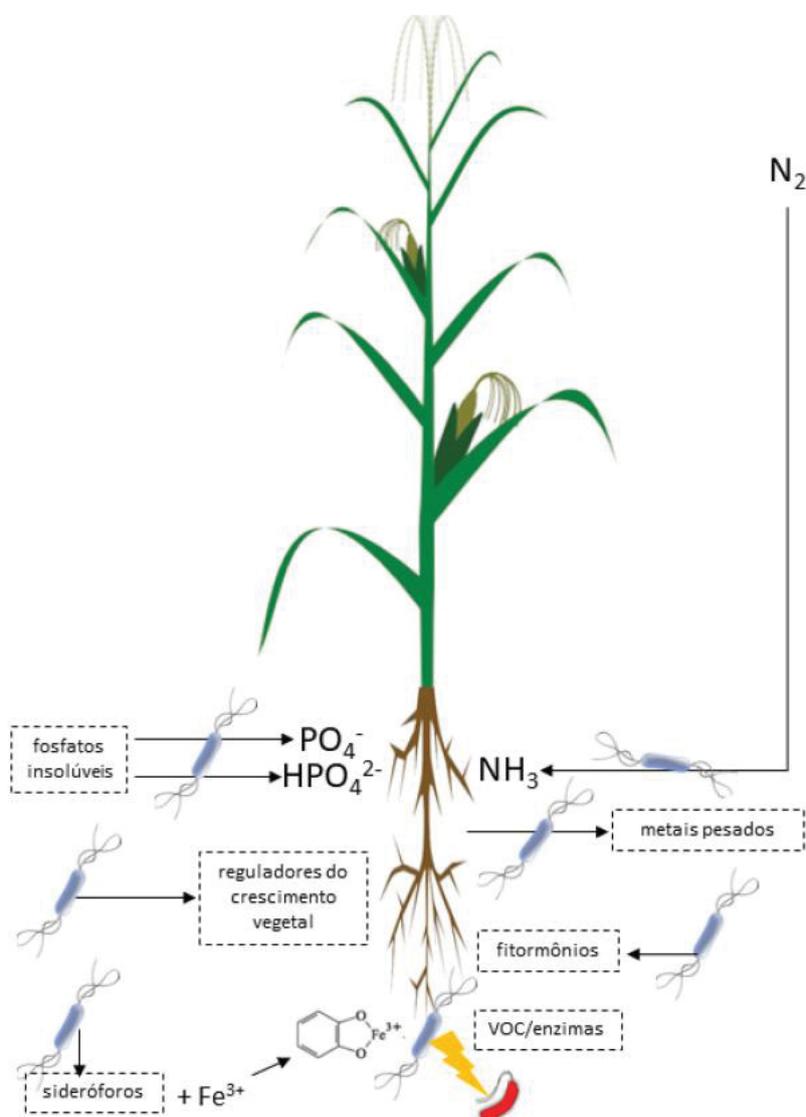


Figura 2.1: Mecanismos de ação possíveis de PGPB para a interação benéfica do crescimento vegetal. Eles incluem: produção de fitormônios, produção de substâncias que alteram as concentrações de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, produção de compostos orgânicos voláteis (VOC) ou enzimas para a defesa contra patógenos e ligação a metais pesados. Fonte: (COTTA, 2019).

Entre as relações planta-bactéria bem sucedidas o *Azospirillum* é considerado o gênero rizobacteriano mais importante para a melhoria do crescimento das plantas ou da produtividade das culturas (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; PERRIG; BOIERO; MASCIARELLI; PENNA *et al.*, 2007). O sucesso dessa PGPR está em como ela se estabelece no ecossistema do solo devido à sua alta adaptabilidade em uma ampla variedade de ambientes, maior taxa de crescimento e versatilidade bioquímica para metabolizar uma ampla gama de compostos naturais e xenobióticos (COOK, 2000; NARASIMHAN; BASHEER; BAJIC; SWARUP, 2003).

Entre as espécies de microrganismos que realizam a fixação de nitrogênio nas raízes das gramíneas, a bactéria *Azospirillum brasilense* (AZO) é a mais estudada para inoculação de gramíneas no campo (FERREIRA, 2014; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016) e está sendo recomendada por muitos pesquisadores no Brasil (DE QUADROS; ROESCH; DA SILVA; VIEIRA *et al.*, 2015; HUNGRIA, 2011; MATOS ARAÚJO; FERREIRA DE ARAÚJO; PINHEIRO LEAL NUNES; DO VALE BARRETO FIGUEIREDO, 2014). Esses microrganismos possuem vida livre, com alta competitividade no período de colonização, usando amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular como fonte nitrogênio (OLIVEIRA; LIMA; ALVAREZ; BALDANI *et al.*, 2019).

Os benefícios da presença do AZO no crescimento da planta têm sido atribuído a uma variedade de mecanismos únicos ou combinados que agem de forma cumulativa ou em cascata (BASHAN; DE-BASHAN, 2010), incluindo: absorção aprimorada de nutrientes e água (ARDAKANI; MAZAHERI; MAFAKHERI; MOGHADDAM, 2011); fixação biológica de nitrogênio (MARQUES; DE OLIVEIRA; NICOLOSO; JACQUES *et al.*, 2017); solubilização de fosfato solubilização (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE; BASHAN, 2004); produção e secreção de fitormônios e outras moléculas de sinalização (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2015) e ácido salicílico (FUKAMI; OLLERO; MEGÍAS; HUNGRIA, 2017; SAHOO; ANSARI; PRADHAN; DANGAR *et al.*, 2014).

A inoculação de raízes com concentrações ótimas de *Azospirillum* aumenta a proliferação de raízes, principalmente com relação ao aumento da formação de “pelos” radiculares e raízes laterais (KAPULNIK; OKON; HENIS, 1985). A produção de substâncias de crescimento vegetal pelo *Azospirillum* tem sido frequentemente proposta como um dos principais fatores responsáveis pela promoção do crescimento de plantas. Substâncias promotoras do crescimento de plantas podem ser detectadas

no sobrenadante de culturas de *Azospirillum*, tais como: auxinas (CROZIER; ARRUDA; JASMIM; MONTEIRO *et al.*, 1988; REYNDERS; VLASSAK, 1979), citocininas (CACCIARI; LIPPI; PIETROSANTI; PIETROSANTI, 1989; HOREMANS; KONINCK; NEURAY; HERMANS *et al.*, 1986) e giberelinas (BOTTINI; FULCHIERI; PEARCE; PHARIS, 1989), com produção de auxinas sendo quantitativamente mais importante.

No entanto, embora as contribuições desta PGPGR pareçam notáveis, sua aparente falta de especificidade na promoção do crescimento de praticamente todos os gêneros e espécies de plantas investigados até agora constituem uma questão a ser investigada para o aperfeiçoamento das funções de interesse,(PEREG; DE-BASHAN; BASHAN, 2016), também há indicações de que espécies e cepas podem variar por determinantes de adaptação específicas de nicho para a rizosfera, que afeta as interações planta-microorganismo (FUKAMI; OLLERO; MEGÍAS; HUNGRIA, 2017; WISNIEWSKI-DYÉ; LOZANO; ACOSTA-CRUZ; BORLAND *et al.*, 2012).

Alguns produtos comerciais que contém inoculante de PGPGR em suas formulações são amplamente usados na pela agroindústria, como o Azzofix® e AzoTotal® (MILLÉO; CRISTÓFOLI, 2016). Não são amplamente encontrados no mercado produtos contendo fitormônios pré-fermentados por PGPGR.

## 2.4 AÇÃO ANTIOXIDANTE DE MOLÉCULAS PRESENTES NO ARROZ

O estresse oxidativo está associado com a relação entre oxidantes produzidos (ou presentes no meio) e o mecanismo de defesa antioxidante, isto é, quando esta relação se encontra em desequilíbrio, favorecendo a transferência de elétrons pelos agentes oxidantes. Existem oxidantes endógenos e exógenos, onde dois grupos de oxidantes são conhecidos, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). No entanto, as espécies reativas de cloro, bromo e sulfeto também são conhecidas como potenciais oxidantes. A maioria dos oxidantes são químicos instáveis e de vida curta, já que estes apresentam tendência de doar elétrons, alterando assim sua estrutura para uma forma mais estável (ESFANDI; WALTERS; TSOPMO, 2019).

Substâncias antioxidantes reagem com radicais livres transformando-os em espécies estáveis não reativas. No nosso organismo, a produção de radicais livres

pode ser controlada por substâncias antioxidantes adquiridas através da alimentação, tais como, tocoferóis (Vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides e outros, além de também poder ser controlada por enzimas antioxidantes (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Outras moléculas, como peptídeos e carboidratos, são também comumente relatadas com potencial de aplicação na indústria, pelo seu papel bioativo antioxidante (PARRADO; MIRAMONTES; JOVER; GUTIERREZ *et al.*, 2006; SURIN; YOU; SEESURIYACHAN; MUANGRAT *et al.*, 2020).

ROS e RNS incluem radicais livres, pode-se citar como exemplos: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), e peróxidos associados a radicais orgânicos ( $ROO^-$ ), também espécies não-radicais como ( $^1O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ), ácido hipocloroso (HOCl), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ) e hidroperóxido (ROOH) (CHEN; GUO; KONG, 2012; RATNASARI; WALTERS; TSOPMO, 2017). Radicais (moléculas com número ímpar de elétrons na camada de valência) OH e ROO podem diminuir o valor nutricional de proteínas reagindo com grupos nucleofílicos, como o grupo amina de cadeia lateral de lisina ou o grupo sulfidril de cisteína em peptídeos, proteínas ou aminoácidos livres (ESFANDI; WALTERS; TSOPMO, 2019; KAMDEM; TSOPMO, 2019).

O farelo de arroz apresenta em sua composição componentes antioxidantes, como orizanol e tocoferóis, bem como ácido ferúlico, que fornece hidrogênio para a neutralização de radicais livres relacionados ao envelhecimento celular (CHAUD; ARRUDA; DE ALMEIDA FELIPE, 2009). De acordo com Qureshi, Sami, Salser e Khan (2002) o farelo de arroz possui ainda tocotrienos que são capazes de reduzir os níveis de colesterol em humanos. Batista *et al.* (2004) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes extratos de farelo de arroz, revelando alto potencial antioxidativo do extrato de farelo de arroz obtido com acetona em comparação ao uso do antioxidante padrão BHT (Hidroxitolueno butilado).

Segundo Parrado *et al.* (2006), a presença de componentes antioxidantes, bem como o teor de proteínas contidas no farelo de arroz, evidenciam o potencial desse material para composição de alimentos funcionais ou nutracêuticos. Estes autores mostraram que extratos enzimáticos de farelo de arroz com alta capacidade antioxidante induziram a morte de células leucêmicas, podendo desta forma suplementar dietas para pacientes portadores de alguns tumores com mínimo de efeitos tóxicos. Segundo Dei Piu *et al.* (2014) pequenos peptídeos apresentam maior

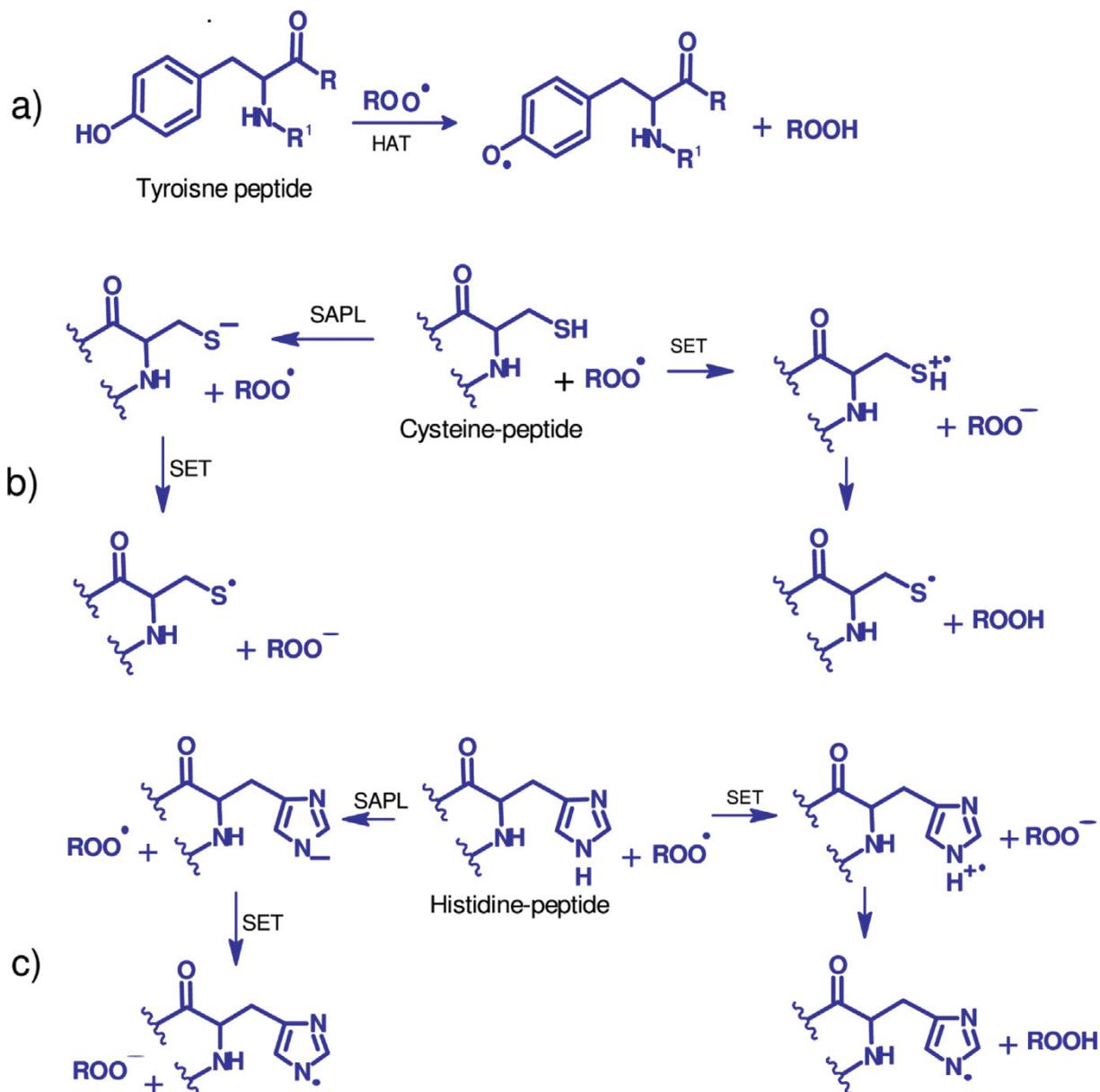
capacidade antioxidante do que proteínas nativas, uma vez que podem ser absorvidos no intestino sem posterior degradação da sua estrutura. Neste estudo, peptídeos obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteína do farelo de arroz foram testados quanto à atividade antioxidante. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento hidrolítico deste subproduto industrial, com enzimas e sistemas microbianos selecionados, permitiu isolar frações ricas em peptídeos com atividade antioxidante.

Existem dois mecanismos principais pelos quais as moléculas antioxidantes podem neutralizar radicais: transferência de elétron único (SET) e transferência de átomo de hidrogênio (HAT). Ambos vão resultar em produtos reacionais iguais, apesar da diferença nos mecanismos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Os dois mecanismos podem ocorrer em paralelo, mas um pode dominar dependendo da estrutura do peptídeo antioxidante e as condições do meio reacional, que irá influenciar a solubilidade, o coeficiente de partição e capacidade de desprotonar moléculas através do pH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os peptídeos de cisteína, triptofano e histidina atuam principalmente por meio de mecanismos SET, já os peptídeos contendo tirosina podem atuar principalmente através de um mecanismo HAT. Durante a HAT, há uma separação do próton ligado (Figura 3.1, moléculas marcadas com “ponto” simbolizam radicais que contém número ímpar de elétrons na camada de valência). O próton pode ser transferido diretamente entre as moléculas reagentes ou pode ser envolvido em uma perda de prótons através do solvente (SAPL) (ESFANDI; WALTERS; TSOPMO, 2019; MUÑOZ-RUGELES; GALANO; ALVAREZ-IDABOY, 2017).

Os radicais formados nas cadeias laterais dos aminoácidos de peptídeos antioxidantes têm uma vida significativamente mais longa, portanto são mais estáveis se comparados aos radicais hidroxila e radicais peróxidos presentes nos alimentos (MUÑOZ-RUGELES; GALANO; ALVAREZ-IDABOY, 2017).

FIGURA 3.1 – MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS



NOTA: HAT = transferência de átomo de hidrogênio; SET = transferência de elétron único; SAPL = perda de prótons assistida por solvente. Esquema proposto para tirosina (a), cisteína na cadeia peptídica (b), histidina na cadeia peptídica (c). FONTE: (ESFANDI; WALTERS; TSOPMO, 2019).

Estudos realizados na Ásia, região onde produz-se em larga escala um vasto número de bebidas a partir de arroz, têm relatado a presença de diferentes moléculas com propriedades antioxidantes. Wang (2019), relataram a presença de moléculas fenólicas em “*Baijiu*” (bebida chinesa à base de arroz). Tais componentes atuaram como inibidores de *N*<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine (CML), uma molécula formada em decorrência de reações de Maillard atípicas. As CML vem sendo associadas como a doenças degenerativas como Alzheimer (CAI; URIBARRI; ZHU; CHEN *et al.*, 2014;

PARRADO; MIRAMONTES; JOVER; GUTIERREZ *et al.*, 2006). Han e Xu (2011) observaram a presença de mais de 500 peptídeos de baixo peso molecular em “*Huang Jiu*”, um vinho chinês não destilado à base de arroz. Dentre esses peptídeos, 43 apresentaram potencial bioativo. Saigusa e Teramoto (2014) mostraram que extratos de vinhaça de “*Shochu*” (bebida de arroz tradicional japonesa) foram ativos na eliminação de radicais livres de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e inibição da peroxidação lipídica. Resultados semelhantes foram obtidos por Takeshita, Saigusa e Teramoto (2015) quando analisaram bebidas alcóolicas produzidas por diferentes tipos de arroz.

## 2.5 PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNAS

Muitos processos que envolvem hidrólise enzimática de proteínas são empregados atualmente, principalmente nas indústrias de alimentos, na indústria farmacêutica, têxtil, agrônômica e também em produtos de higiene.

No ramo alimentar, entre os efeitos positivos esperados com o processamento de alimentos existem aspectos relacionados ao valor nutricional e propriedades funcionais dos alimentos. Isso inclui modificações de qualidade sensorial (como textura ou sabor), uma digestibilidade melhorada e benefícios para a saúde, como redução de compostos alergênicos e melhoria da capacidade antioxidante (PANYAM; KILARA, 1996; VAN BOEKEL; FOGLIANO; PELLEGRINI; STANTON *et al.*, 2010). Processos que usam enzimas em alternativa aos processos químicos, são atraentes, já que eles preservam as espécies químicas presentes nas amostras de alimentos e diminuem a possibilidade de aparecimento de moléculas tóxicas complexadas. A escolha das enzimas e dos parâmetros de hidrólise devem ser realizadas levando em conta o sabor, solubilidade e aplicação específica de propriedades do produto hidrolisado (LAHL; BRAUN, 1994). Sendo assim as proteases são empregadas em cervejarias, em fabricação de queijos nos laticínios, amaciamento de carnes e também em processos *up-streams* para produção de antioxidantes, dentre muitas outras aplicações (GONZÁLEZ-RÁBADE; BADILLO-CORONA; ARANDA-BARRADAS; DEL CARMEN OLIVER-SALVADOR, 2011; TAVANO, 2013).

A contribuição dos processos para produção dos hidrolisados proteicos é muito mais do que a do fornecimento de fontes de nitrogênio. Eles são úteis no aumento da produção, por exemplo, de anticorpos monoclonais, e também para aumentar a

produtividade de várias drogas terapêuticas feitas por células animais e microrganismos, visto que, compõe alimentação de biorreatores com o objetivo de fornecer metabólitos para crescimento celular e precursores de vias de interesse (CHU; ROBINSON, 2001).

Já em agronomia, as PHs são identificadas para melhorar o desempenho de safras no que diz respeito ao aumento de biomassa e de raízes, ganho em produtividade e resistência a estresses climáticos (COLLA; ROUPHAEL; CANAGUIER; SVECOVA *et al.*, 2014).

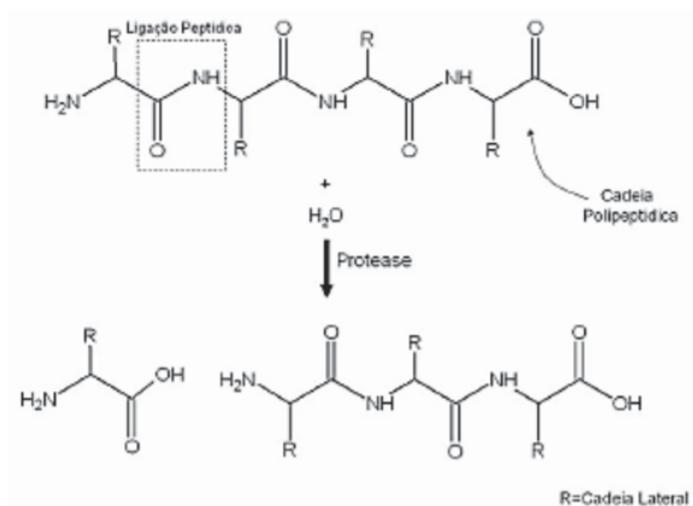
Na verdade, mais de 90% do mercado de PH na horticultura é baseado em produtos obtidos por hidrólise química, enquanto os PHs produzidos enzimaticamente são menos comuns porque estão sendo mais exploradas nas últimas décadas (COLLA; NARDI; CARDARELLI; ERTANI *et al.*, 2015). Já na indústria de alimentos, a hidrólise enzimática pode ser considerada o método industrial preferido para produzir hidrolisados a partir de proteínas de origem alimentar, uma vez que ocorre em condições suaves com reações colaterais mínimas (HOU; WU; DAI; WANG *et al.*, 2017). No entanto, ainda pode haver alguma variabilidade na composição de métodos para produção do hidrolisado, o que, portanto, requer uma análise sistemática dos constituintes (ABEER; TRAJKOVIC; BRAYDEN, 2021; ETEMADIAN; GHAEMI; SHAVIKLO; POURASHOURI *et al.*, 2021; LIANG; CHALAMAIAH; REN; MA *et al.*, 2018).

### 2.5.1 Proteases

A obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteínas é feita por meio de proteases que clivam as proteínas da vinhaça gerando peptídeos e aminoácidos livres. Proteases, também denominadas peptidases, proteinases e enzimas proteolíticas, são enzimas capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias proteicas (FIGURA 3) classificadas como peptídeo hidrolases ou peptidases (Subclasse EC 3.4) (RAWLINGS; MORTON; KOK; KONG *et al.*, 2007; SABOTIČ; KOS, 2012; VERMELHO; MELO; SÁ; SANTOS *et al.*, 2008). Cada protease é atribuída a uma família baseado em semelhanças estatisticamente significativas na sequência de aminoácidos, e as famílias homólogas são agrupadas em conjuntos

denominadas “classes” (RAWLINGS; MORTON; KOK; KONG *et al.*, 2007; SCHALLER, 2004).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DE HIDRÓLISE PROTEICA CATALISADA POR PROTEASE



FONTE: LIMA (2008).

O uso destas enzimas é secular. Sua primeira utilização industrial foi no âmbito das práticas de laticínios, como agentes de coagulação do leite para fabricar queijo (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006). Hoje, elas são um dos grupos de enzimas industrialmente importantes, sendo aplicada em diversas indústrias como indústria de detergente, indústria alimentícia, indústria de couro, indústria farmacêutica e de cosméticos (MURTHY; KUSUMOTO, 2015; SARAN; ISAR; SAXENA, 2007).

O tamanho do mercado global de proteases pode ultrapassar US\$ 3 bilhões até 2024 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017). O crescimento da tecnologia de engenharia de proteínas, juntamente com iniciativas governamentais favoráveis, pode alimentar a demanda global por estes bioprodutos (CHEW; TOH; ISMAIL, 2019; GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017). Cerca de 60% das enzimas comercializadas no mundo são da família das proteases (GURUMALLESH; ALAGU; RAMAKRISHNAN; MUTHUSAMY, 2019; KUMARI; KAUR; SRIVASTAVA; SANGWAN, 2015).

Ao longo dos últimos anos houve um considerável avanço na identificação e isolamento de domínios de enzimas multifuncionais complexas como algumas proteases regulatórias. O advento da biologia molecular aperfeiçoou a análise de

sequência das proteases, por meio de técnicas de clonagem e sequenciamento dos DNAs correspondentes, contribuindo significativamente para o entendimento sobre função, organização e evolução dessas enzimas (RICHARDSON, 1991; TREMACOLDI, 2009).

Enzimas proteolíticas são encontradas em animais, vegetais, bem como em microrganismos. Em animais, elas participam de importantes processos biológicos, entre os quais: a digestão proteica, coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos, ativação de formas zimogênicas de enzimas por proteólise limitada e processamento e transporte de proteínas secretadas através das membranas (DE LIMA; DE JESUS; DE SOUSA; OKAMOTO *et al.*, 2008; RAO; TANKSALE; GHATGE; DESHPANDE, 1998). Algumas das enzimas animais mais bem conhecidas são as enzimas da classe das tripsinas, pepsinas, pancreatinas, dentre outras do trato gastrointestinal. Sua atuação no processo digestivo é essencial para o processo de absorção, pois hidrolisam as proteínas provenientes da alimentação para que seus aminoácidos (monômeros) possam ser absorvidos e reaproveitados pelo organismo (SAID; PIETRO, 2004).

Alcalase, Flavourzyme e Neutrase são exemplos de enzimas de origem animal que chamaram a atenção de pesquisadores em decorrência das inúmeras aplicações dos seus produtos de hidrólise na indústria alimentícia (CHEW; TOH; ISMAIL, 2019). Proteases pancreáticas e proteases do trato gastrointestinal, são enzimas amplamente caracterizadas no campo da saúde humana e animal. O estudo detalhado e aprofundado sobre a especificidade de inibição, cinética, análise de sequências de aminoácidos, e análises estruturais por cristalografia de Raios X destas enzimas, permitiram a identificação das regiões com funções específicas e o sítio ativo dessas macromoléculas, bem como o entendimento de seus mecanismos de ação (NEURATH, 1989; TREMACOLDI, 2009). Dessa forma proteases foram divididas em famílias, onde membros de uma mesma família apresentam estruturas e mecanismos de ação similares.

Nos vegetais, as enzimas proteolíticas estão envolvidas nos processos de amadurecimento, de germinação, de diferenciação e morfogênese, de morte celular, de resposta de defesa de plantas a processos de estresse oxidativo, e claro, são empregadas nos processos de degradação de proteínas não funcionais em aminoácidos (DE LIMA; DE JESUS; DE SOUSA; OKAMOTO *et al.*, 2008). Proteases são, portanto, reguladores-chaves em plantas, pois determinam o destino de outras

proteínas quando regulam diferentes processos em resposta a fatores do ambiente (DE LIMA; DE JESUS; DE SOUSA; OKAMOTO *et al.*, 2008; VAN DER HOORN, 2008). Algumas enzimas envolvidas no amadurecimento de frutos, como a ficina (figo), a papaína (mamão) e a bromelina (abacaxi), podem ser extraídas em grandes quantidades e apresentam, por isso, uma significativa importância econômica (DE LIMA; DE JESUS; DE SOUSA; OKAMOTO *et al.*, 2008).

Os microrganismos são uma das principais fontes de enzimas industriais. Estas enzimas são bastante atrativas, uma vez que os microrganismos podem ser cultivados facilmente e seus metabólitos podem ser obtidos em grandes quantidades num tempo relativamente curto. Além disso, a produção enzimática microbiana não está condicionada a questões sazonais ou geográficas, sendo possível a utilização de matéria-prima de baixo custo para seu cultivo (WERNECK; ZIMMER; BORRÉ; TRENTIN; JÚNIOR *et al.*, 2009). Proteases alcalinas e ácidas são comumente produzidas por microrganismos, visto que organismos extremófilos (que naturalmente possuem enzimas que trabalham em pHs e temperaturas extremas) tem capacidade de produzir estes biocatalizadores de maneira mais diversa, ou seja, enzimas que trabalham com parâmetros de ambientes extremos em relação a outras fontes (animais e vegetais).

#### 2.5.1.1 Classificação de proteases

As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases e dividem-se em diferentes classes de acordo com a natureza e propriedades químicas do sítio catalítico, tipo de reação catalisada e relação evolutiva da estrutura proteica (GULERIA; WALIA; CHAUHAN; SHIRKOT, 2016). Dessa maneira, de acordo com o tipo de ação clivada, as proteases subdividem-se em dois grupos principais: exopeptidases e endopeptidases, clivando peptídeos terminais ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente. As exopeptidases executam sua atividade enzimática apenas por hidrólise nos pontos amino-terminal ou carboxi-terminal da cadeia de substratos inteiramente constituídos de ligações peptídicas (MÓTYÁN; TÓTH; TÓZSÉR, 2013). As endopeptidases são responsáveis por causar clivagem em aminoácidos não-terminais e são submetidas a classificação dependente do tipo químico do grupo responsável pela atividade catalítica (MÓTYÁN; TÓTH; TÓZSÉR, 2013). Sobre a terminologia, o termo protease é sinônimo de peptídeo

hidrolase e inclui todas as enzimas que clivam peptídeos, enquanto o termo proteinase é sinônimo para o grupo das endopeptidases (GURUMALLESH; ALAGU; RAMAKRISHNAN; MUTHUSAMY, 2019; MCDONALD, 1985).

O sítio catalítico de uma enzima é formado por uma tríade catalítica composta por um resíduo de ácido aspártico, um resíduo de histidina e um resíduo de um aminoácido nucleófilo, variável, podendo se diferenciar entre aspartato, cisteína, glutamato, serina, e treonina. A capacidade desta tríade em se ligar regioespecificamente, de maneiras diferentes, nas proteínas, é que vai ditar as diferenças de clivagem das proteases (BORDUSA, 2002).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular reconhece quatro classes de enzimas proteolíticas, as quais compreendem seis famílias. Cada família possui um sítio ativo, isto é: um grupo característico de aminoácidos funcionais, agrupados em uma configuração particular (TREMACOLDI, 2009). São elas: serino proteases (I e II), metalo proteases (I e II), cisteíno proteases e aspártico protease.

A família de proteases mais bem caracterizada e fisiologicamente mais versátil é a das serino-proteases, que caracteriza-se por seus sítios ativos de tríade catalítica: asparagina, histidina e serina (YONAMINE, 2007). As serino proteases incluem duas famílias distintas: as serino proteases de mamíferos (serino proteases I), representadas pelas proteases quimotripsina, tripsina, elastase e calicreína, e as serino proteases bacterianas (serino proteases II) representada pela protease subtilisina (NEURATH, 1986). Embora ambas tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum, diferem-se entre si pela sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional (TREMACOLDI, 2009).

As metalo proteases incluem duas famílias: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos (metalo protease I) e a termolisina bacteriana (metalo protease II), e diferem-se uma da outra na estrutura química, embora ambas tenham zinco ou metal divalente, como cobalto, magnésio, manganês, cálcio e níquel, em seu sítio ativo (KRAUT, 1977; (GONZALES; ROBERT-BAUDOUY, 1996).

As cisteíno proteases são enzimas que possuem mecanismo catalítico que envolve um resíduo de cisteína (Cys) (TREMACOLDI, 2009). No grupo destas enzimas encontra-se várias catepsinas de mamíferos, proteases ativadas pelo cálcio citossólico (calpaínas), actinidina e papaína de plantas, sendo as papaínas as mais estudadas dessa família (BODE; HUBER, 1992). A catálise ocorre via um tioéster intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico

(TREMACOLDI, 2009). As proteases aspárticas apresentam como resíduo ativo característico o ácido aspártico e incluem a penicilopepsina bacteriana, a pepsina de mamíferos renina, a quimosina e certas proteases fúngicas (NEURATH, 1990).

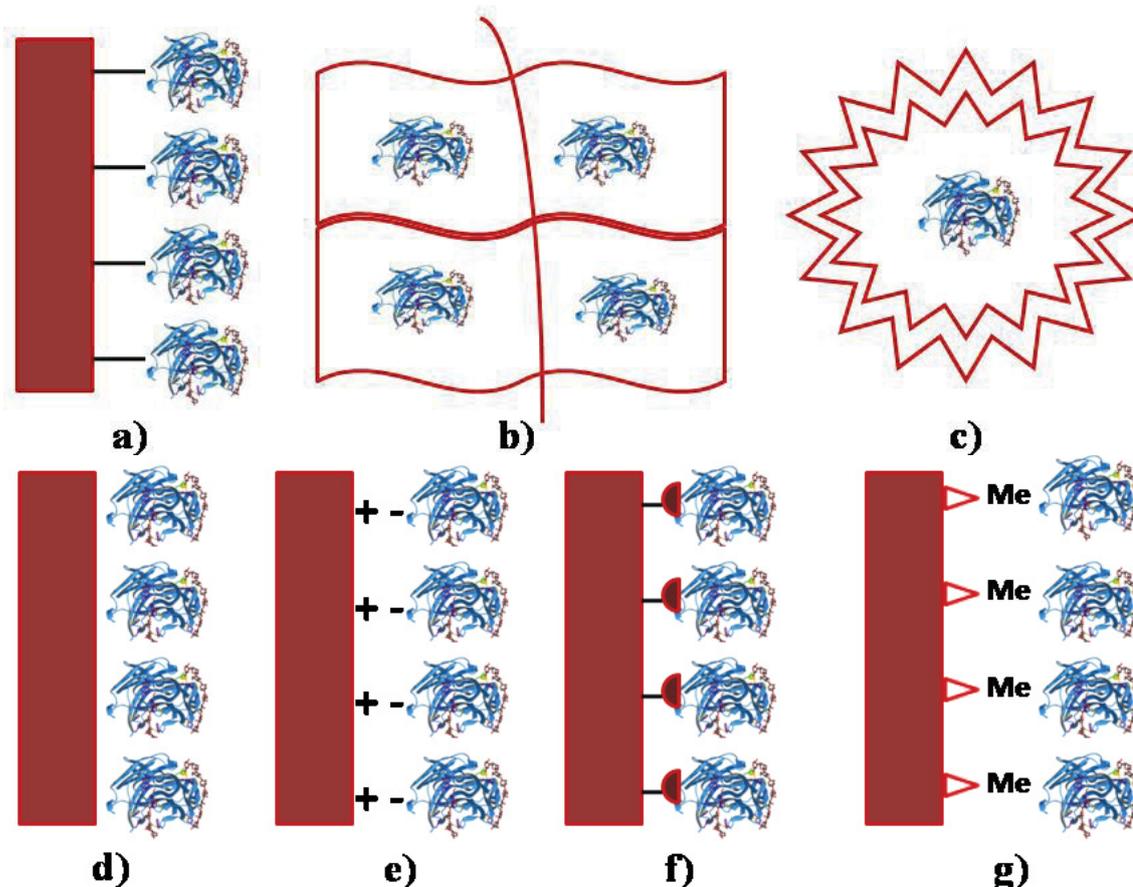
### 2.5.2 Imobilização Enzimática

Os métodos biotecnológicos de produção de enzimas são caros, e por essa razão novos métodos vêm sendo testados com o intuito de reduzir o custo e perda das moléculas biocatalisadoras, valendo-se principalmente de imobilização enzimática. Enzimas apresentam ainda outras limitações, como sensibilidade e baixa estabilidade às condições do processo, problemas contornados pelas técnicas de imobilização (KRAJEWSKA, 2004; PANESAR; KENNEDY, 2006).

A imobilização é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que a sua atividade catalítica não seja afetada (MEERSMAN, 1992). Tanto o envolvimento por membranas quanto encapsulação são termos que descrevem as muitas formas com que as enzimas podem ser aprisionadas em matrizes ou suportes. Existem dois tipos de leitos para a imobilização de enzimas: os de aprisionamento, onde as enzimas são aprisionadas em glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, proteínas ou polímeros sintéticos, e os de adesão à superfície, onde as enzimas são fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (LAPA, 2003). Inúmeros materiais inertes são citados na literatura como suportes para imobilização enzimática. A natureza física destes suportes varia desde superfícies sólidas (vidro poroso, Eupergit C, alumina, etc), até matérias geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragenanas, etc). Os suportes podem ser classificados em cinco tipos fundamentais: 1. microporosos ou não porosos (vidro, sílica, nylon); 2. microencapsulados (nitrocelulose, triacetato de celulose); 3. polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamida); 4. polímeros com baixo grau de ligações cruzadas (Sephadex, DEAE celulose); 5. macroporosos (sílica, alumina, celulose) (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

A partir disso, são descritos sete tipos de métodos para a imobilização de biocatalisadores (FIGURA 4), sendo: 1. ligação covalente, 2. aprisionamento, 3. encapsulação, 4. adsorção, 5. ligação iônica, 6. ligação por afinidade, e 7. ligação por íon metálico.

FIGURA 4 – TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA



NOTA: a) Ligação Covalente; b) Aprisionamento; c) Encapsulação; d) Adsorção; e) Ligação iônica; f) Ligação por afinidade; g) Ligação por íon metálico.

FONTE: (NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

A prática da ligação a superfícies via ligação covalente é alcançada por ligação direto com a enzima, e permite uma boa recuperação do complexo enzima-matriz, já que ligações covalentes são fortes e estáveis (NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012). Este método é usado principalmente quando um processo de reação não requer enzima no produto.

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas, como alginato, carragenana ou quitosana, normalmente envolve a síntese *in situ* da

matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados (GROBOILLOT; BOADI; PONCELET; NEUFELD, 1994). Este método tem sido extensivamente estudado, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização.

As tecnologias de encapsulamento são amplamente utilizadas na indústria para o desenvolvimento de liberação controlada de moléculas, uma vez que esse método permite controlar a transferência de massa entre o meio e o interior da cápsula. Embora tais sistemas sejam amplamente utilizados, problemas associados à sua estabilidade e permeabilidade são frequentemente encontrados, limitando assim sua aplicação geral (CARUSO; TRAU; MÖHWALD; RENNEBERG, 2000).

A imobilização por meio de adsorção natural, é bastante simples e barata. A interação entre a enzima e a superfície da matriz se dá por meio de forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações iônicas, forças de Van der Waals ou mesmo ligações de hidrogênio, a depender das características do suporte e da hidrofobicidade da enzima (TOMASIK; HORTON, 2012). A força de ligação fraca entre o complexo imobilizado é a principal desvantagem deste método, apesar disto, a simplicidade e rapidez desta técnica preserva seu uso nos dias atuais (BRADY; JORDAAN, 2009; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

No método de imobilização por força iônica o suporte possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). O processo de ligação pode ser revertido mudando a polaridade do solvente, o que conseqüentemente altera as condições de força iônica. Este princípio é semelhante ao ligante de algumas colunas de proteínas em princípios de interação usados em cromatografia (GUISÁN; PENZOL; ARMISEN; BASTIDA *et al.*, 1997; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

A imobilização por meio de ligações de afinidade pode estar presente na parede da matriz ou ser adicionada em uma posição específica, longe do sítio ativo, na estrutura das enzimas. Esse tipo de imobilização é usado para criar fortes ligações de afinidade entre a estrutura da enzima e um suporte sólido funcionalizado com o ligante de afinidade. Promove alta seletividade reacional, porém além de onerosa, a técnica exige conhecimento prévio sobre regiões enzimáticas específicas e seus ligantes (ANDREESCU; BUCUR; MARTY, 2006).

Na imobilização de enzimas ligadas por metal, os sais de metal são precipitados sobre a matriz e tem potencial para se ligar a grupos nucleofílicos

(NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012). Este é um método simples e a atividade das enzimas imobilizadas é relativamente alta. O complexo enzimático imobilizado pode ser separado pela diminuição do pH, portanto, trata-se de um processo reversível (YÜCEL, 2011).

Existe ainda a imobilização por auto agregação, que envolve a agregação ou a floculação artificialmente induzida das enzimas. Desta forma, os biocatalizadores são ligados entre si sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

#### 2.5.2.1 Adsorção Seguida de Envolvimento por Membrana

A síntese biocatalítica de produtos é um processo onde uma ou mais enzimas podem estar envolvidas. A vastidão das diferentes técnicas em enzimologia e suas versatilidades em rotas sintéticas inteligentes geram processos para geração produtos valiosos e rentáveis (LEVIN; GÓMEZ; GLODOWSKY; CASCONI *et al.*, 2018).

A atividade catalítica e a estabilidade de enzimas imobilizadas podem ser afetadas pelo procedimento de imobilização, pela natureza do suporte sólido, por produtos formados e até mesmo pela estabilidade do ambiente reacional. Cada metodologia de imobilização tem limitações e desvantagens, portanto, a aplicação de imobilização por duas metodologias em combinação pode obter melhores resultados quando oferecem alguma melhoria reacional (WANG; REN; YU; JIANG *et al.*, 2020).

Técnicas de imobilização enzimática utilizadas em combinação são descritas na literatura em menor número comparadas a processos unitários de imobilização, isto porque é preciso haver um real benefício ao processo para empregá-las, já que, comumente, isto onera etapas *up-stream*. No entanto, seja pela estabilidade reacional, pela comparação de custos com processos unitários ou pela recuperação dos biocatalizadores, elas são estratégias válidas para aliviar gastos com reagentes ou facilitar purificação dos produtos, tornando-as táticas atraentes para indústria.

É possível aplicar diversas combinações de engenhosas técnicas já conhecidas. Uma bem conhecida é a utilização de adsorção associada à agregação das enzimas com ligante químico, como demonstrado por Passela *et al.*, (2008) que utilizou adsorção em resinas carregadas, através de interações iônicas e eletrostáticas entre íons de proteína e íons da resina, e para evitar que os catalisadores proteicos sejam liberados do suporte, uma etapa de “cross-link” foi feita com glutaraldeído

(GUIDINI; FISCHER; SANTANA; CARDOSO *et al.*, 2010; PESSELA; MATEO; CARRASCOSA; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2008).

Segundo Tadipov *et al.*, (2021) várias técnicas podem ser combinadas com tripsina em gel de quitosana. São relatadas variadas formas de ligar quimicamente esta enzima ao gel, tais como ligações covalentes, de hidrogênio, eletrostáticas e Wan-der-Waals (o que englobaria adsorção) e ligações por íon metálico. Desta forma, ao encapsular a quitosana ou seus derivados, aplica-se uma combinação de imobilizações enzimáticas para promover ganho processual (TAPDIGOV, 2021).

A adsorção de enzimas em material celulósico constitui um dos métodos mais tradicionais e baratos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; TIZCHANG; KHIABANI; MOKARRAM; HAMISHEHKAR *et al.*, 2021), sendo possível adsorver a enzima em nanomateriais (como halloysite, um tipo de alumínio-silicato), e conter por membranas a enzima adsorvida em materiais celulósicos, mesmo em estruturas nanocristalinas (TIZCHANG; KHIABANI; MOKARRAM; HAMISHEHKAR *et al.*, 2021). A adsorção em nanopartículas e o respectivo aprisionamento em substâncias poliméricas formadoras de géis, são exemplos de técnicas “*two-step*” que vem se tornando notórias por sua capacidade de estabilizar enzimas e recuperá-las (MOHAMMADI; KHIABANI; GHANBARZADEH; MOKARRAM, 2020).

Neste contexto, a utilização de adsorção em matrizes celulósicas contidas por membrana polimérica, torna-se uma ideia de utilização de combinações em imobilização enzimática com ampla possibilidade de exploração tecnológica para inovação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA PRIMA: VINHAÇA DO ÁLCOOL DE ARROZ

A vinhaça do álcool de arroz, objeto deste trabalho, foi cedida pela empresa de Razão Social “Rozalcohol do Brasil LTDA” (CNPJ: 09.082.906/0001-77), situada no distrito de Jacinto Machado/SC. A vinhaça resultante do processo de produção do álcool de arroz (álcool de cereal) foi coletada, em galões estéreis de 50L, diretamente na saída da coluna de destilação a elevadas temperaturas, e imediatamente acondicionada em freezer para congelamento. Para transporte até Curitiba, os galões foram termicamente isolados, permanecendo congelado durante todo o trajeto até o destino final.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE ARROZ BRUTA

Todas as medições foram realizadas em quaduplicatas experimentais, calculadas utilizando médias estatísticas entre as replicatas.

##### 3.2.1 Determinação dos sólidos totais e percentual de umidade

Para a determinação dos sólidos totais e umidade foi utilizado a metodologia descrita na norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER; HAMES; HYMAN; PAYNE *et al.*, 2008). Papel filtro qualitativo foi seco em estufa a  $105 \pm 3$  °C por 4 h, transferido para dessecador até atingir temperatura ambiente, e posteriormente pesado em balança analítica para determinação da massa. Sobre o papel filtro seco, depositou-se 1,0 g da vinhaça bruta, e levou-se para estufa a  $105 \pm 3$  °C durante 8 h. Em UMIDADE seguida, as amostras foram transferidas para o dessecador até atingir temperatura ambiente. O percentual de sólidos totais e umidade, foi calculando utilizando as Equações 1 e 2.

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{((\text{MASSA DO PAPEL} + \text{MASSA AMOSTRA UMIDA}) - \text{MASSA PAPEL})}{\text{MASSA AMOSTRA SECA}} \times 100$$

(Eq. 1)

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \frac{((\text{MASSA DO PAPEL} + \text{MASSA AMOSTRA UMIDA}) - \text{MASSA PAPEL})}{\text{MASSA AMOSTRA SECA}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

### 3.2.2 Determinação do pH e Atividade de água ( $A_w$ )

O pH da vinhaça bruta foi determinado por meio de método direto com pHmetro. O parâmetro atividade de água, definido como a relação da pressão de vapor da água contida no material à pressão de vapor da água à mesma temperatura, foi determinado por meio de método direto utilizando o analisador AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Inc.), utilizando 1 mL de vinhaça bruta. A atividade de água pode variar de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior será o teor de água livre.

### 3.2.3 Determinação do Teor de Cinzas

Para a determinação de cinzas na vinhaça bruta foi utilizada metodologia descrita na norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER; HAMES; RUIZ; SCARLATA *et al.*, 2008). Primeiramente, os cadinhos de porcelana (devidamente identificados) foram calcinados, com o propósito de eliminar possíveis interferentes, em mufla à  $575 \pm 25$  °C por 4 h. Após, os cadinhos foram transferidos para dessecador até atingir temperatura ambiente. Seguidamente, a massa inicial foi determinada usando balança analítica. Os cadinhos com 1,0 g de amostra de vinhaça bruta liofilizada, previamente pesados, foram então retornados para mufla em cadinhos abertos a  $575 \pm 25$  °C durante 6 h, verificando ao fim do processo se a amostra adquiriu coloração branco/acinzentada. Após a calcinação das amostras, os cadinhos foram transferidos para o dessecador até atingir temperatura ambiente. Por fim, foi determinado novamente a massa dos cadinhos com as amostras calcinadas. A porcentagem de cinzas da amostra foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Massa final(cadinho+amostra)} - \text{Massa inicial(cadinho)}}{\text{Massa Seca da Amostra}} \quad (\text{Eq. 3})$$

### 3.2.4 Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados utilizando o método do DNS, originalmente proposto por Miller (1959). O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) é um teste que, através de um composto colorido formado pela reação entre açúcares redutores e ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelada), é identificado no espectrofotômetro - UV em comprimento de onda de 540 nm. Foi feita uma curva padrão de glicose com valores entre 0,1 e 6,5 mg mL<sup>-1</sup>, para que a quantidade de açúcares redutores das amostras de vinhaça pudessem ser comparadas, seguindo o método proposto. Os valores de absorvância das amostras foram aplicados à equação da reta gerada pela curva padrão e assim foram determinados os valores para as amostras.

Para que isso pudesse ser feito sem interferências da coloração própria das amostras, e para reduzir os efeitos dos sólidos presentes que podem turbidificar o meio, as amostras passaram por centrifugação 8.000 rpm a 10°C.

### 3.2.5 Determinação de Lipídios Totais

Para a determinação dos lipídios totais foi utilizada a metodologia de Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959) adaptada por Rodríguez, Palau, López (2007). As amostras de biomassa seca (50 mg) foram primeiramente extraídas com 3 mL de solução de clorofórmio e metanol 99,8% na proporção de 1:2 (v/v), sonicadas por 15 min, e posteriormente incubadas a 4 °C por 24 h, para favorecer a extração de lipídeos. Após, as amostras foram novamente sonicadas por 15 min e centrifugadas (2607 x g, 20 min, 4°C). A fase clorofórmio:metanol foi recuperada e transferida para um tubo de centrífuga. Foram adicionados mais 1,5 mL de solução clorofórmio:metanol à biomassa residual, e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições anteriores. A fase clorofórmio:metanol foi então recuperada e transferida para o tubo de centrífuga. Foi então adicionado 2 mL de água ultrapura e 1 mL de clorofórmio à fase reservada. A mistura foi agitada, centrifugada em 2607 x g por 10 min, e a fase inferior (fase clorofórmica) foi então transferida para um vial previamente pesado. A fase aquosa foi novamente lavada com 1 mL de clorofórmio, agitada e

centrifugada nas condições anteriores, e a fase clorofórmica transferida ao vial. O solvente foi evaporado em capela de exaustão até secura total. O percentual de lipídios foi calculado pela Equação 4:

$$\% \text{Lipídeos} = \frac{(V1-V2)}{B} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

V1 = massa do vial vazio (g);

V2 = massa do vial com lipídios (g);

B = biomassa seca (g).

### 3.2.6 Determinação de Proteínas Totais

Para a dosagem de proteínas na biomassa seca da vinhaça, foi pesado 1 g da vinhaça bruta previamente seca a 65 °C por 32 h. Uma diluição seriada do material obtido foi aplicada considerando a sensibilidade dos métodos para determinação de proteínas solúveis, sendo o fator de diluição considerado ao final. A suspensão foi então submetida a centrifugação (7155 x g, 10 min, 25 °C), e o sobrenadante obtido foi submetido aos métodos Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina como padrão. A determinação das proteínas insolúveis da vinha bruta seca e sua subfração Pellet (obtido previamente por centrifugação [7155 x g, 10 min, 25°C]) foi realizada seguindo o método de Micro-Kjeldahl (JENSEN, 1991) utilizando 5 g da amostra.

### 3.2.7 Análise de Íons

A quantificação de ânions e cátions foi realizada na mostra bruta, e em suas subfrações (pellet e sobrenadante) obtidas após centrifugação (7155 x g, 10 min, 25 °C). Para as análises, as amostras foram diluídas na razão de 1:10. As análises foram realizadas em cromatógrafo de íons Metrohm CH-9101. Para a análise de cátions foi utilizado a coluna Metrosep C3 250/4.0 (250mmL x 4,0mm ID; No. 5607002), com as seguintes condições de análise: eluente 5,0 mM HNO<sub>3</sub>; vazão: 1,0 mL·min<sup>-1</sup>; detector: CD; temperatura 40 °C; volume de injeção: 20 µL. Para a análise de ânions foi utilizado

a coluna Metrosep A Supp 5 250/4.0 (250 mL x 4,0 mm ID; No. 7610789), com as seguintes condições de análise: eluente 3,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,0 mM NaHCO<sub>3</sub>; vazão: 0,7 mL·min<sup>-1</sup>; detector: suppressed CD; temperatura ambiente (25 °C); volume de injeção: 20 µL.

### 3.3 ENZIMAS UTILIZADAS E FORMULAÇÃO DE MIXS

Para o desenvolvimento de um processo economicamente viável de produção de bioestimulantes vegetais através da hidrólise de vinhaça de arroz, foram escolhidas proteases comerciais.

QUADRO 1 – CLIVAGEM PREFERENCIAL DAS ENZIMAS UTILIZADAS E pH ÓTIMO.

Enzimas	Classe Enzimática (aminoácido nucleófilo)		
	Serina	Cisteína	Aspartato
H-pH (AB Enzymes)	Clivagem Preferencial: Ala, Tyr, Phe [6-10]	-	-
7089 (AB Enzymes)	Clivagem Preferencial: Unidades neutras grandes. [6-9]	-	-
SAVINASE (Novozymes)	Clivagem Preferencial: Unidades neutras Pequenas. [6-9]	-	-
ALCALASE (Novozymes)	Clivagem Preferencial: Unidades neutras grandes. [8-10]	-	-
BROMELINA (Prozym)	-	Clivagem Preferencial: Aminoácidos hidrofóbicos de cadeia longa. [3-6.5]	-
PAPAÍNA (Prozym)	-	Clivagem Preferencial: Aminoácidos hidrofóbicos de cadeia longa. [5-7]	-
PROTEASE 100 (Prozym)	-	-	Clivagem Preferencial: Aminoácidos hidrofóbicos. [4-9]

Enzimas	Classe Enzimática (aminoácido nucleófilo)		
	Serina	Cisteína	Aspartato
TRIPSINA (Instrulab)	Clivagem Preferencial: Arg, Lys. [6-8]	-	-

NOTA: Dados retirados do banco de dados "enzyme expasy". [pH ótimo]

#### QUADRO 2 –COMPOSIÇÕES DOS MIXS ENZIMÁTICOS

MIX	ENZIMAS
HBTB [pH 6]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H-pH</li> <li>• Bromelina</li> <li>• P100</li> </ul>
S7P [pH 9]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Savinase</li> <li>• 7089</li> <li>• Papaína</li> </ul>
HP [pH 6]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H-pH</li> <li>• Papaína</li> </ul>
PE [pH 8]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix da Sigma de proteases</li> </ul>

NOTA: [pH utilizado]

Como parâmetro de eficiência do processo de liberação de aminoácidos, utilizou-se como padrão o mix PE (sigma) de enzimas proteolíticas.

### 3.4 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Esferas amorfas de celulose tratadas constituem o suporte poroso utilizado na imobilização das enzimas. Foram suspensos em tampão fosfato 0,1 M, numa concentração de 0,1 g/L de cada enzima (para enzimas líquidas, calcula-se, através da molaridade e peso molecular, quantos  $\mu\text{L}$  devem ser aplicados) e mantidos em contato com 100 g de suporte de imobilização para cada litro de solução, sob agitação branda, a 15 °C por 20 h. Seguidamente, as esferas foram secas em estufa com circulação de ar, sob temperatura branda de 30 °C, para não ocorrer desnaturação, e revestidas com uma camada de quitosana (100  $\mu\text{L}$  de solução de quitosana 1% m/v em ácido acético 1 M para cada 0,1 g de suporte imobilizado e seco).

As enzimas testadas foram as proteases: (a) protease de *Aspergillus oryzae* P100 (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.21.63), (b) Bromelina (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.32), (c) Corolase-H-pH (AB Enzymes, EC 3.4.21.61), (d) Tripsina (Prozyn BioSolutions EC 3.4.21.4). Também foi testado o mix HBTP que contem todas as enzimas anteriores em conjunto em proporções equivalentes na solução de tampão fosfato, chegando a uma proporção de 25mg de cada enzima para cada litro de solução. Os sistemas se encontravam em pH 6.

### 3.5 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DAS ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS

A atividade proteolítica foi avaliada modificando o método previamente descrito por García-Carreño e Haard (1993). A atividade foi testada com pH específico de cada enzima a 25 °C. Hemoglobina (2%), solubilizadas em tampão Tris/HCL (50mM), (Merck [*hemoglobin from bovine blood, suitable for protease substrate*]) foi usada como substrato em pH ácido (2–6) e caseína (2%) (Merck), solubilizadas em tampão fosfato (0,1 M) para pHs neutros e alcalinos (7–12). A solução enzimática, para cada enzima testada, foi de 20 µL de uma solução 0,1 g/L de enzimas, solubilizadas nos mesmos tampões dos substratos. A reação foi interrompida após 30 min por adição de 0,5 mL de TCA 20%, seguida por centrifugação (5 min, 6500 x g). O sobrenadante separado do substrato não digerido teve sua absorbância determinada em espectrofotômetro a 280 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Brancos foram descontados em todos os ensaios. A atividade proteolítica foi expressa em Unidades (U) por mg de proteína na solução enzimática.

Para as enzimas imobilizadas, foi utilizado o mesmo procedimento, no entanto, ao invés da solução enzimática, foi adicionado 1 g do suporte com enzimas imobilizadas. Os valores de concentração enzimática adsorvidos ao suporte mudam para cada enzima testada, foi necessário considerar, na equação, o valor de concentração para cada enzima em separado. Alíquotas extras do mesmo suporte, sujeitas ao mesmo procedimento de imobilização, foram maceradas e tiveram suas quantificações de proteínas analisadas pelo método de Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e descontadas ao final da cinética. A atividade proteolítica foi expressa em Unidades (U) por mg de proteína na solução enzimática.

Para determinação das unidades de atividade proteolítica, foi utilizado o método Sigma para proteases não específicas descrito por Cupp-Enyard (2008). Para tanto foi plotado uma curva de calibração de tirosina livre ( $\mu\text{mol}$  de tirosina / min). A partir da equação de segundo grau originada pela curva de calibração, foi determinado a atividade de protease em Unidades (U).

A atividade da enzima foi expressa em Unidades/mL de enzima ou Unidades/mg de enzima, utilizando respectivamente as equações 5 e 6:

$$\text{UNIDADES/mL} = \frac{(\text{Amol}) \times (\text{VT})}{(\text{VE}) \times (\text{TE}) \times (\text{VC})} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{UNIDADES/mg} = \frac{\text{UNIDADES/mL}}{\text{peso (mg)/mL}} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde:

Amol =  $\mu\text{mol}$  de tirosina equivalente para a leitura da amostra;

VT = Volume total do experimento (mL);

VE = Volume de enzima utilizado no experimento (mL);

TE = Tempo Total do experimento (min);

VC = Volume da cubeta do espectrofotômetro (mL).

As proteases imobilizadas foram:

- Protease de *Aspergillus oryzae* (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.21.63);
- Bromelina (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.32);
- Corolase-H-pH (AB Enzymes, EC 3.4.21.61);
- Tripsina (Instrulab EC 3.4.21.4);

Foram testados o complexo HBTP (apresentou a melhor expressão de aminoácidos em comparação a outros complexos testados no experimento de análise de aminoácidos) e conjuntamente testou-se as enzimas que o compõe, isoladamente, objetivando analisar a capacidade de cada uma em manter sua atividade.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLIZADOS DE VINHAÇA COM MIXS ENZIMÁTICOS

Para determinação de aminoácidos, amostras contendo 10mL dos meios reacionais foram centrifugadas (14310 x g, 10 mim, 4°C), os sobrenadantes ultrafiltrados em um sistema de microfiltração VivaSpin (10 kDa, 14310 x g). Após passarem pela filtração, as amostras foram liofilizadas e foram pesados 1g do material em tubos próprios para a coleta de amostra (vials de 12 x 32 mm com tampa perfurável para o injetor de amostras do aparelho) e diluídos no tampão de amostra do fabricante, até chegar em uma concentração de 50µg/mL.

A análise seguiu protocolo de funcionamento do analisador Sykam S433D (SYKAM GmbH; Munique, Alemanha), o Analisador de Aminoácidos Sykam S 433 combina as vantagens da separação por troca iônica clássica com a moderna técnica de HPLC, composto por 4 blocos de operação: um organizador de eluentes refrigerado, pressurizado por gás inerte N<sub>2</sub>, um sistema de mistura de solventes composto por misturador, bomba e coluna de lavagem de amônia, um sistema de injeção e coleta de amostras refrigerado, composto por válvulas para mistura dos tampões com a amostra, e, um modulo reacional composto pela coluna de separação, bomba de injeção do reagente de ninidrina pós coluna, reator de alta temperatura e leitor de espectrofotometria.

No procedimento, as concentrações de aminoácidos foram medidas por cromatografia de troca iônica, seguida derivação de ninidrina pós-coluna. A separação dos aminoácidos foi realizada em uma coluna de alta eficiência Pickering Laboratories de troca catiônica de sódio (4,0 × 150 mm), usando um gradiente ternário, com os tampões A, B e C fornecidos pelo fabricante. O programa gradiente foi implementado da seguinte forma: tempo=0 min, A:B:C (100:0:0); tempo = 5 minutos, A:B:C (100:0:0); tempo=28 min, A:B:C (0:100:0); tempo = 45 min, A:B:C (0:100:0); tempo= 5 min, A:B:C (0:0:100). A vazão da fase móvel foi de 0,45 mL/min, e a vazão do reagente de derivatização foi de 0,25 mL/ min. A temperatura da coluna foi fixada em 48° C e o equipamento de reação foi mantido a 130° C. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 5° C e o volume de injeção foi de 10 µL para padrão e amostras. Os aminoácidos separados foram detectados por uma detecção espectrofotométrica a 440 nm e 570 nm (para todos menos prolina). As concentrações de os aminoácidos

foram expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de amostra. Devido à sua degradação durante a hidrólise ácida, o triptofano foi estimado por outro método.

O padrão de aminoácidos (Sykam, Alemanha), contém 2,5 mM de cada aminoácido, incluindo ácido aspártico (Asp), treonina (Thr), serina (Ser), ácido glutâmico (Glu), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), cisteína (Cys), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), lisina (Lys) e arginina (Arg).

### 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O suporte após imobilização enzimática e aplicação de quitosana foi submetido a análises de MEV. Para tanto, as amostras foram saturadas de  $\text{CO}_2$  líquido (ponto crítico) e metalizadas com ouro para avaliação sob o microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU, em voltagem 15 kV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME-UFPR).

### 3.8 DELINEAMENTO DO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL $2^3$ (DCCR) PARA OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para otimização dos parâmetros de imobilização de enzimas no suporte poroso Bio4, pelo processo de adsorção em superfície porosa. Aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três fatores (variáveis) independentes (agitação (rpm):  $X_1$ ; concentração enzimática [E] (mg/mL):  $X_2$ ; tempo (horas):  $X_3$ ) em cinco níveis (TABELA 1). O delineamento experimental consistiu de oito pontos fatoriais, seis pontos axiais numa distância de  $\pm 1,68179$  (nível codificado) do ponto central e quatro repetições do ponto central, totalizando 18 experimentos. Como variável dependente ou variável resposta foi selecionado: quantidade de proteína no suporte [P] (Y1) (%  $\mu\text{g/mL}$ ).

TABELA 1 – NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS NO DCCR

Variáveis Independentes	Símbolos	Níveis Codificados				
		-1,68179	-1	0	1	1,68179
Agitação (rpm)	X1	29,5	50	80	110	130,5
[E] (mg/mL)	X2	0,3	3	7	11	13,7
Tempo (h)	X3	2	4	7	10	12

Para realizar o planejamento experimental foi utilizado um suporte lignocelulósico (fornecido pela Bio4-Soluções Biotecnológicas), mix enzimático HBTP em solução com tampão fosfato. Após imobilização, o suporte foi seco em estufa a 45 °C e triturado em moinho de facas. Foram retirados 20 mg de suporte para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976).

O suporte foi avaliado enquanto matriz com potencial de imobilização de enzimas, com fim de obter porcentagem relativa de imobilização. Foi realizado um Delineamento Experimental Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> e construídos gráficos de superfície de respostas para analisar os resultados obtidos.

O suporte seco, foi pesado em frações de 0,1 g, e submetido ao processo de imobilização. Este suporte foi acomodado em vials de 4 mL, ambientado a 25 °C, seguido por adição de 1 mL enzima solubilizada tampão fosfato. Todas as cinéticas foram realizadas em shaker a 25 °C.

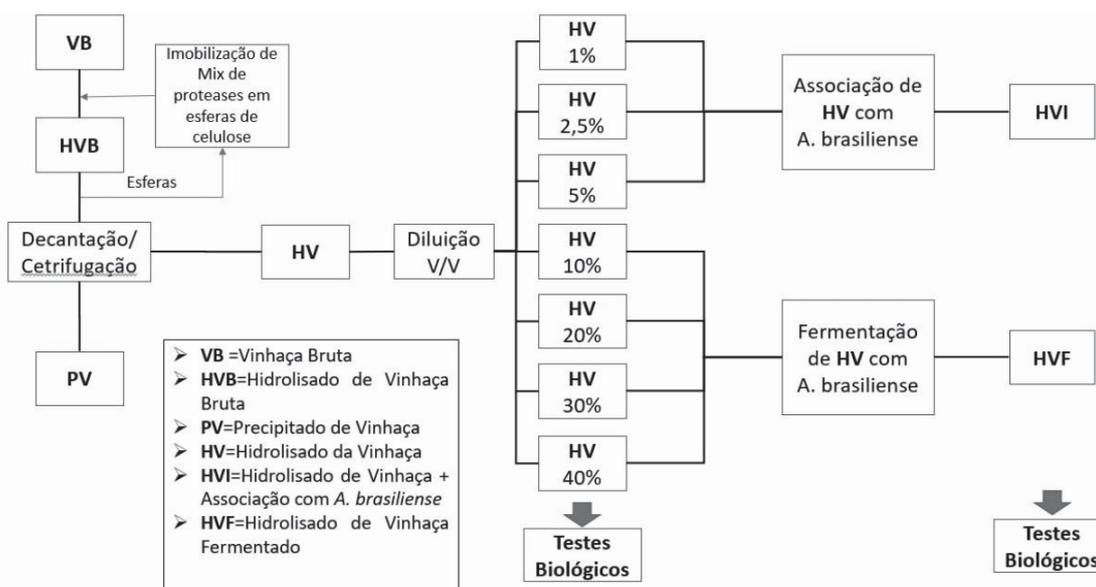
Análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher foram aplicados sobre os dados experimentais para avaliar a significância estatística do modelo, e a qualidade do ajuste do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R<sup>2</sup>. Os pontos centrais foram utilizados para estimar o erro puro do modelo. Teste t de Student foi utilizado para avaliar a significância das estimativas dos coeficientes da regressão, onde  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os programas Statistica (versão Trial 12, StatSoft Inc., EUA) e Design Expert (versão Trial 9, Stat-Ease Inc., USA) foram aplicados para a análise dos dados e otimização gráfica, respectivamente.

### 3.9 OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DE VINHAÇA DE ARROZ

Após processo de preparação da matéria-prima e imobilização das proteases, a vinhaça de arroz foi submetida a processos de digestão enzimática, seguido por associação ou fermentação com *Azospirillum brasilense*, gerando assim os

bioprodutos HV (hidrolisado de vinhaça de arroz) HVF (hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado com *A. brasilense*), HVI (hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com *A. brasilense*). O processo para obtenção dos bioprodutos é resumido na FIGURA 5. Os bioprodutos HV, HVF e HVI foram utilizados para os ensaios biológicos.

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ (HV), HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ FERMENTADO COM *Azospirillum brasilense* (HVF), HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ EM ASSOCIAÇÃO COM *A. brasilense* (HVI)



### 3.9.1 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz (HV)

A vinhaça de arroz, após ajuste do pH para 7,0, utilizando NaOH 0,5 M (aproximadamente 20 mL/L de vinhaça) foi aquecida a 50 °C para posterior etapa de hidrólise enzimática e possibilitar o uso das enzimas imobilizadas. Após, 10 g de suporte imobilizado com o complexo enzimático de proteases por litro de vinhaça foi adicionado, permanecendo sob agitação de 120 rpm, a 50 °C por 24 h. Seguidamente, as esferas foram separadas da suspensão utilizando uma peneira mesh 12 e a vinhaça hidrolisada foi decantada. O sobrenadante foi separado, originando os produtos hidrolisados de vinhaça de arroz (HV).

A quantificação de aminoácidos foi realizada em analisador automático de aminoácidos, modelo SYKAM S433D (Sykam GmbH) e a quantificação de triptofano foi realizada por HPLC-UV-Vis a 283 nm com coluna C18, adaptando metodologia descrita por Absalan, Akhond e Sheikhian (2010).

### 3.9.2 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz Fermentado com *Azospirillum brasilense* (HVF)

Utilizado HV como meio de cultura para a produção da biomassa de células viáveis de AZO, para inoculação em solo, contempla-se a possibilidade de produção de moléculas de interesse agrônômico, liberadas no sobrenadante após o processo, já que o AZO é apto a produzir e excretar ácido indol 3-acético (IAA), ácido giberélico (GA3) e zeatina (Z) (CASSÁN; PERRIG; SGROY; MASCIARELLI *et al.*, 2009).

Uma diluição de 20% v/v de HV em água purificada foi utilizada para o crescimento da bactéria, adicionadas de fontes de nitrogênio 2,5% v/v (cloreto de amônio 0,02 M), fósforo 5% v/v (fosfato de potássio 5 mM), e melaço de cana como fonte de carbono (300 mg/mL). *A. brasilense* foi inoculado em concentração de 1% v/v ( $10 \times 10^8$  células/mL), e a fermentação permaneceu por 24 h, agitação de 120 rpm, e temperatura de 30 °C. O meio fermentado foi então decantado e o sobrenadante foi separado, originando o hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF). A fermentação realizada foi aeróbia.

A quantificação de aminoácidos foi realizada em analisador automático de aminoácidos, modelo SYKAM S433D (Sykam GmbH) e a quantificação de triptofano foi realizada por HPLC-UV-Vis a 283 nm com coluna C18, adaptando metodologia descrita por Absalan, Akhond e Sheikhan (2010).

### 3.9.3 Obtenção de Hidrolisado de Vinhaça de Arroz em Associação com *Azospirillum brasilense* (HVI)

O produto se constitui em duas frações, uma nomeada HV, de vinhaça hidrolisada, para aplicação foliar, e a outra, um inoculante de raiz, contendo células viáveis de AZO. O produto hidrolisado da vinhaça de arroz (HV) pode ser utilizado com um inoculante em paralelo com o fertilizante foliar. Para tanto, foi adicionado 20 µL de uma solução contendo  $1,0 \times 10^8$  ou  $2,5 \times 10^8$  células/mL de *A. brasilense*, previamente crescidas em meio NFb padrão (TABELA 2) por 24 h (tempo necessário para atingir densidade óptica de 1,0 a 600 nm) e injetadas 5 cm abaixo do hipocótilo das plantas recém brotadas.

TABELA 2 – MEIO NFb PADRÃO

Componente*	Quantidade (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 x 10 <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-1</sup>
NaCl	1 x 10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-2</sup>
Ácido láctico (Lactato)	5
FeEDTA	6,56 x 10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,35 x 10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 x 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4 x 10 <sup>-4</sup>
Biotina	1 x 10 <sup>-4</sup>
Piridoxol-HC1	2 x 10 <sup>-4</sup>

\*pH final foi ajustado para 6,5–6,8 com NaOH

FONTE: DöBereiner *et al.* (1995)

### 3.10 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULANTE

Os produtos HV, HVI e HVF, obtidos após as etapas de hidrólise enzimática foram avaliados quanto ao potencial bioestimulante por meio de bioensaios com sementes de milho (*Zea mays* L.) e alface (*Lactuca sativa*).

#### 3.10.1 Bioensaios com sementes de Milho (*Zea mays* L.)

Os bioensaios com milho foram realizados adaptando metodologia descrita por Egener, Hurek e Reinhold-Hurek (1999). Sementes de milho, previamente lavadas e esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,1% v/v), foram pré-germinadas em placas de Ágar-ágar (0,8% m/v) por 48 h a 30 °C. Seguidamente, as sementes de milho pré-germinadas foram transferidas para tubos contendo aproximadamente 25 g de esferas de polipropileno, e permaneceram por 7 dias em estufa incubadora, com fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 197  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , umidade e temperatura controladas. Neste experimento, as sementes foram ancoradas nas esferas de polipropileno para a simulação de um solo inerte, no interior de um tubo de ensaio e

adicionados 10 mL da solução de interesse, com potencial para estimular o enraizamento do milho.

Foram testados: o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) e o hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com *A. brasilense* (HVI). HV foi diluído para as concentrações 2,5 e 10% v/v em água purificada. Para obtenção do hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com o microrganismo *A. brasilense* (HVI), as células viáveis do microrganismo, foram inoculadas a uma concentração de  $2,5 \times 10^8$  células por tratamento, aplicando-as em cima das sementes de milho. Água purificada foi utilizada como controle negativo, e um produto comercialmente disponível (Aminosoil®, Agrivalle) foi utilizado como controle positivo. Para cada experimento individualizado, foram realizadas 15 réplicas por tratamento, e 3 réplicas experimentais, de modo que os valores obtidos são uma média dos experimentos. Foram avaliados o comprimento (cm) e o volume (cm<sup>3</sup>) da raiz, através do programa computacional Win Rhizo® acoplado a Scanner.

### 3.10.2 Bioensaios com alface (*Lactuca sativa*)

#### 3.10.2.1 Teste de crescimento de plantas de alface utilizando os produtos HV, HVF, HVI como fertilizantes foliares

Para avaliar o potencial dos produtos derivados da vinhaça de arroz, como fertilizante foliar, foram realizados bioensaios com plantas de alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, foram utilizados vasos de 1 L com volume equivalente de solo previamente autoclavado, para garantir a esterilização da microbiota natural e permitir a avaliação dos ganhos agronômicos quando realizado com inoculação de *A. brasilense*. As plantas de alface foram fertilizadas, por meio de aplicação foliar, a cada 12 dias, a partir do 15º dia, com 1,5 mL/planta dos produtos, assim como foram realizados os controles. O experimento foi realizado por 50 dias em casa de vegetação, com 5 réplicas para cada produto testado. Este teste objetivou avaliar o tamanho de área foliar das plantas, e o ganho em peso seco com a aplicação foliar.

Para as plantas inoculadas com HVF e HVI, foi aplicado no solo 20 µL de uma solução contendo *A. brasilense* a uma concentração de  $10 \times 10^8$  células/mL. Para os produtos HV e HVI foram testadas as concentrações de 1, 2,5 e 5% v/v. O produto HVF foi diluído, primeiramente a 20% v/v, seguido por novas diluições para 4, 8 e 12

vezes em água purificada. Água purificada foi utilizada como controle negativo (TN), também foi avaliado um controle de inoculação sem adição de fertilizante (sigla TI). Como controle positivo, utilizou-se um produto comercialmente disponível (Liqui-Plex Bonder<sup>®</sup>, Alltech), em concentrações baixas (sigla TP) e altas (sigla TPH), conforme recomendação do fabricante. Adicionalmente, foram testados os efeitos da inoculação em ambos controles positivos (TPI e TPHI para as respectivas concentrações).

#### 3.10.2.2 Teste de enraizamento de plantas de alface utilizando os produtos HV e HVF

Este teste foi realizado para avaliar o potencial dos produtos HV e HVF como enraizadores para alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, utilizou-se HV nas concentrações 5 e 10% v/v, e HVF foi diluído 4 e 8 vezes. Como controle negativo foi utilizado água, e como controle positivo um produto comercialmente disponível (Aminosoil, Agrivalle<sup>®</sup>). Os testes foram realizados em casa de vegetação, em plantadeiras com volume de 50 mL cada poço, preenchidas com terra preta inerte. As plântulas foram tratadas com 0,5 mL de cada tratamento após o quinto dia, em que houve a germinação das sementes, até o trigésimo dia, com aplicações a cada 5 dias. As leituras de volume, comprimento e área das raízes, foram feitas em quintuplicatas para cada tratamento.

#### 3.10.2.3 Testes de germinação de sementes de alface com os produtos HV, HVI e HVF

Para avaliar a capacidade dos produtos obtidos na presente invenção como auxiliar de germinação, foi realizado um experimento testando os produtos HV, HVF e HVI (em quintuplicata) em sementes de alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, utilizou-se placas de Petri de 5 cm, com seu interior recoberto por um disco de papel filtro. Para cada replicata/placa, foram acomodadas 10 sementes de alface e 3 mL de cada produto. Como controle experimental foi utilizado H<sub>2</sub>O. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 30 °C. Após 7 dias, as sementes foram analisadas em scanner específico WinRhizo, medindo-se o comprimento das raízes, o tamanho dos hipocótilos (primeira parte aérea das plântulas) e a porção de área foliar.

### 3.11 MEIO PARA CULTIVO DE *Azospirillum brasilense* À BASE DE HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ E MELAÇO DE CANA

Objetivando um meio de cultura alternativo para *A. brasilense*, diferentes meios foram formulados utilizando hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) e melaço de cana. Para isso, formulações foram estudadas, variando as concentrações das fontes de nitrogênio, fósforo e carbono e do hidrolisado de vinhaça de arroz, em bateladas de 24h com 4mL em frascos de penicilina de 5mL. Como fonte de fósforo foi testado fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) em concentrações de 0; 1,5; 2,2 e 3 nmol. Como fonte de nitrogênio foi testado cloreto de amônio ( $NH_4Cl$ ) em concentrações de 0; 3; 5,5 e 6 nmol. Como fonte de carbono foi testado melaço de cana (Glucose 45,33%; Sacarose 34,12%; Frutose 20,55%) nas concentrações de 6,5 e 300  $\mu g/mL$  e Lactato como descrito no meio NFb padrão. Hidrolisado de vinhaça de arroz (HV), obtido após reação com complexo HBTP imobilizado, foi diluído em água deionizada nas concentrações de 10, 20, 30 e 40% v/v e adicionado aos demais componentes do meio como fonte aminoácidos orgânicos (resultantes da hidrólise proteica).

#### 3.11.1 Contagem de UFC das culturas de *A. brasilense* nos meios de cultivo formulados

A cultura de *A. brasilense* foi obtida de um estoque em placa, do qual foi feito um pré-inóculo, crescido durante a noite em meio NFb padrão até atingir densidade óptica de 1,0 a 600 nm. Após, 1% v/v deste pré-inóculo foi adicionado aos meios de culturas à base de HV (Item 3.9). Para determinar o crescimento de *A. brasilense* foi feito contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para tanto, 3 gotas de 10  $\mu L$  de diluições seriadas (1 para 10) destas células crescidas nos meios à base de HV em solução salina 1% foram aplicadas sobre meio NFb sólido e crescidos em 48 h a 30 °C. Após o crescimento, fez-se contagem de UFC nas diluições onde essas unidades se diferenciam, como relatado na técnica da microgota descrita por Romeiro (2012).

#### 3.11.2 Comparação do crescimento de *A. brasilense* em meio NFb suplementado com HV

Objetivando o crescimento celular de *A. brasilense*, meio NFb padrão foi suplementado com HV e HV diluído em água. Para tanto, foi avaliado o crescimento das células em meio NFb com adição de 20, 40, 60 e 80% v/v de HV e HV previamente diluído em água nas concentrações de 20, 40, 60 e 80% v/v. Foram realizados dois experimentos individualizados com triplicatas experimentais, utilizando vidros de penicilina de 5 mL, previamente autoclavados e selados, contendo um volume reacional total de 2 mL de meio e 1% v/v de inóculo das células de *A. brasilense* previamente repicadas duas vezes e crescidas até densidade óptica de 1,0 à 600 nm. Meio NFb padrão foi utilizado como controle positivo. O teste foi realizado em incubadora Shaker, com temperatura mantida em 30 °C, agitação de 120 rpm por 24 h. Após o crescimento, fez-se contagem de UFC nas diluições onde essas unidades se diferenciam, como relatado na técnica da microgota descrita por Romeiro (2012).

### 3.11.3 Avaliação da suplementação de HV com fonte de carbono, nitrogênio e fósforo para o crescimento de *A. brasilense*

Com o intuito de avaliar as necessidades nutricionais das células de *A. brasilense*, diluições de HV foram suplementadas com fonte de carbono, nitrogênio e fósforo. Para isso, dois blocos experimentais foram realizados utilizando meio à base de HV (20 e 100% v/v em água purificada) suplementado. Num primeiro bloco, lactato de sódio (fonte seletiva de carbono do NFb padrão) foi adicionado em concentrações de 0, 20, 30, 40, 50 e 100 mM. No segundo bloco, utilizou-se as mesmas concentrações de fonte de carbono (lactato de sódio) acrescidos 3 nmol de  $K_2HPO_4$  e 6 nmol de  $NH_4Cl$  (valores utilizados em meio NFb padrão) como fontes de fósforo e nitrogênio.

Foram executados dois experimentos individualizados com triplicatas experimentais cada um, utilizando vidros de penicilina de 5 mL, previamente autoclavados e selados, contendo um volume reacional de 2 mL de meio e 1% de inóculo das células de *A. brasilense* previamente repicadas duas vezes e crescidas até densidade óptica de 1,0 a 600 nm. Meio padrão NFb foi utilizado como controle positivo. O teste foi realizado em incubadora Shaker, com temperatura mantida em 30 °C, agitação de 120 rpm por 24 h. Após o crescimento, fez-se contagem de UFC nas diluições onde essas unidades se diferenciam, como relatado na técnica da microgota descrita por Romeiro (2012).

### 3.11.4 Substituição da fonte de carbono por melação de cana

Com o intuito de avaliar o efeito da substituição da fonte de carbono padrão (lactato de sódio) sobre o crescimento de células de *A. brasilense*, meio contendo HV 20% v/v em água purificada, contendo adições fixas de N e P (conforme descritas no meio NFb padrão) foi adicionado de melação de cana, nas concentrações de 0, 3, 6, 50, 300 e 600 µg/mL.

Foram executados quadruplicatas experimentais, utilizando vidros de penicilina de 5 mL, devidamente autoclavados e selados previamente autoclavados e selados, contendo um volume reacional de 2 mL de meio e 1% de inóculo das células de *Azospirillum brasilense* previamente repicadas duas vezes e crescidas até densidade óptica de 1,0 a 600 nm. Meio padrão NFb foi utilizado como controle positivo. O teste foi realizado em incubadora Shaker, com temperatura mantida em 30 °C, agitação de 120 rpm por 24 h. Após o crescimento, fez-se contagem de UFC nas diluições onde essas unidades se diferenciam, como relatado na técnica da microgota descrita por Romeiro (2012).

### 3.12 QUANTIFICAÇÃO DE FITORMÔNIOS, EM MEIOS À BASE DE HIDROLISADO DE VINHAÇA FERMENTADOS, POR CROMATOLOGRAFIA DE ULTRA ELEVADA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-MS)

A identificação e quantificação de fitohormônios em meios à base de HV (vinhaça hidrolisada com o complexo enzimático HBTP) foi realizada por UHPLC-MS.

A vinhaça hidrolisada com o complexo enzimático HBTP foi escolhida para formular os meios fermentativos pelo fato de ser o produto reacional que mais obteve aminoácidos livres entre todas as reações testadas.

Foram testadas 4 diluições de HV, denominadas V10, V20, V30 e V40 (10%, 20%, 30% e 40% em H<sub>2</sub>O ultrapura respectivamente), 3 concentrações de NH<sub>4</sub>Cl e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, denominadas 50% para N=0,5M; P=50mM, 75% para N=0,75M; P=75mM e 100% para N=1M; P=100mM e 2 concentrações de melação de cana como fonte de carbono denominadas 1:8 para 300mg/mL e 1:400 para 6mg/mL.

Para cada variação, foram executadas quadruplicatas experimentais utilizando vidros de penicilina de 5 mL, devidamente autoclavados e selados previamente ao manuseio e inoculação em fluxo laminar, cada qual contendo um volume reacional de 2 mL de meio e 1% de inóculo das células de *Azospirillum brasilense* previamente repicadas duas vezes e crescidas até densidade óptica de 1,0 a 600 nm. Meio padrão NFb foi utilizado como controle positivo acrescido. O teste foi realizado em incubadora Shaker, com temperatura mantida em 30 °C, agitação de 120 rpm por 24 h. Após o crescimento, mediu-se densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm, para todas as concentrações, em seguida, os respectivos sobrenadantes microfiltrados (0,22 µm, Kasvi) para a análise cromatográfica.

Nas replicatas experimentais utilizando meio NFb, foi utilizado meio tal qual descrito na unidade 3.7 deste trabalho, no entanto, com adição de 50µg/mL de L-triptofano (Sigma).

Os tempos de retenção das amostras analisadas foram comparados aos de padrões analíticos. Cada padrão foi analisado separadamente para determinação do tempo de retenção individual. Uma curva de calibração foi gerada a partir de soluções padrão, para cada molécula.

As amostras e os padrões de fitormônios N6-benziladenina (BA), N6-benziladenosina (BAR), dihidrozeatina (DZ), dihidrozeatina ribosídio (DZR), N6-isopenteniladenina (iP), cinetina (K), cinetina ribosídio (KR), *trans*-zeatina (tZ), *trans*-zeatina ribosídio (ZR), *cis,trans*-ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido giberélico (GA3) (adquiridos da empresa OIChemIm - República Tcheca), foram solubilizados em água ultrapura e metanol 99,9%, em proporção de 70:20 (v/v), previamente filtrados em unidades filtrantes com poro de 0,22 µm.

Os solventes utilizados na fase móvel foram, ácido fórmico 85%, acetonitrila 99,9% e água ultrapura. A fase móvel consistiu em dois solventes: A e B. O solvente A consistiu em 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e o solvente B consistiu de 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura.

A análise de cromatografia líquida foi realizada em um UHPLC Waters, equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm), com tamanho de partícula de 3 µm, utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: Volume de injeção: 10 µL; Fluxo: 0,4 mL min<sup>-1</sup>; temperatura 40 °C e fase móvel com gradiente de solventes A e B (Tabela 3). O equipamento de UHPLC é acoplado a um espectrômetro de massas Xevo® G2-S QTof, sendo a fonte de ionização por eletrodispersão (ESI,

*electrospray ionization*) e o gás nebulizador nitrogênio. A pressão do gás nebulizador, a temperatura do gás e a voltagem utilizada foram 4,0 Bar, 200 °C e 10,0 eV, respectivamente.

TABELA 3 – GRADIENTES DA FASE MÓVEL

Tempo (min)	Solvente A <sup>a</sup> (%)	Solvente B <sup>b</sup> (%)
0:01	3	97
8:00	30	70
10:00	50	50
14:10	80	20
20:00 <sup>c</sup>	3	97

NOTA: <sup>a</sup> Solvente A: 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila; <sup>b</sup> Solvente B: 0,1% de ácido fórmico e água ultrapura; <sup>c</sup> Tempo total da cromatografia.

### 3.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DE VINHAÇA DE ARROZ

A atividade antioxidante foi avaliada quanto à capacidade de doação de hidrogênios, ou seja, inativação de radicais livres, através do método do radical estável DPPH ( $\alpha, \alpha$ -difetil- $\beta$ -picrilhidrazil) (Brand-Willians et al., 1995).

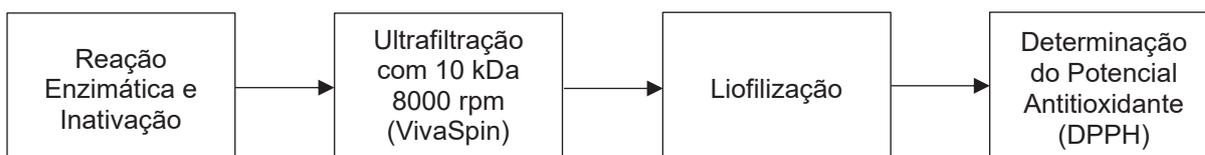
Foram testados os produtos da hidrólise enzimática da vinhaça com os complexos enzimáticos:

- **HP** [Corolase-H-pH (AB Enzymes, EC 3.4.21.61) e Papaína (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.2)];
- **S7P** [Savinase (Novozymes, EC 3.4.21.62), Corolase 7089 (AB Enzymes, EC 3.4.24.28), Papaína (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.2)].

E também dos complexos também as enzimas livres:

- ***Aspergillus oryzae* P1000** (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.21.63) e
- **Corolase 7089** (AB Enzymes, EC 3.4.24.28).

FIGURA 6 – OBTENÇÃO DE HV PARA A DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE



Em uma placa de poliestireno de 96 micropoços, 50 µL das amostras solubilizadas em metanol nas concentrações de 2–50 µg, foram misturados a 200 µL de uma solução de DPPH (0,04 g/L em metanol), preparada apenas pouco tempo antes dos ensaios. As placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi feita em leitor de microplaca a 515 nm a cada 5 min. Também foi preparado um branco do DPPH (200 µL de DPPH e 50 µL de solvente somente). Devido às amostras terem cor, foram preparados branco da amostra com 50 µL da amostra e 200 µL de solvente somente. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) e BHT (di-terc-butil metil fenol) foram utilizados como controles positivos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e em triplicatas de experimentos individuais. A capacidade de inativação do radical DPPH, em percentagem, foi calculada através da Equação 7:

$$\% \text{INB} = \frac{[\text{Ac} - (\text{Ar} - \text{Aa})]}{\text{AC}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

Ac = controle;

Ar = amostra;

Aa = branco da amostra.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE ARROZ BRUTA

A vinhaça do álcool de arroz é um subproduto com características conhecidas no universo das aplicações de efluentes de destilarias, suas principais características, em grande parte, não se diferem das vinhaças em geral, contendo um pH ácido, grande quantidade de água livre e elevada quantidade de matéria orgânica (EL-ZAIAT; RÉ; PATINO; SALLAM, 2019). No entanto, se comparada à vinhaça de cana de açúcar, deve possuir maiores valores de proteínas vindas do arroz, já que não são aproveitadas no processo fermentativo em sua totalidade.

Entre os trabalhos que utilizam a vinhaça do álcool de arroz, encontra-se um pH que varia entre 2,95 e 3,5, uma quantidade de açúcares totais que varia entre 5 a 26% do peso seco total. Nota-se também a presença de íons de fósforo, cálcio, magnésio, e zinco, podendo variar de acordo com os parâmetros desejados na concepção do produto final (COLUSSE; SANTOS; RODRIGUES; BARGA *et al.*, 2021; EL-ZAIAT; RÉ; PATINO; SALLAM, 2019; WU; LIU, 2013; YANG, 1998; YANG; LIN, 1998; YANG; TUNG, 1996).

A determinação dos parâmetros físico-químicos: pH, atividade de água ( $A_w$ ), umidade, cinzas, quantificação de açúcares, íons e proteínas para a vinhaça bruta foi realizada logo após a chegada da matéria-prima. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA VINHAÇA BRUTA

Parâmetros Físico-Químicos	
pH	3,06 ± 0,01
Atividade de água ( $a_w$ )	<b>0,993</b>
Sólidos Totais (%)	0,04 ± 0,003
Umidade (%)	0,96
Cinzas (%)	15,03 ± 0,17
Açúcares Redutores (mg/g)	5,42
Proteínas Totais (mg/g)	570,32 ± 2,67
Proteínas Solúveis (mg/g)	106,01 ± 0,12
Lipídios totais (mg/g)	35,5 ± 0,69

TABELA 5 – QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS

Íons	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Cátions solúveis</b>	
Na <sup>+</sup>	24,98
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	20,24
K <sup>+</sup>	40,01
Mg <sup>2+</sup>	20,2
Ca <sup>2+</sup>	13,53
<b>Ânions solúveis</b>	
F <sup>-</sup>	0
Cl <sup>-</sup>	30,03
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0
Br	0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	320,5
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	45,42

A vinhaça bruta apresentou um pH de 3,06, demonstrando que a matéria-prima possui um elevado caráter ácido. Os experimentos subsequentes foram realizados somente após ajuste do pH para 7,0.

A atividade de água foi igual a 0,993, o que limita o armazenamento do material, já que em condições de temperatura ambiente, este poderia facilmente sofrer contaminação. No entanto, assim como observado por (RAMOS; LABERNIA; MARIN; SANCHIS *et al.*, 1998), essa característica é desejável em formulações de meios de cultura, onde deseja-se teores acima de 0,9 para meios líquidos. O percentual de sólidos totais foi de 0,04% ± 0,003 e a umidade foi de 96,00% ± 0,003. O teor de umidade total corrobora com os resultados de *A<sub>w</sub>*, como esperado para um subproduto líquido, demonstrando um baixo teor de sólidos totais.

A determinação das proteínas totais nos sólidos da vinhaça bruta indicou que esse tipo de macromolécula é o composto mais abundante na composição da vinhaça. As análises de Kjeldahl apontaram para uma quantidade de 570,32 ± 2,67 mg/g de proteínas nos sólidos da vinhaça, o que representa mais da metade em peso, e destas, 106,01 ± 0,12 mg/g foram de proteínas solúveis, determinadas pelo método de Biureto. Esses valores estão dentro do esperado quando analisamos a composição do arroz, que, em diferentes variedades, sempre apresenta as proteínas como segundo composto mais abundante, perdendo apenas para os carboidratos, que nesse caso são consumidos em larga medida durante o processo fermentativo.

A análise de íons comprovou o que já era esperado de uma vinhaça, a presença de eletrólitos remanescentes no meio, necessários para fermentação, assim como macro e microminerais, vindos do arroz, podendo variar de acordo com a eficiência da fermentação ou objetivo sensorial. Isso favorece a utilização deste efluente em bioprocessos que precisam ser suplementados com elementos químicos para nutrir fermentações diversas ou mesmo para produção de biomassa microbológica. Como macrominerais, encontra-se na vinhaça deste estudo valores de 13,53 mg/L para o cálcio, 320,5 mg/L para fósforo, 40 mg/L de potássio e 14,9 g/L de íons amônio. Já nos microelementos, não encontramos flúor ou bromo, potenciais poluentes.

#### 4.2 ENZIMAS UTILIZADAS E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para aproveitamento de vinhaça de arroz como biofertilizante, foram escolhidas enzimas comerciais de mecanismo proteolítico conhecido, com vasta utilização em processos agrônômicos e alimentícios no processo de hidrólise. Essas proteases, de diversas características e classes diferentes foram escolhidas quanto ao mecanismo de atuação promovido pelo sítio catalítico das mesmas, avaliando a capacidade de gerar peptídeos bioativos e aminoácidos livres à partir das proteínas presentes na vinhaça.

Objetivando otimizar a liberação desses aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular de interesse agrônômico, testou-se também a formulação de “mixs” enzimáticos (enzimas utilizadas em conjunto). Esses mixs foram formulados com enzimas de classes diferentes e que, portanto, atuariam na cadeia polimérica de aminoácidos em sítios diferentes, otimizando a liberação de moléculas menores. Além disso, a própria conformação bioquímica e tridimensional das estruturas das enzimas podem fornecer especificidades diferentes para enzimas de mesma classe (BOYER; KREBS, 1986; DIXON; WEBB, 1960; POLAINA; MACCABE, 2007; TERRA; FERREIRA; JORDAO; DILLON, 1996)

O sistema combinado de imobilização permite que as esferas de celulose não se fragmentem com a abrasão do movimento reacional, desta forma, também permite maior reutilização das mesmas. O revestimento com quitosana permite que as fibras do suporte, inchadas pelo contato com o meio aquoso, não se desfragmentem com a

fricção provocada pelo atrito entre as esferas em meio à agitação. Para imobilização em suportes lignocelulósicos, enzimas podem chegar a uma manutenção de atividade de 88% usando aparas, cavacos e serragens como suporte, materiais com alta porosidade e de pequeno diâmetro, aumentando a área de contato para a imobilização (A MAHMOOD, 2010; SANTOS, 2010). Do mesmo modo, proteases podem chegar a rendimentos de manutenção de atividade parecidos, chegando a valores que podem chegar de 80 a 88% para materiais imobilização em materiais contendo celulose, e até 93% para nanopartículas de celulose (DE MELO BRITES; CERÓN; COSTA; OLIVEIRA *et al.*, 2020; LAN; TAI; SHEN; WANG *et al.*, 2012; TACIAS-PASCACIO; MORELLON-STERLING; CASTANEDA-VALBUENA; BERENGUER-MURCIA *et al.*, 2021).

Comumente, o envolvimento enzimático de proteases por membranas esféricas de quitosana varia entre 60 a 90% de manutenção da atividade enzimática, a depender de questões que podem influenciar na transferência de massa, como usar um ligante químico, ou mesmo o diâmetro das esferas utilizadas (BADOEI-DALFARD; SAEED; KARAMI, 2022; DEMIRKAN; AVCI; AYKUT, 2018; ELCHINGER; DELATTRE; FAURE; ROY *et al.*, 2015).

Esses procedimentos, combinados, compõe sistema de imobilização por adsorção em matriz porosa, juntamente com envolvimento por membranas. As técnicas aplicadas, conjuntamente, possibilitam a reutilização das esferas, assim como a proteção contra abração em meio agitado. Esse sistema combinado, possui eficácia diminuída pelo fato de haver duas barreiras para a transferência de massa, porém apresenta mais estabilidade mecânica, alta porosidade, a um baixo preço.

Então, o sistema de suporte combinado de imobilização foi testado. Apresentou uma eficácia na manutenção da atividade enzimática de 61,4% ( $\pm 15\%$ ), em relação a eficiência das enzimas livres (FIG. 7), além de apresentar bom rendimento de imobilização enzimática (70 mg/g de suporte). O complexo enzimático HBTP apresentou manutenção de atividade de 60%, o que condiz com a média das manutenções das enzimas que o compõem, dentro dos desvios padrões apresentados.

A enzima que obteve melhor manutenção de atividade (capacidade de aderir ao suporte) adsorvida pelo suporte, foi a H-PH, com 78% de retenção de atividade, ao passo a que apresentou pior manutenção de atividade foi a P100, com

52% (FIG. 8). A enzima bromelina manteve retenção de atividade de 64% e a tripsina ficou em 53%.

As diferenças se devem pelo fato de que as enzimas interagem com diferentes forças de ligação eletrostática nos arcaabouços porosos do suporte lignocelulósico, e, de modo geral, é também possível avaliar que perdas na atividade enzimática fossem previstas por basicamente mais dois fatores: O primeiro e certamente o mais provável reside no fato de que a tecnologia de enzimas imobilizadas normalmente atravessa questões de transferência de massa. A adsorção em matriz porosa não foge à regra, já que o meio difusional no interior das fibras não apresenta a mesma mobilidade de um meio com enzimas livres e o aprisionamento com quitosana pode interferir nisto, pela mesma lógica. O segundo se dá por questões de inibição, pois à medida que ocorre a hidrólise e a despolimerização das proteínas, o meio reacional vai se alterando de tal forma que seria possível imaginar que essas enzimas pudessem sofrer inibição pelo produto.

No entanto, estas enzimas apresentaram bons resultados de manutenção, considerando que sempre haverá perdas para o tipo de material empregado como suporte.

Ensaio de ciclos enzimáticos mostram que o suporte não apresentou queda significativa da atividade, mesmo após 10 ciclos consecutivos (FIG. 8). É importante destacar que, sem a camada externa de quitosana, não seria possível viabilizar a utilização do suporte lignocelulósico. Testes preliminares mostraram que as fibras se desfizeram quando submetidas a agitação em meio aquoso, como ficou comprovado através das imagens de microscopia (MEV). A quitosana além de manter as enzimas no interior dos poros do material lignocelulósico por mais tempo, também impede a abrasividade gerada no contato de uma esfera com a outra. O caráter gelificante da quitosana, é uma das principais características do material, que, em uma reação agitada, torna possível a capacidade de manutenção da integridade física do sistema suporte-enzima, visto que partículas gelatinosas tem capacidade de absorver impacto (KLEIN; NUNES; RODRIGUES; BENVENUTTI *et al.*, 2012; KOUKARAS; PAPADIMITRIOU; BIKIARIS; FROUDAKIS, 2012; KRAJEWSKA, 2004; YEON; YOU; ADHIKARI; HONG *et al.*, 2019).

FIGURA 7- CINÉTICA DOS CICLOS E TEORES DE PROTEÍNAS REMANESCENTES APÓS CADA CICLO ENZIMÁTICO

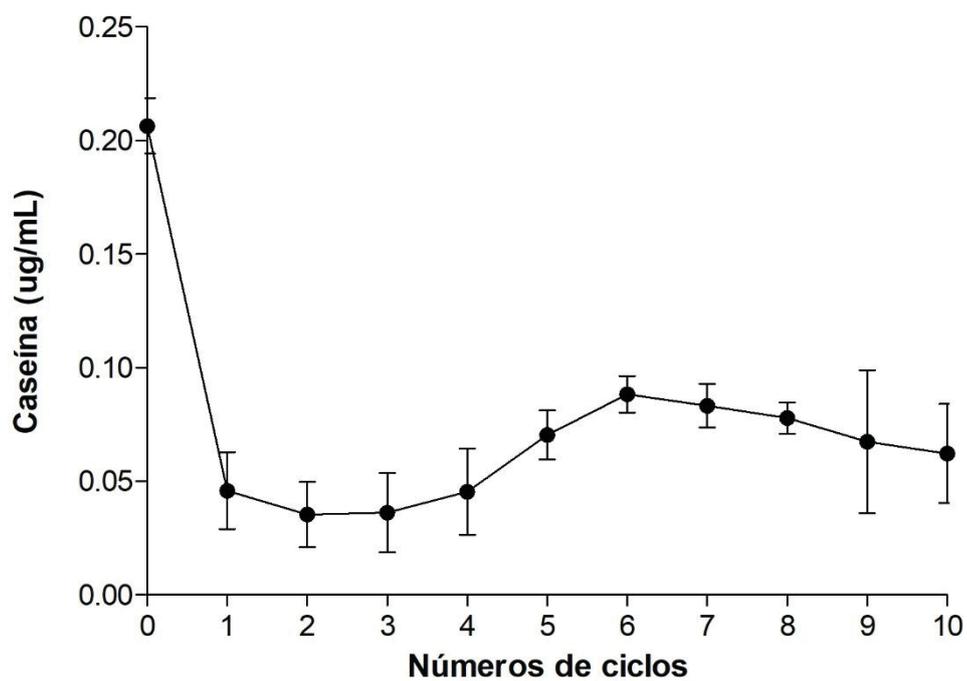
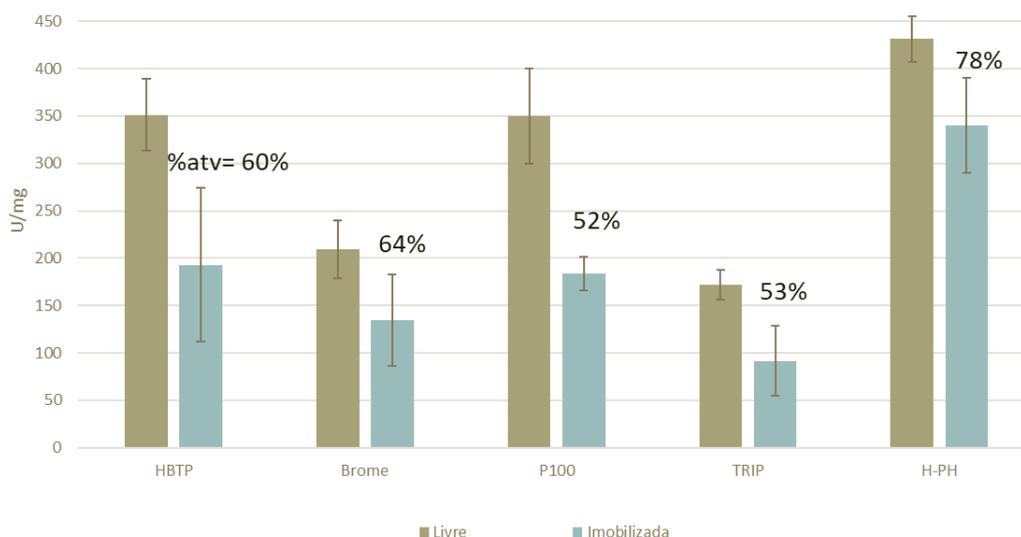
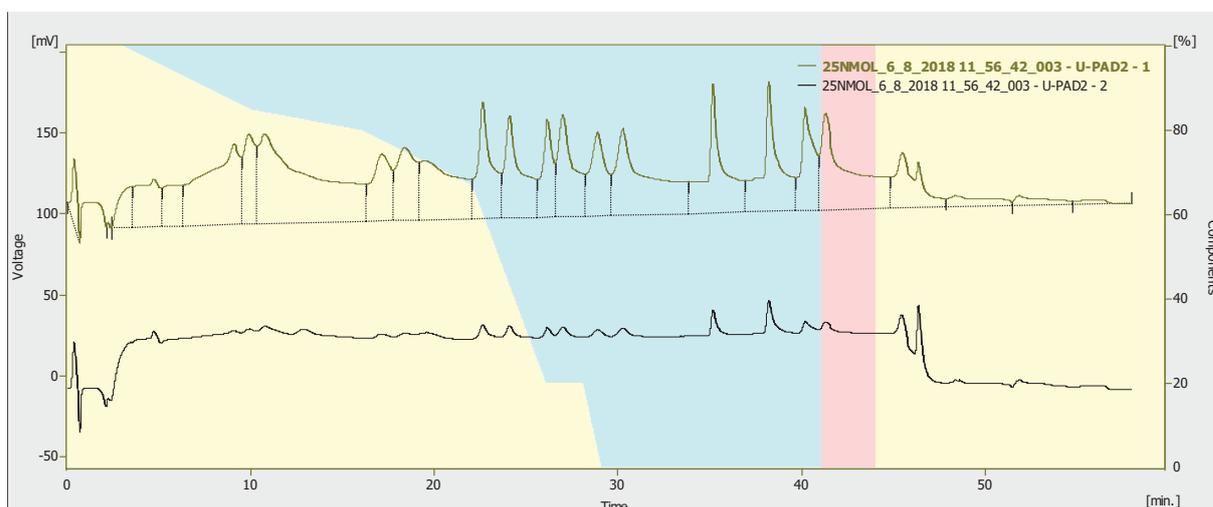


FIGURA 8- COMPARAÇÃO DAS MANUTENÇÕES DE ATIVIDADES DAS ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS



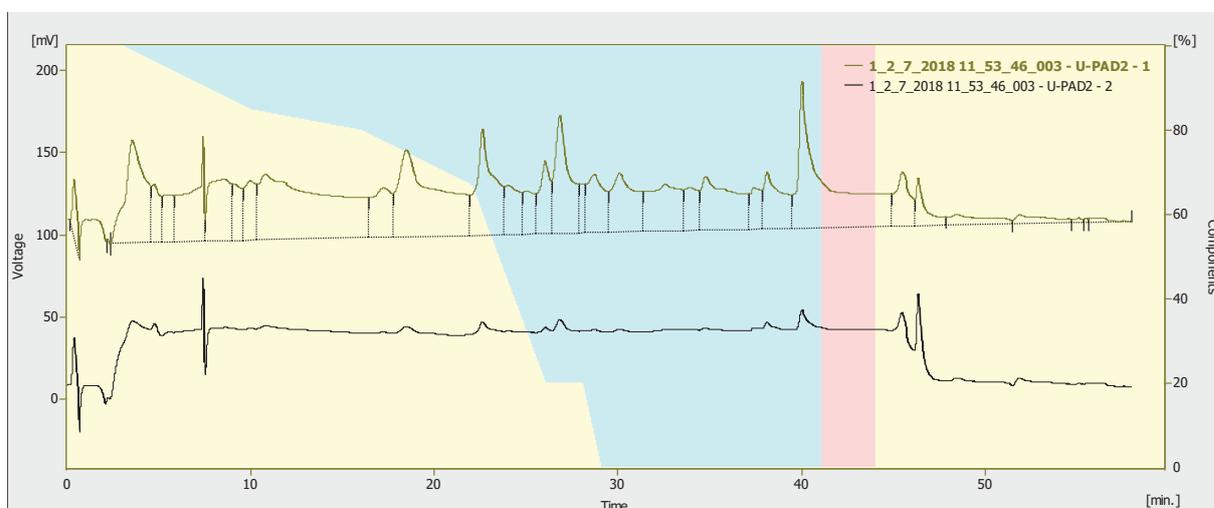
#### 4.3 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLIZADOS DE VINHAÇA COM MIXS ENZIMÁTICOS

Na figura abaixo, observa-se o cromatograma do padrão de aminoácidos, com concentração determinada pelo analisador de aminoácidos Sykam S 433 (sistema de detecção e derivatização pós-coluna). A quantificação dos aminoácidos foi realizada segundo processo padrão Sykam, realizada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), os tempos de retenção dos aminoácidos foram comparados ao perfil pré estabelecido pelo fabricante. Os cromatogramas das amostras dos hidrolizados de



vinhaça com os mixes enzimáticos foram analisados através de medição da área dos picos, quando comparados aos do padrão com concentração conhecida. Nota-se que a existência de duas linhas de base deve-se ao fato da realização de medição em dois comprimentos de onda diferentes. Sendo o superior em XX e a inferior em XX.

Na Figura seguinte temos o cromatograma do hidrolisado denominado HBTP, que, conforme esta análise, demonstrou a maior quantidade de aminoácidos livres presentes na amostra (Tabela de quantificação). Pode-se observar que todos os aminoácidos, como ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina e arginina estão presentes na amostra HBTP. O aminoácido triptofano não foi detectado porque o equipamento utilizado não identifica este aminoácido.



Tendo as amostras passado por método de microfiltração 10 kDa, espera-se que somente frações hidrolisadas de proteínas tenham restado na fração purificada para a análise, já que, dentre as prolaminas, glutelinas, globulinas e albuminas, proteínas presentes na fração proteica do arroz, as globulinas, proteínas de menor peso molecular, apresentam de 11 a 15 kDa (JAYAPRAKASH; BAINS; CHAWLA; FOGARASI *et al.*, 2022). Já na fração proteica advinda das leveduras do processo de fabricação do álcool, todo o perfil proteico de metabolismo eucarionte pode ser encontrado, podendo possuir vasto perfil, já que são conhecidas 5797 proteínas conhecidas pela literatura. (TIESSEN; PÉREZ-RODRÍGUEZ; DELAYE-

ARREDONDO, 2012; WIEDERHOLD; VEENHOFF; POOLMAN; SLOTBOOM, 2010). Mas também nesta fração proteica dos extratos hidrolisados, grande parte pode ser retirada via filtração 10kDa.

O fator limitante para a preparação de proteínas de arroz com valor agregado é sua baixa solubilidade, na água é menos de 2% e a faixa de pH de 4-7. Como discutido acima, a extensa agregação e reticulação através de interação hidrofóbica e ligações dissulfeto resultam no insolúvel precipitado. Portanto, a aplicação atual de proteína de arroz é limitada (MAŁECKI; MUSZYŃSKI; SOŁOWIEJ, 2021). É comum a usar protease para desdobrar a matriz polissacarídica para liberar e fracionar a proteína maior em proteínas menores e solúveis (JAYAPRAKASH; BAINS; CHAWLA; FOGARASI *et al.*, 2022). Através destas características do perfil proteico do arroz, é possível considerar que os tratamentos enzimáticos aplicados às proteínas da vinhaça de arroz possam sofrer limitações de caráter difusional, visto que enzimas hidrolíticas atuam preferencialmente em meios contendo água, e podem sofrer instabilidades estruturais em suas cadeias polipeptídicas quando expostas a um meio hidrofóbico (como é o caso das frações de micelas formadas pela carga lipídica advinda das organelas celulares, parede celular e metabolismo das leveduras), e, como mencionado, boa parte do conteúdo proteico do arroz permanecerá inacessível, (integrando a fração hidrofóbica) às proteases.

As concentrações de 16 aminoácidos presentes nas 4 amostras de hidrolisados e as porcentagens relativas ao total analisado foram apresentadas na Tabela de quantificação. O Hidrolisado que mais apresentou concentração de aminoácidos livres foi o HBTP, com um somatório de 388,4  $\mu\text{mol/g}$ , seguido por HP, com um total de 224,2  $\mu\text{mol/g}$ . É justo salientar que os hidrolisados com o mix PE podem apresentar valores de liberação abaixo do esperado pois os mixes em questão foi formulado para isolar frações de polissacarídeos dos conteúdos proteicos, neste caso, o foco não é necessariamente liberar aminoácidos, e sim, fracionar as macromoléculas proteicas.

TABELA DE QUANTIFICAÇÃO – QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NOS HIDROLISADOS DE VINHAÇA COM MIXS ENZIMÁTICOS

Aminoácidos	HBTP		HP		S7P		PE	
	$\mu\text{mol/g}$	% Aas						
ASP	8,3	1,6	-	-	-	-	-	-

Aminoácidos	HBTP		HP		S7P		PE	
	μmol/g	% Aas						
THR	24,5	4,7	17,2	5,1	-	-	3,7	4,7
SER+GLU+PRO*	44,9	8,6	6,3	1,9	-	-	7,8	9,9
GLY	34,4	6,6	-	-	5,4	5,5	5,1	6,5
ALA+CYS*	41,1	7,9	30,0	9,0	8,9	9,0	7,2	9,3
VAL	44,5	8,6	29,9	9,0	10,8	10,9	12,4	15,8
MET	16,4	3,2	21,0	6,3	4,6	4,6	-	-
ILE	27,0	5,2	19,2	5,8	8,3	8,4	4,8	6,1
LEU	38,1	7,3	21,9	6,6	10,8	11,0	6,6	8,5
TYR	24,1	4,6	25,9	7,8	6,0	6,0	4,8	6,1
PHE	23,5	4,5	19,1	5,7	12,6	12,8	3,7	4,7
HIS	37,3	7,2	35,8	10,7	6,4	6,5	5,0	6,4
LYS	24,3	4,7	15,1	4,5	6,3	6,3	5,0	6,4
Σ	388,4	100,0	224,2	100,0	80,1	100,0	66,0	100,0

\* Aminoácidos quantificados em conjunto.

Com essa análise, ficou estabelecido que o hidrolisado proteico com o mix HBTP é o que mais expressou as moléculas alvo, os aminoácidos. Nos testes por subsequentes, foi utilizado esta fração para avaliar o potencial dos hidrolisados.

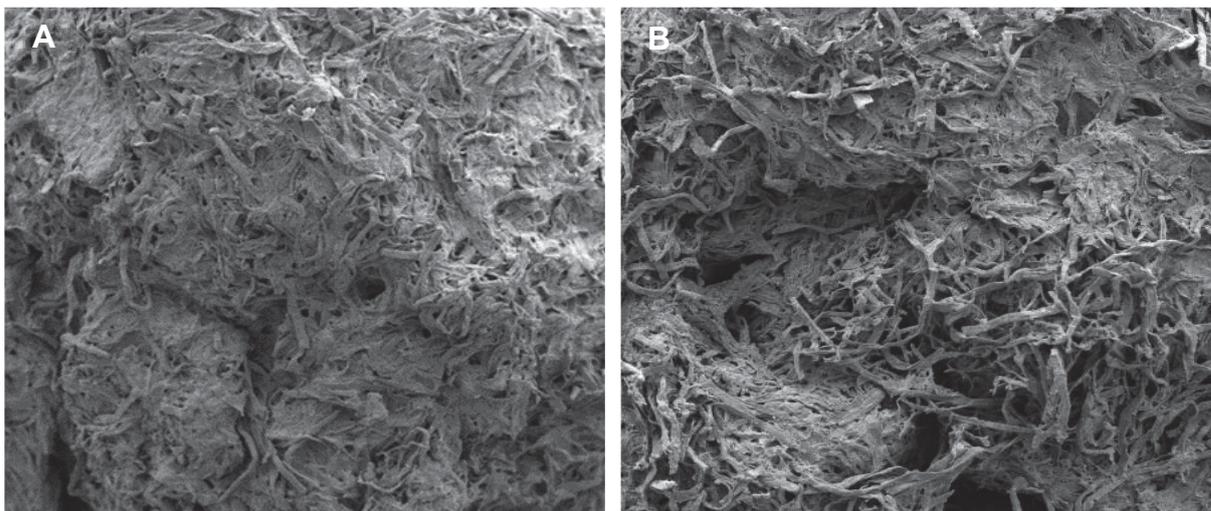
#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de microscopia foram realizadas de forma a comparar o suporte de imobilização, antes e após imobilização enzimática, em meio aquoso e finalmente após o tratamento com a solução de quitosana. A MEV permite observar a estrutura detalhada do suporte e perceber as nuances das mudanças estruturais que os tratamentos conferiram ao mesmo.

Nas Figuras 9 e 10 são apresentadas imagens de MEV do suporte de imobilização, em aumento de 100x. Na Figura 9a, é apresentada a estrutura tridimensional do suporte enzimático na sua forma original, sendo possível observar a forma compactada das fibras do material, bem como sua característica amorfa. A disposição e características das fibras são decorrentes do processamento realizado no material vegetal original para produzir o suporte lignocelulósico (tecnologia em fase de patenteamento pela Bio4). Na Figura 9b, é apresentada a estrutura do suporte após processo de imobilização enzimática, passando pelo contato com meio aquoso (tampão fosfato). É possível observar uma modificação na estrutura tridimensional do

suporte. As fibras se encontram mais espaçadas, alterando a compactação do material, porém mantendo o caráter amorfo no que diz respeito a estrutura das fibras.

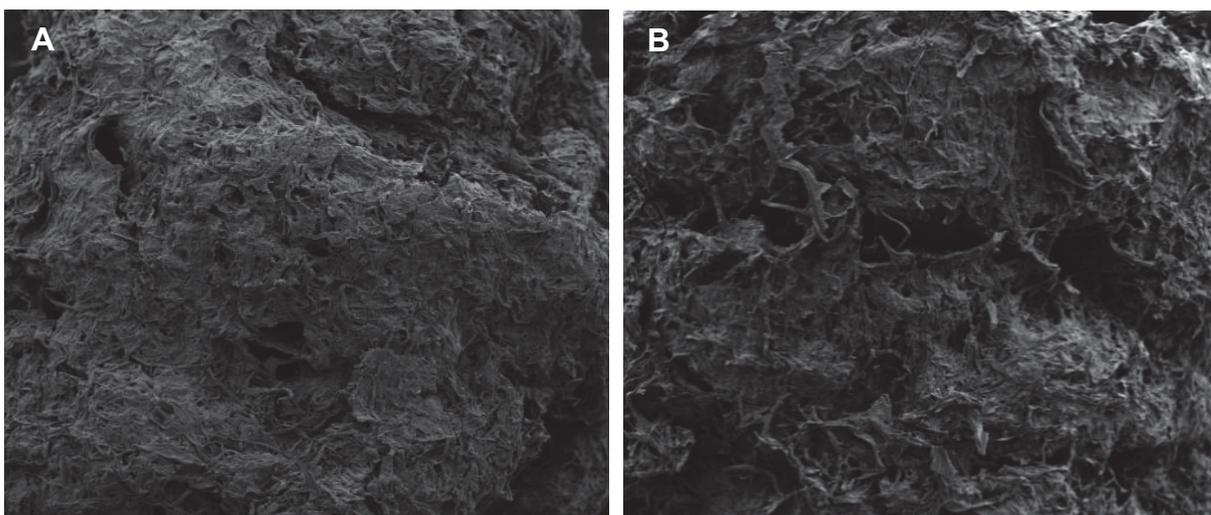
FIGURA 9: MEV DO SUPORTE LIGNOCELULÓSICO ANTES E APÓS IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA



NOTA: A: Suporte lignocelulósico; B: Suporte após imobilização enzimática.

Na Figura 10 são apresentados os suportes de imobilização antes (Figura 10a) e após (Figura 10b) o processo de imobilização, envolvidos em um biofilme de quitosana. O processo de biofilme é necessário para manter o suporte parcialmente íntegro durante a subsequente hidrólise proteolítica em meio aquoso. O biofilme de quitosana auxiliou na compactação das fibras, diminuindo o espaçamento entre as mesmas quando em contato com meio aquoso, como pode ser observado na Figura 10b em relação a Figura 9b.

FIGURA 10: MEV DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO E COM ENZIMAS IMOBILIZADAS, APÓS APLICAÇÃO DE BIOFILME DE QUITOSANA



NOTA: A: Suporte + biofilme de quitosana; B: Suporte com enzima imobilizada + biofilme de quitosana.

Os materiais lignocelulósicos como suporte para imobilização de enzimas, pertencem a uma das classes mais amplamente utilizadas de suportes naturais (D'Souza & Godbole, 2012). Os suportes orgânicos usados para a imobilização enzimática devem possuir alta resistência química, mecânica e microbiana, termoestabilidade e durabilidade química, baixo custo e regenerabilidade. Atualmente, existe um grande interesse nessa tipologia de suporte, principalmente por serem ecologicamente corretos (Costa, 2015).

#### 4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

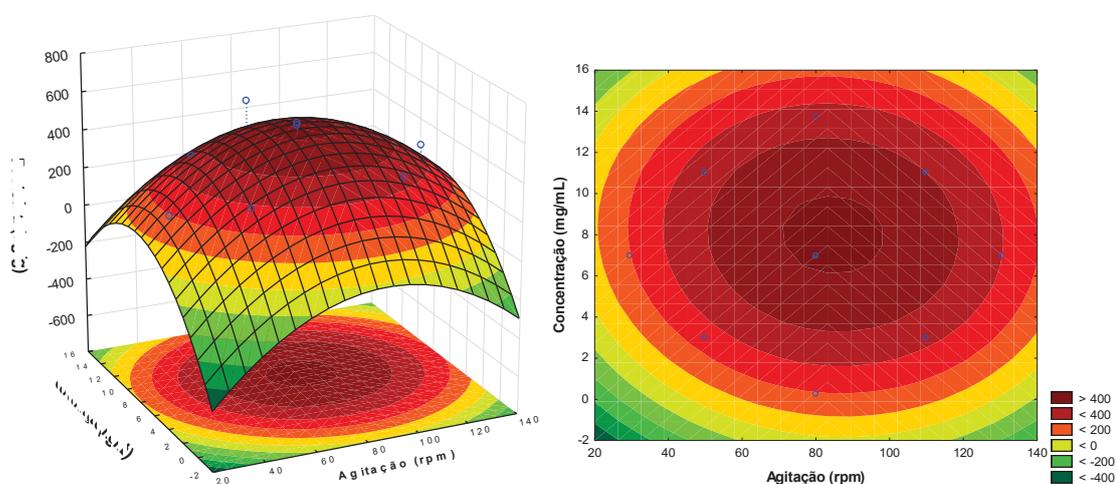
Os resultados do DCCR expressos na forma das curvas de superfície evidenciaram quais foram as melhores condições para a adsorção enzimática nos arcabouços físicos das fibras lignocelulósicas. É essencial, para a compreensão destes resultados, evocar as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde é possível identificar que há uma dilatação das fibras lignocelulósicas do material mediante exposição ao meio aquoso. É possível observar, também, que a combinação do meio aquoso com a agitação vigorosa acaba por destruir a estrutura tridimensional do suporte.

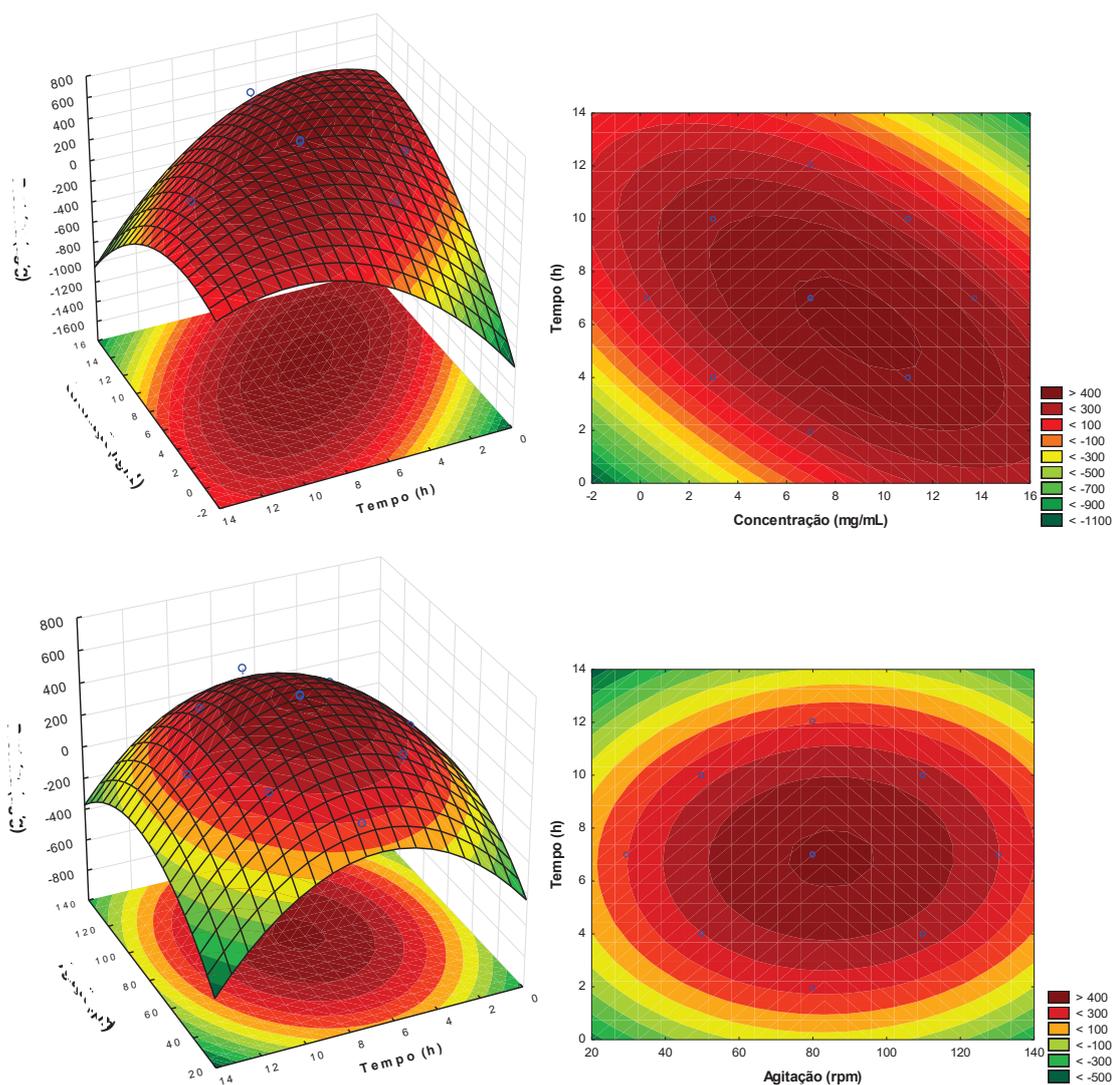
Sendo assim, o DCCR visou encontrar os valores ótimos para que o aprisionamento das enzimas na matriz porosa pudesse ser maximizado. O fator resposta foi mensurado por  $\mu\text{g}$  de proteínas (dosadas por Bradford), após moagem do suporte. Foi encontrado então que os pontos centrais resultaram sempre nos melhores resultados para todos os parâmetros testados (FIGURA 11). Observa-se, com exceção do valor de concentração quando comparado ao tempo, que os valores extremos, simulados através da equação quadrática que o modelo fornece, e mesmo nos pontos axiais do DCCR, que estes resultam em valores abaixo dos pontos centrais. Isso se deve ao fato de que com maior agitação e tempo de contato com o

meio aquoso, as fibras do suporte acabam por não manter a adsorção máxima quando parte da estrutura tridimensional do suporte se desfaz no meio aquoso agitado.

Estes resultados foram utilizados para determinar a metodologia para imobilizar o mix HBTP de enzimas no suporte lignocelulósico, a partir deste método, foi produzido as amostras de vinhaça hidrolisada (HV), utilizadas neste trabalho. Como ficou demonstrado, os melhores valores de agitação ficam entre 70 rpm e 100 rpm, sendo o valor ótimo de 82 rpm. Para o tempo ótimos em que a solução enzimática deve ficar em contato com o suporte, o valor ótimo é de 6h. Já para a concentração ideal de proteínas, a melhor solução fica em 8 mg/mL.

FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA A VARIÁVEL TEOR DE PROTEÍNA EM FUNÇÃO DA AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO (A),(B), TEMPO E CONCENTRAÇÃO (C),(D) E AGITAÇÃO E TEMPO (E),(F)





#### 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS DA VINHAÇA DE ARROZ

A FIGURA 12 compara as três melhores atividades antioxidantes dos extratos liofilizados de vinhaça hidrolisada com as respectivas enzimas e mix que são nome às amostras (mix HP, enzimas P100 e 7089), com os dois controles positivos (BHT e Trolox).

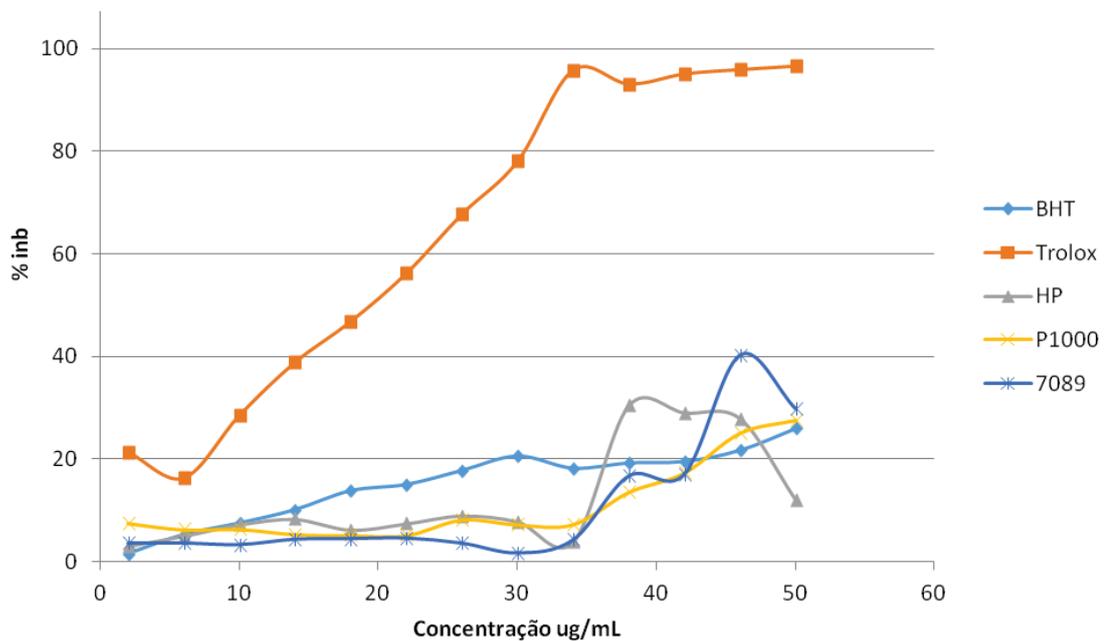
Observa-se que as frações HP, P100 e 7089 atingiram valores de inibição equivalentes em relação a porcentagem de inibição do controle positivo BHT, atingindo valores ótimos numa concentração de 50 $\mu$ g/mL para P100 e HP, e 45 $\mu$ g para 7089. Apesar dessas amostras não terem atingido aos valores de inibição encontrados para o Trolox, considera-se que os dos hidrolisados da vinhaça de arroz

não foram purificados e conseqüentemente as frações purificadas dos mesmos poderiam apresentar atividades antioxidantes muito mais elevadas.

Os peptídeos antioxidantes são um tipo de peptídeo curto de alta atividade, rico em aminoácidos e de fácil absorção pelo organismo. Os peptídeos antioxidantes funcionam impedindo a formação de radicais livres, a eliminação de radicais livres e oxigênio ativo devido à capacidade de sequestro de elétrons pelas cadeias laterais de aminoácidos presentes nos peptídeos (CHEN; NING; JIAO; XU *et al.*, 2021; VECOLI; BORGHINI; FOFFA; AIT-ALI *et al.*, 2016; WANG; HAGEMANN; MESSING; FEANY, 2016). Alguns aminoácidos são melhores candidatos a desempenhar atividades antioxidantes nos extratos de hidrolisado da vinhaça de arroz, como são os exemplos da glicina, arginina (FANG; YANG; WU, 2002; LI; YIN; LI; KIM *et al.*, 2007).

Além disso, os hidrolisados testados são formados por produtos naturais, o que representa boa vantagem na indústria alimentícia, isto é, se comparadas aos dois controles positivos (produtos sintéticos). Com as novas demandas por produtos naturais, frações proteicas hipoalergênicas como é o caso das proteínas do arroz, ainda ganham visibilidade por terem atividade nutracêutica. Estes hidrolisados antioxidantes viáveis é o baixo custo empregado na sua produção, pois podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais, sem valor de mercado. Peptídeos antioxidantes de alimentos são considerados seguros e compostos saudáveis com baixo peso molecular, baixo custo, alta atividade, fácil absorção (FREITAS; ANDRADE; SILVA; ROCHA-SANTOS *et al.*, 2013; SARMADI; ISMAIL, 2010).

FIGURA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (% DE INIBIÇÃO) DOS HIDROLISADOS DE VINHAÇA DE ARROZ OBTIDOS COM DIFERENTES ENZIMAS

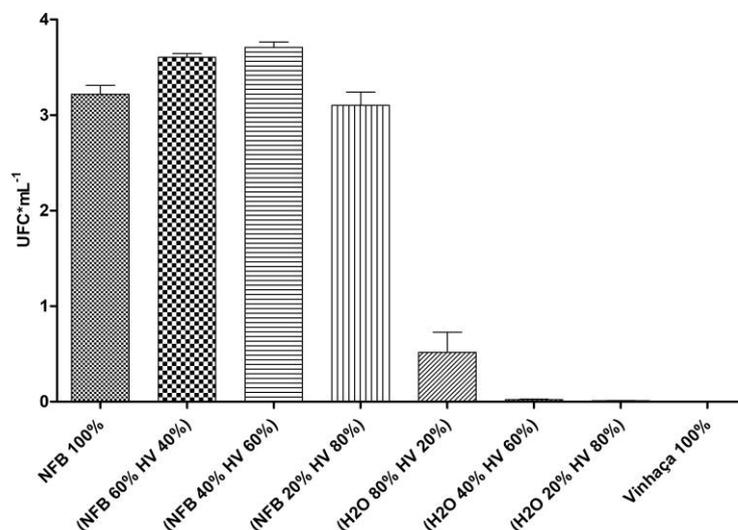


#### 4.7 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Azospirillum brasilense* EM MEIO NFB SUPLEMENTADO COM HIDROLISADO DE VINHAÇA DE ARROZ

Cereais fornecem metade da oferta diária de proteína per capita do mundo, e o arroz possui qualidade de proteína somente inferior à aveia, em termos de variedade de aminoácidos (Burks e Helm, 1994; Chandi e Sogi, 2007). Naturalmente, hidrolisados das proteínas presentes na vinhaça do álcool de arroz, serão boas fontes de nutrientes para fermentações, tanto pela disponibilidade de aminoácidos livres, e peptídeos, mas também por apresentar, como é comum em vinhaças, açúcares residuais da fermentação anterior, feita com *Saccharomyces cerevisiae*.

Pretendendo avaliar a capacidade nutritiva do hidrolisado da vinhaça (HV) para o cultivo de micro-organismos, planejou-se um experimento visando substituição, total ou parcial, do meio padrão sintético (NFB), por HV em cultivos da bactéria *Azospirillum brasilense* (FIGURA 13).

FIGURA13: CRESCIMENTO DO *Azospirillum brasilense* EM MEIOS MISTOS DE HV E MEIO SINTÉTICO NFB



Observou-se que a suplementação do meio sintético NFB com HV foi positiva nas três primeiras concentrações, obtendo os melhores resultados de crescimento bacteriano com 40 e 60% de HV. Já quando é utilizado somente água, acrescida de HV, os resultados foram bem inferiores ao do meio padrão NFB 100%, sendo que para todas as concentrações utilizadas, somente a que foi acrescida 20% de HV obteve algum crescimento celular.

Ficou evidente a necessidade de uma suplementação maior em termos de nutrientes essenciais para o crescimento de *A. brasilense*. As concentrações de açúcares redutores presentes no hidrolisado da vinhaça, não correspondem a padrões estabelecidos para o cultivo de *A. brasilense*.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HV COM FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E FÓSFORO PARA CRESCIMENTO DE *Azospirillum brasilense*.

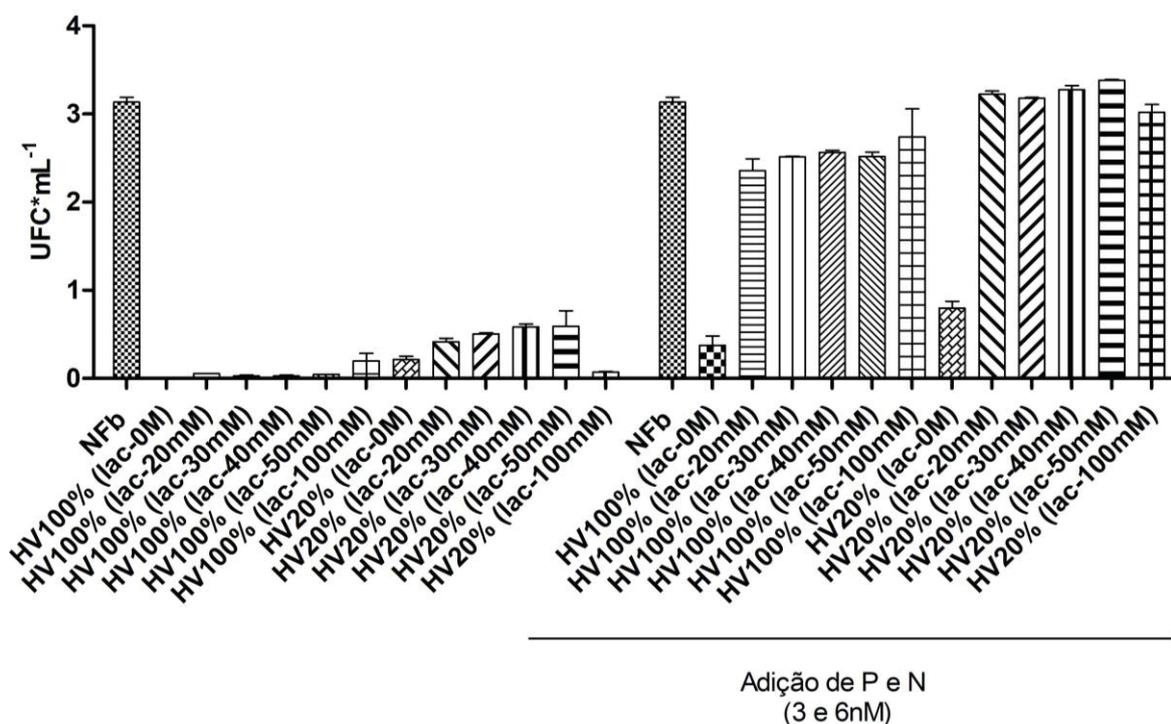
A partir do resultado apresentado no item anterior, buscou-se avaliar a demanda por suplementação (fontes de carbono e elementos inorgânicos) em HV. Tendo como base o estudo realizado por DöBereiner et al. (1995), onde se chegou a um meio sintético (NFB), com bons resultados de crescimento para algumas rizobactérias, dentre elas *A. brasilense*, foi idealizado um experimento para identificar as carências nutricionais do hidrolisado de vinhaça de arroz. Então, como

mencionado, variou-se a concentração de carbono (lactato), assim como a adição ou não de P e N.

Os resultados experimentais demonstraram uma dependência de suplementação do meio HV com pelo menos uma das fontes de nutrientes P e N, visto que as células cresceram pouco no primeiro bloco experimental, em relação ao segundo bloco, onde foram adicionadas as fontes minerais (P e N). Também foi possível observar que o meio HV100% (concentração alta) desfavorece o crescimento em relação ao meio HV20% (concentração baixa), sendo que esse segundo ultrapassou, em número de células, o próprio controle positivo, acentuando o fato de que com menos quantidade de carbono, atinge valores superiores aos do controle (no meio NFb utiliza-se uma concentração de 55 mM de lactato de sódio). Observou-se então que com uma adição de 40% do valor da fonte de carbono do controle, como foi o caso de HV20% (lac-20 mM) no segundo bloco experimental, onde o meio formulado apresenta um melhor resultado do que o controle positivo e não se diferencia estatisticamente das formulações do próprio HV20% (FIGURA 14).

Conclui-se com este experimento que HV necessita de acréscimos de fonte de carbono e de fontes de P e N para poder substituir totalmente ao meio sintético e promover um bom crescimento celular. Além disso, é notório, que é possível diminuir as cargas de lactato disponíveis, com o meio formulado.

FIGURA 14: CRESCIMENTO DE *Azospirillum brasilense* EM MEIOS MISTOS DE HV E NFB, ADITIVADOS COM FONTE DE CARBONO (LACTATO), FOSFORO (P) E NITROGENIO (N)



#### 4.9 SUBSTITUIÇÃO DA FONTE DE CARBONO DE LACTATO PARA MELAÇO DE CANA

O melaço de cana é um subproduto da indústria açucareira, que consiste de aproximadamente 50% (p/p) de açúcares totais (sacarose, glucose e frutose), colóides suspensos, metais, vitaminas e compostos nitrogenados (Kotzamanidis et al., 2002; Najafpour e Shan, 2003).

O melaço de cana remonta seu uso em fermentações na tecnologia de panificação, onde era utilizado na produção comercial de levedura para propagação das células e também como ingrediente (White, 1954; Gouda et al., 2001).

Sendo um subproduto importante nas fábricas de açúcar, por ter alto valor comercial como matéria-prima, é bem explorado na indústria de fermentações, tanto para a produção de aminoácidos, álcool, leveduras, dentre outras (Sirianuntapiboon e Prasertsong, 2008; Yan et al., 2012). Essas fábricas, que geram este efluente (podendo ser produzido à partir de diversos tipos de álcool), o produzem em grande quantidade, e sempre contendo alto nível de demanda química de oxigênio (COD) na faixa de 80.000 a 130.000 mg/L (Onodera et al., 2013). Deste modo, torna-se uma das águas residuais mais poluentes da indústria alimentícia, por outro lado, foi descrito

que as águas residuais de melaço podem acelerar o crescimento bacteriano, já que possuem altos teores de matéria orgânica assimilável (Sohsalam e Sirianuntapiboon, 2008; Wang e Jin, 2009; Avci et al., 2014; Ren et al., 2018).

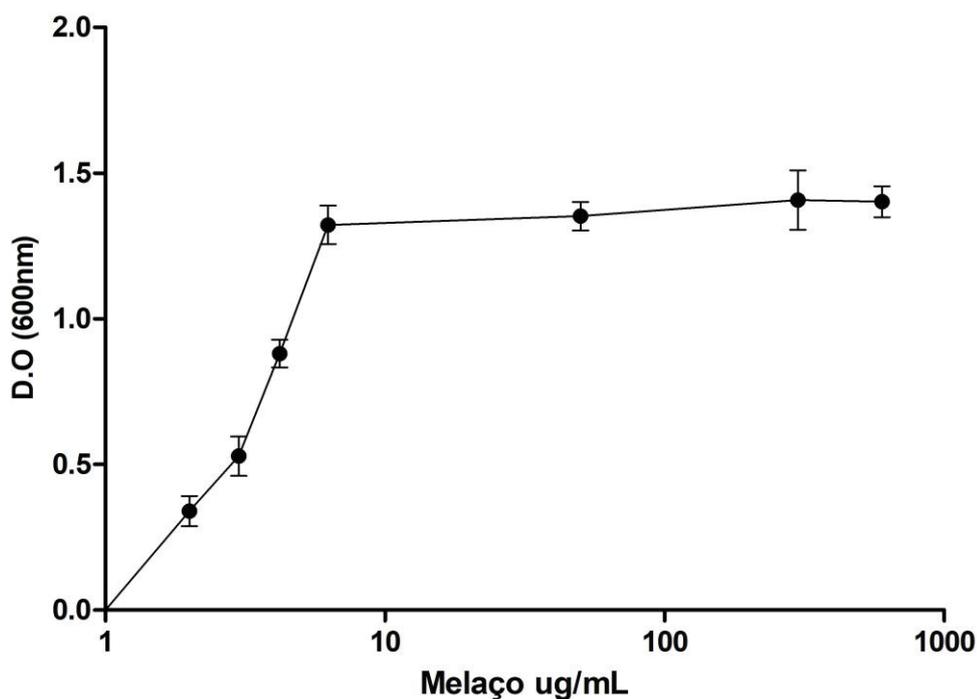
Apesar de haver uma grande exploração do uso do melaço em diversos tipos de fermentações, esta fonte de carbono foi pouco explorada em fermentações de bactérias promotoras de crescimento vegetal, tanto no intuito de produzir biomoléculas benéficas, ou mesmo biomassa bacteriana.

No presente trabalho várias concentrações de melaço de cana foram testadas como fonte de carbono para otimizar seu uso na produção de células de *A. brasilense* (FIGURA 15). O melaço de cana utilizado fornecido pelo fabricante continha, em sua totalidade, glucose, sacarose e frutose, sendo, em peso seco, 45,33%, 34,12% e 20,55% respectivamente.

Pode-se observar com os resultados obtidos, após as 24h de cultivo, que o número de células cresce exponencialmente da concentração 0 até a concentração 6 µg/mL (considerando as bateladas individuais). De 6 a 600 µg/mL, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na produção de células, sendo possível concluir, que o valor ideal para cultivo encontra-se em 6 µg/mL. Não foi possível concluir se acontece inibição pelo substrato nos valores testados, no entanto, comparando o crescimento entre 300 e 600, há um ligeiro decréscimo no crescimento (FIGURA 15).

Conhecendo o baixo valor de mercado do melaço de cana em relação ao lactato, torna-se uma interessante opção para cultivo ex-situ das células de *A. brasilense*. O meio contendo 6 µg/mL, possui D.O. semelhante as contagens de UFCs, utilizando lactato.

FIGURA 15: CRESCIMENTO DO *Azospirillum brasilense* QUANDO SUBSTITUÍDA A FONTE DE CARBONO POR MELAÇO DE CANA.



#### 4.10 DEFINIÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO DE *Azospirillum brasilense* E DETECÇÃO DE FITORMÔNIOS NO MEIO

Espera-se possuir, no composto HVF, indutores de crescimento vegetal, que vão desde resíduos de aminoácidos presentes na vinhaça hidrolisada (HV) a fitohormônios da fermentação, e também células de AZO viáveis para inoculação, possam agir de maneira simultânea após a fertilização.

Fitormônios são moléculas orgânicas, não nutrientes, encontrados de forma natural durante todos os estágios de desenvolvimento das plantas. São produzidos em baixas concentrações e transportados em partes diferentes nas plantas, agindo como reguladores naturais, influenciando os processos fisiológicos (Marchioro, 2005; Tarkowská *et al.*, 2014).

A produção de fitormônios por bactérias das rizosferas de plantas é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento das mesmas, como no caso da inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* (Bottini *et al.*, 1989; Radwan *et al.*, 2004). O principal, e mais relatado, hormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* é uma auxina, o ácido 3-indolacético (AIA), mas estas bactérias também produzem citocininas e giberelinas. (Crozier *et al.*, 1988; Bottini *et al.*, 1989; Cacciari

*et al.*, 1989; Radwan *et al.*, 2004). Igualmente foram reportados estudos que mostram a produção *in vitro* de ácido abscísico (ABA) pelos mesmos microrganismos (Perrig *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2008; Bashan e De-Bashan, 2010), assim como o hormônio etileno, também foi relatado, sendo excretado (Ribaudo *et al.*, 2006; Perrig *et al.*, 2007).

Muitas estirpes, mas não todas, produzem vários fitormônios *in vitro* e também em associação com plantas, mas a transferência de hormônios é provavelmente limitada e nem sempre detectada (Okon e Labandera-Gonzalez, 1994; Díaz-Zorita e Fernández-Canigia, 2009).

Neste sentido, assumindo a possibilidade da estirpe FP2 excretar fitormônios em meios alternativos, de maneira *in vitro*, foi possível avaliar as melhores condições de excreção dos fitormônios em meios à base de HV, sob condições diferentes de concentrações de nutrientes inorgânicos e fonte de carbono.

Foi observado em relação à concentração de vinhaça, a adição da suplementação. Observou-se que os valores testados atingiram bons valores de crescimento celular após as 24h do experimento, acentuando-se o fato de que a suplementação em V10 foi ligeiramente inferior. As outras concentrações de vinhaça mantiveram um padrão de crescimento. Destaca-se o crescimento celular em V20 [100% | (1:400)] o maior valor obtido dentre todas as amostras (Tabela 6).

O fator de crescimento celular não está correlacionado a uma maior presença de fitormônios, visto que os frascos contendo 20% de vinhaça hidrolisada não apresentou maiores quantidades em nenhum dos fitormônios quantificados (tabelaXX valores fito). Essa determinação, no entanto, pode ser assertiva para encontrar futuras moléculas alvo relacionadas ao crescimento da cultura de AZO FP2.

TABELA D.O: DENSIDADE ÓTICA PARA CRESCIMENTO DO *Azospirillum brasilense* EM MEIOS MISTOS DE HV E NFB, UTILIZANDO LACTATO COMO FONTE DE CARBONO

Suplementação	V10	V20	V30	V40
50%   (1:400)	0,84 ( $\pm 0,04$ )	0,97 ( $\pm 0,02$ )	1,07 ( $\pm 0,04$ )	0,99 ( $\pm 0,05$ )
50%   (1:8)	0,81 (0,03)	0,96 ( $\pm 0,02$ )	0,86 ( $\pm 0,04$ )	1,04 ( $\pm 0,05$ )
75%   (1:400)	0,90 ( $\pm 0,05$ )	0,97 ( $\pm 0,05$ )	0,99 ( $\pm 0,11$ )	1,05 ( $\pm 0,04$ )
75%   (1:8)	0,65 ( $\pm 0,04$ )	0,93 ( $\pm 0,05$ )	1,02 ( $\pm 0,06$ )	1,03 ( $\pm 0,04$ )
100%   (1:400)	0,96 ( $\pm 0,05$ )	1,13 ( $\pm 0,03$ )	1,01 ( $\pm 0,04$ )	1,05 ( $\pm 0,05$ )
100%   (1:8)	0,87 ( $\pm 0,04$ )	0,99 ( $\pm 0,06$ )	1,05 ( $\pm 0,03$ )	1,03 ( $\pm 0,04$ )

Segundo, com o intuito de identificar a produção de fitormônios nas formulações de meio testadas, e observar as influências das variações desses elementos na produção dos mesmos, foram analisadas por UHPLC-MS objetivando identificar e quantificar a presença dos fitormônios, foi microfiltrado o sobrenadante do meio de cultivo, e as amostras foram analisadas com e sem realização de um processo de sonicação, para que se pudesse avaliar o potencial de excreção e de produção endógena dos fitormônios. Para isso, padrões de diferentes fitormônios foram analisados para determinar seus respectivos tempos de retenção e íons moleculares (Tabela 7). As 24 amostras foram analisadas por UHPLC-MS, a identificação dos fitormônios de cada amostra foi realizada por comparação com os íons moleculares e tempos de retenção dos padrões e a quantificação através da curva de calibração de cada padrão (Tabela 8).

TABELA QUANTIFICAÇÃO DE FITORMONIOS – PARAMETROS DOS PADRÕES DE FITORMÔNIOS PARA ANÁLISE EM HPLC

<b>PADRÕES DE FITORMÔNIOS</b>	<b>PESO MOLECULAR (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ÍON MOLECULAR* [M+H]<sup>+</sup> m/z</b>	<b>TEMPO DE RETENÇÃO (min)</b>
<i>trans</i> -Zeatina (Z) - C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O	219,112	220,1198	3,26
Dihidrozeatina (DZ) C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	221,1277	222,1355	3,42
Zeatina ribosídeo (ZR) C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	351,1543	352,1621	4,61
Dihidrozeatina ribosídeo (DZR) C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	353,1699	354,1777	4,62
Cinetina (K) - C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O	215,0807	216,0885	4,67
Isopenteniladenina (iP) C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub>	203,1171	204,1249	5,83

Benziladenina (BA) $C_{12}H_{11}N_5$	225,1014	226,1093	6,36
Cinetina ribosídio (KR) $C_{15}H_{17}N_5O_5$	347,123	348,1308	6,43
Ácido Giberélico (GA3) - $C_{19}H_{22}O_6$	346,1416	347,1495	7,20
Benziladenosina (BAR) $C_{17}H_{19}N_5O_4$	357,1437	358,1515	7,98
Ácido indol acético (AIA) - $C_{10}H_9NO_2$	175,0633	176,0712	8,71
Ácido abscísico (ABA) - $C_{15}H_{20}O_4$	264,1362	265,1440	9,90

\* Íon molecular em modo positivo

TABELA 8: PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS POR *Azospirillum brasilense* A PARTIR DE A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Amostras HVF	AIA (ng/mL)		Z (ng/mL)		ZR (ng/mL)		DZ (ng/mL)	
	Normal	Sonicado	Normal	Sonicado	Normal	Sonicado	Normal	Sonicado
V10/50%/(1:8)	1443,7	1521,9	n/c	n/c	198,92	173,94	n/c	n/c
V10/50%/(1:400)	1324,3	1769,1	n/c	n/c	202,13	215,98	n/c	n/c
V10/75%/(1:8)	910,68	1040,1	n/c	n/c	192,48	167,67	n/c	n/c
V10/75%/(1:400)	1434,8	1706,5	n/c	n/c	182,95	200,81	n/c	n/c
V10/100%/(1:8)	714,1	781,62	n/c	n/c	172,94	168,36	n/c	n/c
V10/100%/(1:400)	414,33	482,5	n/c	n/c	180,63	194,47	n/c	n/c
V20/50%/(1:8)	150,76	165,44	n/c	n/c	364,24	396,05	n/c	n/c
V20/50%/(1:400)	171,41	180,4	n/c	n/c	368,71	366,83	n/c	n/c
V20/75%/(1:8)	150,7	171,51	n/c	n/c	354,96	352,58	n/c	n/c
V20/75%/(1:400)	130	142,86	n/c	n/c	352,51	334,04	n/c	n/c
V20/100%/(1:8)	150,7	163,39	n/c	n/c	344,15	288,12	n/c	n/c
V20/100%/(1:400)	157,84	152,36	n/c	n/c	321,12	322,71	n/c	n/c
V30/50%/(1:8)	164,9	192,12	n/c	n/c	486,67	254,35	n/c	n/c
V30/50%/(1:400)	161,01	160,41	n/c	n/c	362,11	358,58	n/c	n/c
V30/75%/(1:8)	144,28	158,93	n/c	n/c	354,4	496,83	n/c	n/c
V30/75%/(1:400)	146,8	162	n/c	n/c	431,17	505,71	n/c	n/c
V30/100%/(1:8)	157,91	146,45	n/c	n/c	465,64	326,15	n/c	n/c
V30/100%/(1:400)	121,97	167,45	n/c	n/c	280,24	456,84	n/c	n/c
V40/50%/(1:8)	219,29	227,03	136,08	146,71	612,92	697,48	n/c	n/c
V40/50%/(1:400)	188,29	178,29	125,23	152,86	624,89	700,74	n/c	n/c
V40/75%/(1:8)	222,92	219,76	91,28	103,41	552,32	643,23	n/c	n/c
V40/75%/(1:400)	206,17	178,43	110,47	138,65	470,23	674,12	n/c	n/c
V40/100%/(1:8)	210,68	198,17	117,05	137,04	541,78	479,75	n/c	n/c
V40/100%/(1:400)	196,81	193,57	116	123,78	525,63	577,3	n/c	n/c
NFB	487,12	430,38	n/c	n/c	n/c	n/c	11,21	12,31

n/c: não detectado

Os resultados demonstraram a presença de 3 fitormônios no sobrenadante dos meios reacionais formulados, e apenas dois no meio padrão NFb. Nas amostras contendo HV foram identificados os fitormônios ácido indol acético, trans-zeatina e zeatina ribosídeo. Os três fitormônios identificados, são citados na literatura como moléculas excretadas na rizosfera pelo *A. brasilense*. Em algumas das formulações

testadas, os rendimentos são bem expressivos, atingindo bons valores de rendimento, como é o caso de todas as formulações V10. Não foi observada diferença entre as amostras normais e sonicadas, dessa forma pode-se concluir que o microrganismo excreta as moléculas no meio formulado. Da mesma forma pode-se concluir que não há necessidade de etapa complementar de extração dessas biomoléculas.

As formulações que obtiveram o melhor resultado na produção de AIA foram as que continham suplementações em V10, em especial a denominada V10 [50% | (1:400)], aquela na qual foram utilizados os menores valores de suplementação e os menores valores de sobrenadante de vinhaça hidrolisada, o que torna o processo de produção de AIA o mais viável possível de acordo com os parâmetros testados. A suplementação do meio V10 decaiu a medida que aumentava a concentração das fontes de N e P no meio, simbolizando que o microrganismo possa preferir utilizar as fontes de nitrogênio inorgânica às orgânicas presentes em V10, inibindo assim, a utilização dos precursores essenciais para a produção dos fitormônios.

No caso da Zeatina, só foi possível detectá-la nas formulações contidas em HV40, não havendo padrão observável de variação na suplementação em relação à produtividade. O meio que mais se destacou na produção do mesmo, foi o V40 [50% | (1:400)], novamente observa-se que a baixa quantidade de suplementação acarretou em uma maior produção da biomolécula. O fato de que esse fitormônio só aparece na formulação mais alta de vinhaça hidrolisada, simboliza que seus precursores só estão disponibilizados em quantia razoável nestas concentrações por HV.

O fitormônio zeatina ribosídeo, foi detectá-lo em toda a configuração do delineamento experimental. Dessa vez havendo correlação com o aumento da quantidade de vinhaça hidrolisada no meio, para V40 foram observados os maiores valores de produção deste fitormônio, sendo possível correlacionar com a disponibilidade dos nutrientes e precursores maiores em V40. Não há correlações interpretáveis para a questão da suplementação, as variações nos valores N e P, e de melaço de cana não demonstraram efeito observável. No entanto a maior concentração encontrada de zeatina ribosídeo foi em V40 [50% | (1:400)], com valores baixos de suplementação. Neste caso, para esse fitormônio, e nesse bloco de HV40, foi possível perceber a relação crescente do processo de sonicação, com exceção de V40 [100% | (1:8)]. O que se pode correlacionar com o caráter de armazenamento que a glicosilação da Zeatina confere à molécula.

#### 4.11 EFEITO DO HIDROLISADO DA VINHAÇA DE ARROZ (HV) NO ENRAIZAMENTO DE MILHO

Estudos apontam efeitos positivos em sistemas radiculares, quando estes são submetidos a um bioestimulante no tratamento de adubação (Weber, 2010; Dos Santos *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2016). Plantas com sistemas radiculares extensos, de elevado comprimento, e raízes de menor diâmetro, apresentam uma maior capacidade para absorção de água e sais minerais disponíveis, e promovem uma exploração mais efetiva do solo, facilitando a adaptação em ambientes de baixa fertilidade com restrição de água (Machado *et al.*, 2010; Dourado Neto *et al.*, 2014). Desta forma, os bioestimulantes podem atuar como uma alternativa à aplicação de fertilizantes constantemente utilizados para estimular a produção de raízes especialmente em solos com baixa fertilidade e baixa disponibilidade de água (Ferrini e Nicese, 2002).

Sementes de alta qualidade são necessárias para o estabelecimento das lavouras, portanto, as sementes cultivadas devem ter vigor e caracteres fisiológicos relacionados (FARSHADFAR; AMJADIAN; DABIRI, 2012). A qualidade da proteína é um fator relevante para produtores e consumidores, principalmente quando a qualidade do grão determina o preço final da commodity (SILVA; STRIEDER; COSER; RAMBO *et al.*, 2005). Sendo que as características de qualidade do milho, como o conteúdo de proteína na semente, são melhoradas com o nível de nitrogênio base orgânica ou química (AMANULLAH; KHATTAK; KHALIL, 2009). Assim como doses baixas e altas de nitrogênio têm efeito adverso na qualidade do milho (STONE; SORENSEN; REID, 1998). Sem a aplicação de nitrogênio, a qualidade da germinação da semente poderá ficar extremamente prejudicada (SEBETHA; MODI; OWOEYE, 2015).

Nem todas as sementes responderão de maneira semelhante a um estímulo químico durante o processo de germinação, isso dependerá muito das necessidades iniciais da planta e também da maneira como se desenvolve, isto porque, naturalmente, as sementes já possuem reservas de nutrientes, e todo contato com substâncias exógenas pode acarretar em mudanças de vias sinalizadoras e cascatas reativas naturais nesta fase. No caso do milho, alguns macros e micronutrientes serão

benvidos em concentrações adequadas, como por exemplo, o zinco, o fosfato e o nitrogênio (COELHO; DE FRANÇA; PITTA; ALVES *et al.*, 2008).

Os PHs foram desenvolvidos para melhorar o desempenho de várias culturas hortícolas, incluindo o aumento de brotações, a biomassa e a produtividade das raízes (Kunicki *et al.*, 2010; Lisiecka *et al.*, 2011; Parađiković *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2014; Ertani *et al.*, 2014). A aplicação de PHs a folhas e raízes de plantas mostrou aumentar o metabolismo de Fe e N, a absorção de nutrientes e a eficiência do uso de água e nutrientes para macro e microelementos (Cerdán *et al.*, 2008; Ertani *et al.*, 2009; Halpern *et al.*, 2015). A maior absorção de nutrientes nas plantas tratadas com PH tem sido atribuída a (1) aumento da atividade microbiana do solo e atividades enzimáticas do solo, (2) melhoria da mobilidade e solubilidade de micronutrientes, em particular Fe, Zn, Mn e Cu, e (3) modificações na arquitetura das raízes das plantas, em particular comprimento de raízes, densidade e número de raízes laterais.

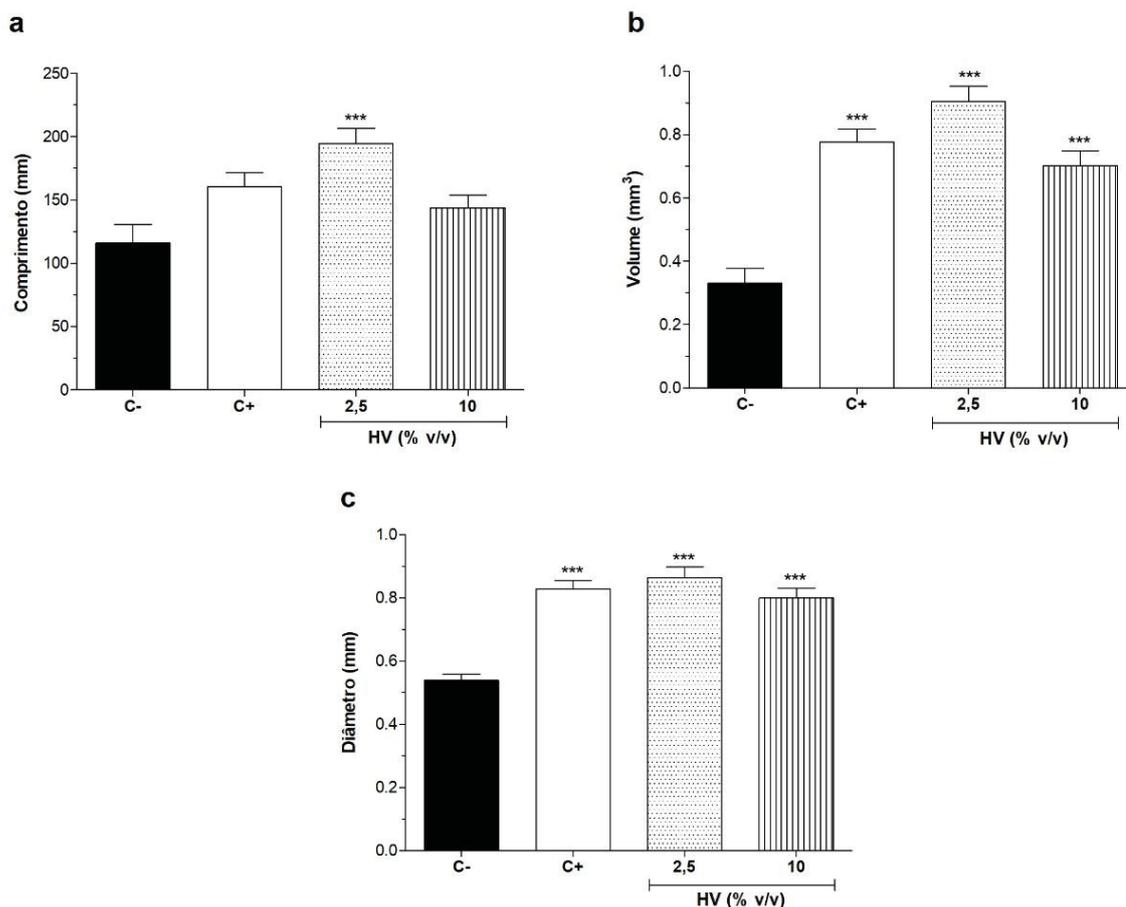
O experimento realizado para avaliar o efeito de HV como enraizador baseia-se na metodologia descrita por Egner e Hurek (1999) de análise de enraizamento de sementes do arroz, adaptado para o milho. Sementes de milho (*Zea mays* L.), previamente lavadas e esterilizadas, foram pré-germinadas em placas contendo agar e em sequência foram transferidas para tubos e estufa incubadora B.O.D (Figura 16.1).

FIGURA 16.1: CRESCIMENTO DO MILHO EM TUDOS COM AERAÇÃO



No experimento, as sementes foram ancoradas nas esferas de polipropileno para a simulação de um solo inerte, no interior de um tubo de ensaio, foram adicionados 10 mL da solução de interesse, com potencial para a estimular o enraizamento do milho. A FIGURA 16 mostra os resultados obtidos de comprimento (Fig. 16a), volume (Fig. 16b) e diâmetro (Fig. 16c) das raízes de milho quando as plantas foram tratadas com o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV).

FIGURA16: EFEITO DE HV NO DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE MILHO



Observa-se que HV produziu efeitos superiores aos obtidos para o controle negativo, apresentando diferença estatística ( $p > 0,001$ ), em todos os parâmetros analisados. Em relação ao controle positivo (produto comercial) os efeitos foram equivalentes, demonstrando um ganho expressivo de comprimento, volume e diâmetro das raízes de milho na concentração de 2,5% v/v.

#### 4.11.1.1 Avaliação do crescimento de plantas de alface (*Lactuca sativa*) utilizando HV, HVI e HVF como fertilizantes foliares

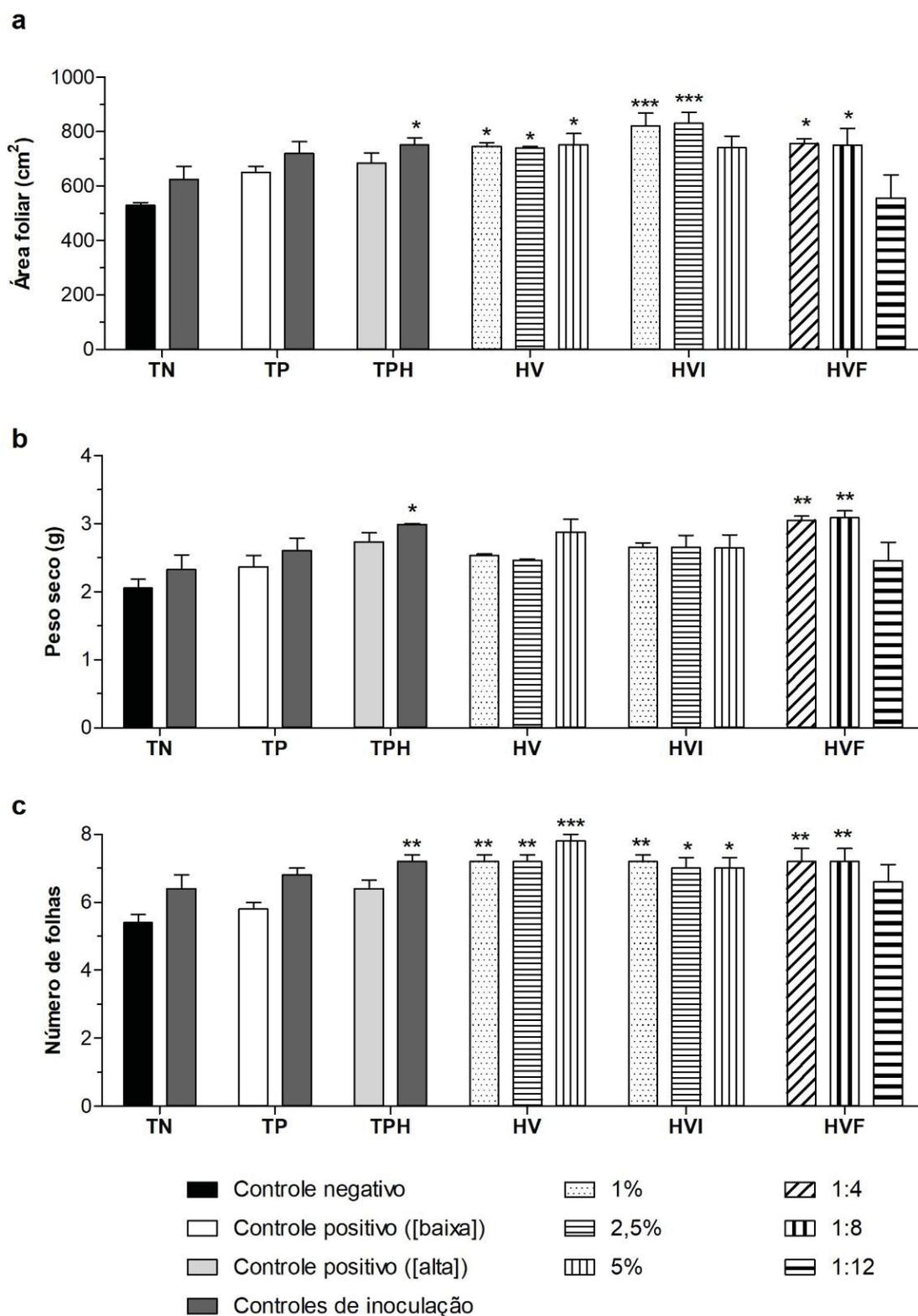
O efeito do tratamento de plantas de alface com HV, HVI e HVF como fertilizantes foliares foi avaliado. Os resultados dos testes são mostrados nas FIGURAS 17 e 18.

É possível observar um ganho em área foliar para as formulações que utilizaram inoculação de *A. brasiliense* (HVI) em relação ao à testemunha negativa (TN) com significância acima de  $p < 0,001$ . Esses ganhos podem ser correlacionados aos ganhos, descritos na literatura, derivados do sinergismo entre o microrganismo e a rizosfera do alface, como fixação de nitrogênio e produção de fitormônios.

Este benefício, não pode ser creditado exclusivamente pela inoculação, visto que a testemunha inoculada (TI), tratada somente com água pós a inoculação, obteve resultados menos expressivos do que HV.

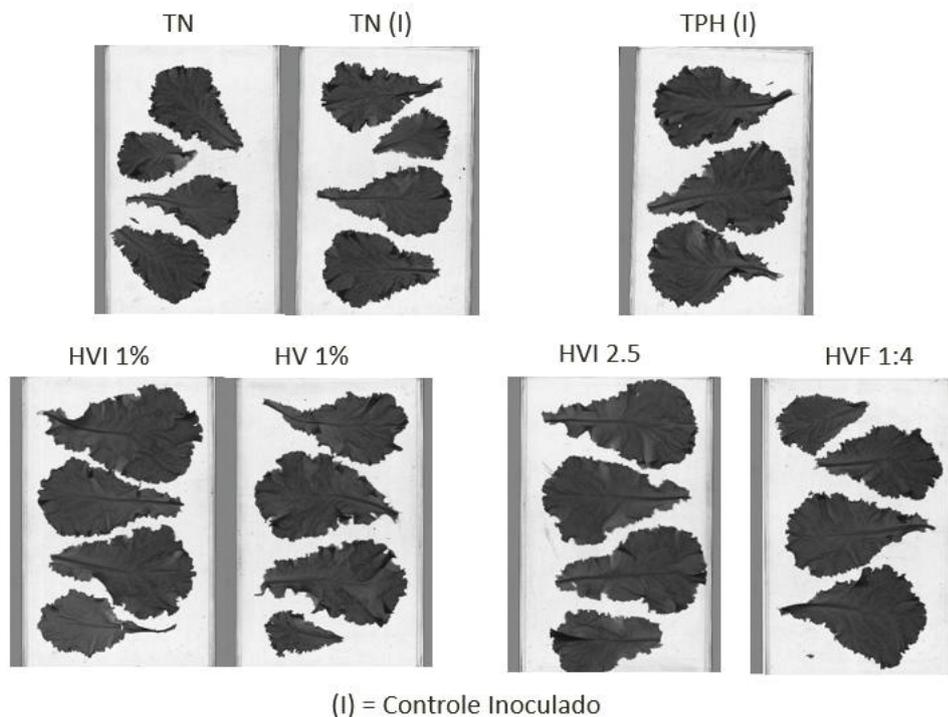
Em termos de número de folhas, a melhor formulação testada foi HV (5%) quando comparada à testemunha negativa, pode-se, então, afirmar que essa formulação estimula o nascimento e o brotamento de novas folhas. No entanto, as outras formulações testadas também tiveram significância em relação a TN, porém com menor efeito.

FIGURA 17: ANÁLISE DO DESEMPENHO DE HV, HVI E HVF PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALFACE



NOTA: A significância estatística mostrada é referente a condição controle negativo TN (ANOVA seguido de teste Tukey \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

FIGURA 18: COMPARAÇÃO DAS FOLHAS DE ALFACE DE PLANTAS TRATADAS COM HV, HVI E HVF EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Conclui-se então, que no produto HVI, as propriedades de composição do hidrolisado da vinhaça de arroz e da inoculação com o microrganismo, atuam em conjunto para o ganho de área foliar. No que diz respeito ao HVF, obteve-se resultados positivos utilizando uma fermentação prévia do hidrolisado de vinhaça de arroz e aplicando-a como fertilizante foliar, obtendo alguns ganhos superiores em peso seco, como é o peso seco de HVF 1:4 e HVF 1:8, confirmando assim, que a fermentação libera biomoléculas estimulantes para o crescimento vegetal. Estes resultados indicam que pode ser uma estratégia promissora ao invés de comercializar células viáveis de rizobactérias, minimizando situações deletérias de logística e falta de controle de qualidade.

Para HV, obteve-se uma melhor resposta com a concentração de 5%, para HVI, a melhor resposta foi atingida com a concentração de 1%, enquanto que para HVF, o melhor resultado foi atingido com a diluição 1:8. Conclui-se com esse experimento, que HV, HVI e HVF são eficazes na proposta de utilizá-los como fertilizantes foliares.

## 5 CONCLUSÕES

A imobilização enzimática para hidrólise da vinhaça de álcool de arroz se mostrou eficiente, com as enzimas isoladas garantindo entre 53–78% de conservação da atividade e o complexo enzimático garantindo até 60%.

A utilização de um sistema de imobilização duplo, também garantiu a reutilização do suporte por pelo menos 15 ciclos, o que desonera o processo de obtenção dos bioprodutos.

O planejamento experimental (DDCR) com foco na imobilização enzimática permitiu determinar as melhores condições para a imobilização, agitação: 80 rpm, concentração de enzima: 8 mg/mL e tempo: 7 h.

Aplicação do produto da hidrólise da vinhaça do arroz (HV) como meio de cultivo para micro-organismos mostrou que meio adicionado de HV (20% v/v; lac-50 mM) estimulou crescimento de *Azospirillum brasilense*. Suplementação desse meio com fontes de nitrogênio, fósforo e melaço de cana potencializaram esses resultados, atingindo valores superiores aos obtidos com o meio padrão sintético descrito para a estirpe estudada. Quantificação de fitormônios constatou que a utilização dos meios HV10 (B|C) e HV40 (B|C) estimulou a produção de AIA, zeatina e zeatina ribosídeo pelo microrganismo.

Bioensaios com diferentes culturas vegetais mostraram que os hidrolisados da vinhaça de arroz, HV (2,5% v/v) e HVI (1 e 2,5%) e HVF (1:4 e 1:8) apresentam potencial bioestimulante.

Hidrolisados enzimáticos da vinhaça do arroz demonstraram atividade antioxidante, sem necessidade de etapas adicionais de purificação.

Todos esses resultados demonstram o potencial dos hidrolisados de vinhaça de arroz, gerando opções para a indústria de álcool de cereais explorar o beneficiamento deste subproduto. Adicionalmente, a imobilização enzimática se apresentou como uma etapa de fundamental importância em relação a viabilidade do bioprocessos.

## PRODUTO DO PRESENTE TRABALHO DE TESE

Parte dos resultados do presente trabalho de Tese foi depositada na forma de **Pedido de Patente** no **Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI)** em conjunto com a empresa **Bio4-Soluções Biotecnológicas**.

Seguem as páginas 1/59 e 2/59 do referido pedido de patente intitulado:

**“Processo de obtenção de fertilizante orgânico composto e uso do fertilizante obtido”** (Protocolo **BR 10 2019 009649 7**), assim como os dados das Instituições depositantes (**UFPR e Bio4**) e o **Resumo** da mesma. Data do depósito: 13/05/2019.

---

### Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 009649 7

---

#### Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 75095679000149

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua João Negrão, 280 2o andar

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 80010-200

País: Brasil

Telefone: (41) 3360 7441

Fax: (41) 3360 7416

Email: coord.pi@ufpr.br

**Depositante 2 de 2****Nome ou Razão Social:** BIO4-SOLUÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 10144823000144**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica**Endereço:** Av. Francisco Ferreira da Cruz, 6030**Cidade:** Fazenda Rio Grande**Estado:** PR**CEP:** 83820-293**País:** BRASIL**Telefone:** (41) 996 615850**Email:** pedido@bio4.com.br**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE ORGÂNICO**Utilidade (54):** COMPOSTO E USO DO FERTILIZANTE OBTIDO**Resumo:** A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto a partir de vinhaça de arroz proveniente da produção de álcool de arroz. Para isso, o processo envolve a produção de um hidrolisado enzimático (HV) tendo como característica a presença de aminoácidos livres, valendo-se de imobilização enzimática (complexo enzimático de proteases) em matriz de celulose, para emprego ou comercialização total ou parcial, com finalidades de aplicação nas áreas de agronomia, engenharia florestal e biotecnologia. O hidrolisado enzimático pode também atuar como substrato em processos fermentativos, incorporando à composição do fertilizante, moléculas de interesse agrônomo, gerando um fertilizante enriquecido com fitormônios (HVF). Adicionalmente, o hidrolisado enzimático pode ser associado sinergicamente à um rizo-inoculante, composto por microrganismo promotor de crescimento vegetal (HVI). Os produtos resultantes do processo descrito nesta tecnologia podem atuar como fertilizante foliar, enraizador ou auxiliar de germinação.**Figura a publicar:** 01

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 13/05/2019 às 10:05, Petição 870190044605

## REFERÊNCIAS

- A MAHMOOD, W. Hydrolysis of sucrose by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. **Mesopotamia Journal of Agriculture**, 38, n. 1, p. 2-11, 2010.
- ABBAS, A.; ANSUMALI, S. Global potential of rice husk as a renewable feedstock for ethanol biofuel production. **BioEnergy Research**, 3, n. 4, p. 328-334, 2010.
- ABEER, M. M.; TRAJKOVIC, S.; BRAYDEN, D. J. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 144, p. 112275, 2021.
- ABSALAN, G.; AKHOND, M.; SHEIKHIAN, L. Partitioning of acidic, basic and neutral amino acids into imidazolium-based ionic liquids. **Amino acids**, 39, n. 1, p. 167-174, 2010.
- AMANULLAH; KHATTAK, R. A.; KHALIL, S. K. Plant density and nitrogen effects on maize phenology and grain yield. **Journal of plant nutrition**, 32, n. 2, p. 246-260, 2009.
- ANDREESCU, S.; BUCUR, B.; MARTY, J.-L. Affinity immobilization of tagged enzymes. *In: Immobilization of enzymes and cells*: Springer, 2006. p. 97-106.
- ARDAKANI, M. R.; MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17, n. 2, p. 181-192, 2011.
- BADDOEI-DALFARD, A.; SAEED, M.; KARAMI, Z. Protease immobilization on activated chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous polymers: Biochemical characterization and efficient protein waste digestion. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-20, 2022.
- BAGLIERI, A.; CADILI, V.; MONTERUMICI, C. M.; GENNARI, M. *et al.* Fertilization of bean plants with tomato plants hydrolysates. Effect on biomass production, chlorophyll content and N assimilation. **Scientia Horticulturae**, 176, p. 194-199, 2014.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *In: Advances in agronomy*: Elsevier, 2010. v. 108, p. 77-136.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORDUSA, F. Proteases in organic synthesis. **Chemical Reviews**, 102, n. 12, p. 4817-4868, 2002.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, 90, n. 1, p. 45-47, 1989.

BOYER, P. D.; KREBS, E. G. **The enzymes**. Academic Press, 1986. 0080865941.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology letters**, 31, n. 11, p. 1639, 2009.

BRAY, E.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. **BB Buchanan, W. Gruissem, & RL Jones. Maryland: American Society of Plant Physiologists**, p. 1158-1203.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, 115, n. 1, p. 151-153, 1989.

CAI, W.; URIBARRI, J.; ZHU, L.; CHEN, X. *et al.* Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111, n. 13, p. 4940-4945, 2014.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. D.; SILVA, J. D. A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotec Ciên e Desenv. IX**, 48, n. 36, p. 48-57, 2006.

CARILLO, P.; COLLA, G.; FUSCO, G.; DELL'AVERSANA, E. *et al.* Morphological and Physiological Responses Induced by Protein Hydrolysate-Based Biostimulant and Nitrogen Rates in Greenhouse Spinach. 08/14 2019.

CARUSO, F.; TRAU, D.; MÖHWALD, H.; RENNEBERG, R. Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules. **Langmuir**, 16, n. 4, p. 1485-1488, 2000.

CASADESÚS, A.; PÉREZ-LLORCA, M.; MUNNÉ-BOSCH, S.; POLO, J. An Enzymatically Hydrolyzed Animal Protein-Based Biostimulant (Pepton) Increases Salicylic Acid and Promotes Growth of Tomato Roots Under Temperature and

Nutrient Stress. **Frontiers in Plant Science**, 11, n. 953, 2020-July-01 2020. Original Research.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O. *et al.* Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L.). **European Journal of soil biology**, 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. **Química Nova**, 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; DE ALMEIDA FELIPE, M. D. G. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, 6, n. 2, 2009.

CHEN, M.-L.; NING, P.; JIAO, Y.; XU, Z. *et al.* Extraction of antioxidant peptides from rice dreg protein hydrolysate via an angling method. **Food Chemistry**, 337, p. 128069, 2021.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, 7, n. 5, p. 376, 2012.

CHEW, L. Y.; TOH, G. T.; ISMAIL, A. Application of Proteases for the Production of Bioactive Peptides. *In: Enzymes in Food Biotechnology*: Elsevier, 2019. p. 247-261.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Current opinion in biotechnology**, 12, n. 2, p. 180-187, 2001.

COELHO, A. M.; DE FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C. *et al.* Fertilidade de solos: nutrição e adubação do milho. **Embrapa Milho e Sorgo- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

COLEMAN-DERR, D.; TRINGE, S. G. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. **Frontiers in microbiology**, 5, p. 283, 2014.

COLLA, G.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; ROUPHAEL, Y. Foliar applications of protein hydrolysate, plant and seaweed extracts increase yield but differentially modulate fruit quality of greenhouse tomato. **HortScience**, 52, n. 9, p. 1214-1220, 2017.

COLLA, G.; HOAGLAND, L.; RUZZI, M.; CARDARELLI, M. *et al.* Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. **Frontiers in Plant Science**, 8, n. 2202, 2017-December-22 2017. Review.

COLLA, G.; NARDI, S.; CARDARELLI, M.; ERTANI, A. *et al.* Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, 196, p. 28-38, 2015.

- COLLA, G.; ROUPHAEL, Y.; CANAGUIER, R.; SVECOVA, E. *et al.* Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. **Frontiers in plant science**, 5, p. 448, 2014.
- COLUSSE, G. A.; SANTOS, A. O.; RODRIGUES, J. M.; BARGA, M. C. *et al.* Rice vinasse treatment by immobilized *Synechococcus pevalekii* and its effect on *Dunaliella salina* cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 44, n. 7, p. 1477-1490, 2021.
- COOK, R. J. Advances in plant health management in the twentieth century. **Annual review of phytopathology**, 38, n. 1, p. 95-116, 2000.
- CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, 2, n. 2, p. 111, 1992.
- COTTA, M. S. Estudo de associação de genômica ampla de interação entre *Bacillus pumilus* TUAT-1 e *Arabidopsis thaliana*.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M. *et al.* Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54, n. 11, p. 2833-2837, 1988.
- CUPP-ENYARD, C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 19, p. e899, 2008.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, 3, n. 1, p. 1-9, 2013.
- DE LIMA, S. L. T.; DE JESUS, M. B.; DE SOUSA, R. R. R.; OKAMOTO, A. K. *et al.* Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. 2008.
- DE MELO BRITES, M.; CERÓN, A. A.; COSTA, S. M.; OLIVEIRA, R. C. *et al.* Bromelain immobilization in cellulose triacetate nanofiber membranes from sugarcane bagasse by electrospinning technique. **Enzyme and Microbial Technology**, 132, p. 109384, 2020.
- DE QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; DA SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M. *et al.* Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Ceres**, 61, n. 2, 2015.
- DEI PIU, L.; TASSONI, A.; SERRAZANETTI, D. I.; FERRI, M. *et al.* Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. **Food chemistry**, 155, p. 199-206, 2014.
- DEMIRKAN, E.; AVCI, T.; AYKUT, Y. Protease immobilization on cellulose monoacetate/chitosan-blended nanofibers. **Journal of Industrial Textiles**, 47, n. 8, p. 2092-2111, 2018.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. Academic press, 1960. 0121227103.

DOS SANTOS, J. D.; DA SILVA, A. L. L.; DA LUZ COSTA, J.; SCHEIDT, G. N. *et al.* Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **Journal of environmental management**, 114, p. 8-12, 2013.

DUDITS, D.; TÖRÖK, K.; CSERI, A.; PAUL, K. *et al.* Response of organ structure and physiology to autotetraploidization in early development of energy willow *Salix viminalis*. **Plant physiology**, 170, n. 3, p. 1504-1523, 2016.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M., 1995, Berlin, Heidelberg. **Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops**. Springer Berlin Heidelberg. 3-14.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic Expression of nif Genes of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in Rice Roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, 12, n. 9, p. 813-819, 1999.

EL-ZAIAT, H. M.; RÉ, D. D.; PATINO, H. O.; SALLAM, S. M. Assessment of using dried vinasse rice to replace soybean meal in lambs diets: In vitro, lambs performance and economic evaluation. **Small Ruminant Research**, 173, p. 1-8, 2019.

ELCHINGER, P.-H.; DELATTRE, C.; FAURE, S.; ROY, O. *et al.* Immobilization of proteases on chitosan for the development of films with anti-biofilm properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 72, p. 1063-1068, 2015.

ERTANI, A.; CAVANI, L.; PIZZEGHELLO, D.; BRANDELLERO, E. *et al.* Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. **Journal of plant nutrition and soil science**, 172, n. 2, p. 237-244, 2009.

ERTANI, A.; NARDI, S.; FRANCIOSO, O.; SANCHEZ-CORTES, S. *et al.* Effects of Two Protein Hydrolysates Obtained From Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Spirulina platensis* on *Zea mays* (L.) Plants. **Frontiers in Plant Science**, 10, n. 954, 2019-July-25 2019. Original Research.

ERTANI, A.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; SAMBO, P. *et al.* *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. **Frontiers in plant science**, 5, p. 375, 2014.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and soil**, 364, n. 1-2, p. 145-158, 2013.

ESFANDI, R.; WALTERS, M. E.; TSOPMO, A. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. **Heliyon**, 5, n. 4, p. e01538, 2019.

ESPANA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J. *et al.* Vinasses: characterization and treatments. **Waste management & research**, 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.

ETEMADIAN, Y.; GHAEMI, V.; SHAVIKLO, A. R.; POURASHOURI, P. *et al.* Development of animal/plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. **Journal of Cleaner Production**, 278, p. 123219, 2021.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FARSHADFAR, M.; AMJADIAN, M.; DABIRI, S. The effect of intercropping (corn and soybean) on vigor of seed corn. **Annals of Biological Research**, 3, n. 8, p. 3962-3967, 2012.

FAVARO, L.; CAGNIN, L.; BASAGLIA, M.; PIZZOCCHERO, V. *et al.* Production of bioethanol from multiple waste streams of rice milling. **Bioresource technology**, 244, p. 151-159, 2017.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, 4, n. 7, 01/04 2010.

FERNÁNDEZ, V.; EICHERT, T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 28, n. 1-2, p. 36-68, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FREITAS, A.; ANDRADE, J.; SILVA, F.; ROCHA-SANTOS, T. *et al.* Antioxidative peptides: Trends and perspectives for future research. **Current medicinal chemistry**, 20, n. 36, p. 4575-4594, 2013.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

GARCÍA-CARREÑO, F. L.; HAARD, N. F. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **Journal of Food Biochemistry**, 17, n. 2, p. 97-113, 1993.

GAWANDE, S. B.; PATIL, I. Utilization of Cereal Grains for Bioethanol Production: A Critical Review. **Pratibha: International Journal of Science, Spirituality, Business and Technology**, 3, n. 1, p. 60-66, 2014.

GLOBAL MARKET INSIGHTS, S. **Proteases Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Germany, UK, Italy, Russia, China, India, Japan, South Korea, Brazil, Mexico, Saudi Arabia, UAE, South Africa)**,

**Application Development Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2024.** 2017. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/proteases-market>. Acesso em: 20/04/2019.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Technoeconomic analysis of lignocellulosic ethanol. *In: Biofuels*: Elsevier, 2011. p. 123-148.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS microbiology reviews**, 18, n. 4, p. 319-344, 1996.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; DEL CARMEN OLIVER-SALVADOR, M. Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. **Biotechnology advances**, 29, n. 6, p. 983-996, 2011.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem**, 177, n. 2, p. 751-766, Feb 1949.

GRAY, E.; SMITH, D. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil biology and biochemistry**, 37, n. 3, p. 395-412, 2005.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, 14, n. 2, p. 75-107, 1994.

GROVER, A.; KAPOOR, A.; LAKSHMI, O. S.; AGARWAL, S. *et al.* Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Current Science**, p. 206-216, 2001.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L. *et al.* Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, 52, n. 2-3, p. 137-143, 2010.

GUISÁN, J. M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A. *et al.* Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. *In: Immobilization of enzymes and cells*: Springer, 1997. p. 261-275.

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. **International journal of food microbiology**, 232, p. 134-143, 2016.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, 2019.

HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M.; MINZ, D. *et al.* The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *In: Advances in agronomy*: Elsevier, 2015. v. 130, p. 141-174.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and bioenergy**, 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HAN, F. L.; XU, Y. Identification of low molecular weight peptides in Chinese rice wine (Huang Jiu) by UPLC-ESI-MS/MS. **Journal of the Institute of Brewing**, 117, n. 2, p. 238-250, 2011.

HASSUDA, S. **Impactos da infiltração da vinhaça de cana no Aquífero Bauru**. 1989. -, Universidade de São Paulo.

HOREMANS, S.; KONINCK, K. D.; NEURAY, J.; HERMANS, R. *et al.* Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. **Symbiosis (USA)**, 1986.

HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G. *et al.* Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 8, n. 1, p. 1-13, 2017.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum* brasilense: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E)**, 2011.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* brasilense: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 221, p. 125-131, 2016.

ITO, Y.; NAKANOMYO, I.; MOTOSE, H.; IWAMOTO, K. *et al.* Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. **Science**, 313, n. 5788, p. 842-845, 2006.

JAYAPRAKASH, G.; BAINS, A.; CHAWLA, P.; FOGARASI, M. *et al.* A Narrative Review on Rice Proteins: Current Scenario and Food Industrial Application. **Polymers**, 14, n. 15, p. 3003, 2022.

JENSEN, E. S. Evaluation of automated analysis of <sup>15</sup>N and total N in plant material and soil. **Plant and Soil**, 133, n. 1, p. 83-92, 1991/05/01 1991.

KAMDEM, J. P.; TSOPMO, A. Reactivity of peptides within the food matrix. **Journal of food biochemistry**, 43, n. 1, p. e12489, 2019.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian Journal of Microbiology**, 31, n. 10, p. 881-887, 1985.

KASPARKOVA, V.; KOLOMAZNIK, K.; BURKETOVA, L.; SASEK, V. *et al.* Characterization of low-molecular weight collagen hydrolysates prepared by combination of enzymatic and acid hydrolysis. **Journal of the American Leather Chemists Association**, 2009.

KAUFFMAN, G. L.; KNEIVEL, D. P.; WATSCHKE, T. L. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. **Crop science**, 47, n. 1, p. 261-267, 2007.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V. *et al.* Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, 13, n. 8, p. 2456-2464, 2012.

KLOEPPER, J. W., 1978, **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. 879-882.

KONDO, T.; SAWA, S.; KINOSHITA, A.; MIZUNO, S. *et al.* A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. **Science**, 313, n. 5788, p. 845-848, 2006.

KOUKARAS, E. N.; PAPADIMITRIOU, S. A.; BIKIARIS, D. N.; FROUDAKIS, G. E. Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. **Molecular pharmaceutics**, 9, n. 10, p. 2856-2862, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and microbial technology**, 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KUMARI, A.; KAUR, B.; SRIVASTAVA, R.; SANGWAN, R. S. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. **Biochemistry and biophysics reports**, 2, p. 108-114, 2015.

KUNICKI, E.; GRABOWSKA, A.; SEKARA, A.; WOJCIECHOWSKA, R. The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Folia Horticulturae**, 22, n. 2, p. 9-13, 2010.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food technology (Chicago)**, 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LAN, D.; TAI, Y.; SHEN, Y.; WANG, F. *et al.* Efficient purification of native recombinant proteins using proteases immobilized on cellulose. **Journal of bioscience and bioengineering**, 113, n. 4, p. 542-544, 2012.

LAPA, K. R. Avaliação de desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, para tratamento de esgoto sanitário. **Unpublished master's dissertation**). **Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil**, 2003.

LEVIN, G.; GÓMEZ, S.; GLODOWSKY, A.; CASCONI, O. *et al.* Two-step enzymatic strategy for the synthesis of a smart phenolic polymer and further immobilization of a

$\beta$ -galactosidase able to catalyze transglycosylation reaction. **International journal of biological macromolecules**, 117, p. 264-270, 2018.

LI, P.; YIN, Y.-L.; LI, D.; KIM, S. W. *et al.* Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, 98, n. 2, p. 237-252, 2007.

LIANG, Q.; CHALAMAIAH, M.; REN, X.; MA, H. *et al.* Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, 66, n. 5, p. 1114-1120, 2018.

LUCINI, L.; MIRAS-MORENO, B.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M. *et al.* Combining Molecular Weight Fractionation and Metabolomics to Elucidate the Bioactivity of Vegetal Protein Hydrolysates in Tomato Plants. **Frontiers in Plant Science**, 11, n. 976, 2020-June-30 2020. Original Research.

LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BONINI, P. *et al.* A Vegetal Biopolymer-Based Biostimulant Promoted Root Growth in Melon While Triggering Brassinosteroids and Stress-Related Compounds. **Frontiers in Plant Science**, 9, n. 472, 2018-April-10 2018. Original Research.

LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; CANAGUIER, R. *et al.* The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, 182, p. 124-133, 2015.

MARQUES, A. C. R.; DE OLIVEIRA, L. B.; NICOLOSO, F. T.; JACQUES, R. J. S. *et al.* Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, 113, p. 54-62, 2017.

MATOS ARAÚJO, R.; FERREIRA DE ARAÚJO, A. S.; PINHEIRO LEAL NUNES, L. A.; DO VALE BARRETO FIGUEIREDO, M. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, 44, n. 9, 2014.

MAŁECKI, J.; MUSZYŃSKI, S.; SOŁOWIEJ, B. G. Proteins in food systems—Bionanomaterials, conventional and unconventional sources, functional properties, and development opportunities. **Polymers**, 13, n. 15, p. 2506, 2021.

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. **The Histochemical Journal**, 17, n. 7, p. 773-785, 1985.

MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. **Cerevisiae and Biotechnology**, 17, p. 55-56, 1992.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLÉO, M. V. R.; CRISTÓFOLI, I. Avaliação da eficiência agronômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. **Scientia Agraria**, 17, n. 3, p. 14-23, 2016.

MOE, L. A. Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. **American journal of botany**, 100, n. 9, p. 1692-1705, 2013.

MOHAMMADI, N. S.; KHIABANI, M. S.; GHANBARZADEH, B.; MOKARRAM, R. R. Improvement of lipase biochemical properties via a two-step immobilization method: Adsorption onto silicon dioxide nanoparticles and entrapment in a polyvinyl alcohol/alginate hydrogel. **Journal of Biotechnology**, 323, p. 189-202, 2020.

MORITA, T.; KIRIYAMA, S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. **Journal of food science**, 58, n. 6, p. 1393-1396, 1993.

MURTHY, P. S.; KUSUMOTO, K.-I. Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. **Food and Bioproducts processing**, 96, p. 180-188, 2015.

MUÑOZ-RUGELES, L.; GALANO, A.; ALVAREZ-IDABOY, J. R. The role of acid–base equilibria in formal hydrogen transfer reactions: tryptophan radical repair by uric acid as a paradigmatic case. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 19, n. 23, p. 15296-15309, 2017.

MYERS, S. S. Planetary health: protecting human health on a rapidly changing planet. **The Lancet**, 390, n. 10114, p. 2860-2868, 2017.

MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, 3, n. 4, p. 923-942, 2013.

NACHTIGALL, G.; NAVA, G., 2010, **Adubação foliar: fatos e mitos**. Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 87-97, 2010 ....

NARASIMHAN, K.; BASHEER, C.; BAJIC, V. B.; SWARUP, S. Enhancement of Plant-Microbe Interactions Using a Rhizosphere Metabolomics-Driven Approach and Its Application in the Removal of Polychlorinated Biphenyls. **Plant Physiology**, 132, n. 1, p. 146-153, 2003.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola**, 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. **Proteolytic enzymes: a practical approach**, p. 1-13, 1989.

NISHA, S.; KARTHICK, S. A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, 1, n. 3, p. 148-155, 2012.

OLIVEIRA, R. P.; LIMA, S. F.; ALVAREZ, R. D. C. F.; BALDANI, V. L. D. *et al.* Azospirillum brasilense INOCULATION AND MANAGEMENT OF FERTILIZER NITROGEN IN MAIZE. **BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE-Revista de Agricultura**, 93, n. 3, p. 347-361, 2019.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F. L. Cao, Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany: 2005, xv+ 563 pp.,£ 140.00, ISBN 3-527-31232-3. Elsevier 2006.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in food science & technology**, 7, n. 4, p. 120-125, 1996.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F. *et al.* Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, 98, n. 4, p. 742-748, 2006.

PAUL, K.; SORRENTINO, M.; LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y. *et al.* Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato. **Frontiers in plant science**, 10, 2019.

PECHA, J.; FÜRST, T.; KOLOMAZNÍK, K.; FRIEBROVÁ, V. *et al.* Protein biostimulant foliar uptake modeling: the impact of climatic conditions. **AIChE Journal**, 58, n. 7, p. 2010-2019, 2012.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. **Plant and soil**, 399, n. 1-2, p. 389-414, 2016.

PERRIG, D.; BOIERO, M.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C. *et al.* Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, 75, n. 5, p. 1143-1150, 2007.

PESSELA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Immobilization–stabilization of an  $\alpha$ -galactosidase from Thermus sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. **Enzyme and microbial technology**, 42, n. 3, p. 265-271, 2008.

PINTO, C. P. Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável. 1999.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes**. Springer, 2007. 1402053762.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QURESHI, A. A.; SAMI, S. A.; SALSER, W. A.; KHAN, F. A. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. **Atherosclerosis**, 161, n. 1, p. 199-207, 2002.

- RAMOS, A.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V. *et al.* Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, 44, n. 1-2, p. 133-140, 1998.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RATNASARI, N.; WALTERS, M.; TSOPMO, A. Antioxidant and lipoxygenase activities of polyphenol extracts from oat brans treated with polysaccharide degrading enzymes. **Heliyon**, 3, n. 7, p. e00351, 2017.
- RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J. *et al.* MEROPS: the peptidase database. **Nucleic acids research**, 36, n. suppl\_1, p. D320-D325, 2007.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. CONVERSION OF TRYPTOPHAN TO INDOLEACETIC-ACID BY AZOSPIRILLUM-BRASILENSE. **Soil biology and Biochemistry**, 11, n. 5, p. 547-548, 1979.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Amino acids, proteins and nucleic acids**, 1991.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, 91, n. 11, p. 552-555, 2004.
- RODRÍGUEZ, J. D. A.; PALAU, L. C.; LÓPEZ, M. O. A. **Extracción y cuatificación de lípidos**. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2007. 41-48 p.
- ROMEIRO, R. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão: Laboratório de bacteriologia de plantas. **Viçosa: UFV. Disponível em:** < <http://dc451.4shared.com/doc/Oy2uUTUh/preview.html> >. Acesso em, 18, 2012.
- ROSENZWEIG, C.; ELLIOTT, J.; DERYNG, D.; RUANE, A. C. *et al.* Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111, n. 9, p. 3268-3273, 2014.
- ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; COLLA, G. Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. **Frontiers in plant science**, 8, p. 131, 2017.
- ROUPHAEL, Y.; COLLA, G.; GIORDANO, M.; EL-NAKHEL, C. *et al.* Foliar applications of a legume-derived protein hydrolysate elicit dose-dependent increases of growth, leaf mineral composition, yield and fruit quality in two greenhouse tomato cultivars. **Scientia Horticulturae**, 226, p. 353-360, 2017/12/19/ 2017.

ROUPHAEL, Y.; SPÍČHAL, L.; PANZAROVÁ, K.; CASA, R. *et al.* High-throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or from field to lab? **Frontiers in plant science**, 9, 2018.

SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93, n. 4, p. 1351-1375, 2012/02/01 2012.

SAHOO, R. K.; ANSARI, M. W.; PRADHAN, M.; DANGAR, T. K. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. **Protoplasma**, 251, n. 4, p. 943-953, 2014.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. 2004.

SAIGUSA, N.; TERAMOTO, Y. Effects of distillation process on antioxidant activity of Japanese traditional spirits rice-shochu. **International J. Biomass Renewab**, 3, p. 17-23, 2014.

SANTOS, A. F. D. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. 2010.

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **Journal of biochemical and biophysical methods**, 70, n. 4, p. 697-699, 2007.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, 220, n. 2, p. 183-197, 2004.

SEBETHA, E.; MODI, A.; OWOEYE, L. Maize seed quality in response to different management practices and sites. **Journal of Agricultural Science**, 7, n. 1, p. 215, 2015.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Preparation and characterization of rice protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 77, n. 8, p. 885-889, 2000.

SILVA, O. F. D.; WANDER, A. E.; FERREIRA, C. M. **Estatística da Produção do Arroz no Brasil**. Arroz no Brasil, <https://www.embrapa.br/estatistica-de-producao> p. Comércio do Arroz no Brasil e no mundo, 2021. Acesso em: 20/04/2021.

SILVA, P. R. F. D.; STRIEDER, M. L.; COSER, R. P. D. S.; RAMBO, L. *et al.* Grain yield and kernel crude protein content increases of maize hybrids with late nitrogen side-dressing. **Scientia Agricola**, 62, p. 487-492, 2005.

SILVA, T. D. Uso de biorreguladores e bioestimulantes na agricultura.

SINGHAL, P.; JAN, A. T.; AZAM, M.; HAQ, Q. M. R. Plant abiotic stress: A prospective strategy of exploiting promoters as alternative to overcome the escalating burden. **Frontiers in Life Science**, 9, n. 1, p. 52-63, 2016.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C. *et al.* Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples - NREL/TP-510-42621. **National Renewable Energy Laboratory**, 9, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. *et al.* Determination of Ash in Biomass - NREL/TP-510-42622. Golden, Colo. :: National Renewable Energy Laboratory 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis. **Biological nitrogen fixation**, p. 937-940, 2015.

STONE, P.; SORENSEN, I.; REID, J., 1998, **Effect of plant population and nitrogen fertilizer on yield and quality of super sweet corn**. 1-5.

SUBBARAO, S.; AFTAB HUSSAIN, I.; GANESH, P. Bio stimulant activity of protein hydrolysate: influence on plant growth and yield. **J. Plant Sci. Res**, 2, n. 2, p. 1-6, 2015.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, 44, n. 2, p. 211, 2006.

SURIN, S.; YOU, S.; SEESURIYACHAN, P.; MUANGRAT, R. *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from purple glutinous rice bran (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant activities. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 10410, 2020/06/26 2020.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; MORELLON-STERLING, R.; CASTANEDA-VALBUENA, D.; BERENQUER-MURCIA, Á. *et al.* Immobilization of papain: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 188, p. 94-113, 2021.

TAKESHITA, R.; SAIGUSA, N.; TERAMOTO, Y. Production and antioxidant activity of alcoholic beverages made from various colored rice and wild rice. **African Journal of Biochemistry Research**, 9, p. 130-136, 12/30 2015.

TAPDIGOV, S. Z. The bonding nature of the chemical interaction between trypsin and chitosan based carriers in immobilization process depend on entrapped method: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 90, p. 1-11, 2013.

TERRA, W.; FERREIRA, C.; JORDAO, B.; DILLON, R. Digestive enzymes. *In*: **Biology of the insect midgut**: Springer, 1996. p. 153-194.

TIESSEN, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, P.; DELAYE-ARREDONDO, L. J. Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes. **BMC research notes**, 5, n. 1, p. 1-23, 2012.

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H. *et al.* Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1865, n. 6, p. 129896, 2021.

TOMASIK, P.; HORTON, D. Enzymatic conversions of starch. **Adv Carbohydr Chem Biochem**, 68, p. 59-436, 2012.

TOWNSEND, T. J.; RAMSDEN, S. J.; WILSON, P. Analysing reduced tillage practices within a bio-economic modelling framework. **Agricultural systems**, 146, p. 91-102, 2016.

TREMACOLDI, C. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

TREVISAN, S.; MANOLI, A.; QUAGGIOTTI, S. A Novel Biostimulant, Belonging to Protein Hydrolysates, Mitigates Abiotic Stress Effects on Maize Seedlings Grown in Hydroponics. **Agronomy**, 9, n. 1, p. 28, 2019.

UMEMIYA, Y.; FURUYA, S., 2001, **The influence of chemical. Forms on foliar-applied nitrogen absorption for peach trees.** 97-103.

VAN BOEKEL, M.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N.; STANTON, C. *et al.* A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular Nutrition & Food Research**, 54, n. 9, p. 1215-1247, 2010.

VAN DER HOORN, R. A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 59, p. 191-223, 2008.

VECOLI, C.; BORGHINI, A.; FOFFA, I.; AIT-ALI, L. *et al.* Leukocyte telomere shortening in grown-up patients with congenital heart disease. **International Journal of Cardiology**, 204, p. 17-22, 2016.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S. *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. **Molecules**, 21, n. 5, p. 573, 2016.

VERMELHO, A. B.; MELO, A.; SÁ, M.; SANTOS, A. *et al.* Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, p. 273-287, 2008.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

- VISCONTI, F.; DE PAZ, J. M.; BONET, L.; JORDÀ, M. *et al.* Effects of a commercial calcium protein hydrolysate on the salt tolerance of *Diospyros kaki* L. cv. "Rajo Brillante" grafted on *Diospyros lotus* L. **Scientia Horticulturae**, 185, p. 129-138, 2015.
- VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. **International journal of molecular sciences**, 19, n. 4, p. 952, 2018.
- WANG, L.; HAGEMANN, T. L.; MESSING, A.; FEANY, M. B. An in vivo pharmacological screen identifies cholinergic signaling as a therapeutic target in glial-based nervous system disease. **Journal of Neuroscience**, 36, n. 5, p. 1445-1455, 2016.
- WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, D.; LIU, J. *et al.* Baijiu Vinasse Extract Scavenges Glyoxal and Inhibits the Formation of N $\epsilon$ -Carboxymethyllysine in Dairy Food. **Molecules**, 24, n. 8, p. 1526, 2019.
- WANG, Z.; REN, D.; YU, H.; JIANG, S. *et al.* Study on improving the stability of adsorption-encapsulation immobilized Laccase@ ZIF-67. **Biotechnology Reports**, 28, p. e00553, 2020.
- WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, 40, n. 1, p. 309-348, 2002.
- WERNECK, G. C. Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado.
- WIEDERHOLD, E.; VEENHOFF, L. M.; POOLMAN, B.; SLOTBOOM, D. J. Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* organelles. **Molecular & Cellular Proteomics**, 9, n. 3, p. 431-445, 2010.
- WILSON, P. Farmer characteristics associated with improved and high farm business performance. **International journal of agricultural management**, 3, n. 4, p. 191-199, 2014.
- WISNIEWSKI-DYÉ, F.; LOZANO, L.; ACOSTA-CRUZ, E.; BORLAND, S. *et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. **Genes**, 3, n. 4, p. 576-602, 2012.
- WU, J.-M.; LIU, R.-H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. **Journal of bioscience and bioengineering**, 115, n. 3, p. 284-290, 2013.
- YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in plant science**, 7, p. 2049, 2017.

YANG, F.-C. Drying trials of thin stillage from the manufacture of rice spirit. **Bioresource technology**, 65, n. 1-2, p. 163-165, 1998.

YANG, F.-C.; LIN, I.-H. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme and microbial technology**, 23, n. 6, p. 397-402, 1998.

YANG, F.-C.; TUNG, H.-L. Reuse of thin stillage from rice spirit for the culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process biochemistry**, 31, n. 6, p. 617-620, 1996.

YEON, K.-M.; YOU, J.; ADHIKARI, M. D.; HONG, S.-G. *et al.* Enzyme-immobilized chitosan nanoparticles as environmentally friendly and highly effective antimicrobial agents. **Biomacromolecules**, 20, n. 7, p. 2477-2485, 2019.

YONAMINE, C. M. **Clonagem de serino proteases do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* e expressão da giroxina em célula de mamífero**. 2007. -, Universidade de São Paulo.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource technology**, 102, n. 4, p. 3977-3980, 2011.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006/06/01/ 2006.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D.; JÚNIOR, C. W. *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, 10, n. 14, p. 123-137, 2009.