

VALORAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PELA AÇÃO DE *Rhizopus oryzae* NA LIBERAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

TAIANA DENARDI DE SOUZA¹, KELLY CRISTINA MASSAROLO², CHIARA LEAL ALVES³, ELIANA BADIALE FURLONG⁴

RESUMO

Rhizopus oryzae possui atividade metabólica intensa despolimerizando materiais lignocelulósicos, que resulta no aumento da disponibilidade de componentes característicos do substrato utilizado. Acompanhamos a variação do perfil de ácidos fenólicos presentes em biomassa produzida por *Rhizopus oryzae* em farelo de soja, trigo e arroz. Nas biomassas de farelo de arroz e soja foram detectados 70,2 e 120,0 µg de ácido clorogênico/g em 24 e 72 h de cultivo, respectivamente. Em todas as biomassas os níveis de ácido gálico aumentaram ao longo do cultivo, 23,8 µg/g, 55,8 µg/g e 63,5 µg/g, respectivamente, para o farelo de soja, trigo e arroz. Ficou demonstrado que o cultivo de fungos em substratos lignocelulósicos promove a alteração de perfis de metabólitos secundários que podem ser interessantes para otimizar o aproveitamento de resíduos da agroindústria na cadeia produtiva de alimentos, tais como o ácido gálico, clorogênico, cafeico, hidroxibenzóico e vanilina.

PALAVRAS-CHAVE: CULTIVO ESTADO SÓLIDO; METABOLISMO SECUNDÁRIO; FUNGOS FILAMENTOSOS.

VALUATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE BY THE ACTION OF *Rhizopus oryzae* ON THE RELEASE OF PHENOLIC ACIDS

ABSTRACT

Rhizopus oryzae possess an intense metabolic activity and is able to depolymerize lignocellulosic materials, that results in the improvement of characteristic components availability from the substrate used. We followed the variation of the profile of phenolic acids present in biomass produced by *Rhizopus oryzae* in soybean meal, wheat and rice. In the biomass of soybean meal and rice, 70.2 and 120 µg of chlorogenic acid/g were detected in 24 and 72 h of culture, respectively. In all biomass, gallic acid levels increased throughout the crop, 24 µg/g, 56 µg/g and 64 µg/g, respectively, for soybean meal, wheat and rice. It has been demonstrated that the fungi culture in lignocellulosic substrates promotes the alteration of the profile of secondary metabolites that may be interesting for optimize the agroindustrial co-products application in the food chain, such as gallic, chlorogenic, caffeic, hidroybenzoic and vanillin .

KEYWORDS: FILAMENTOUS FUNGI; SECONDARY METABOLISM; SOLID STATE CULTIVATION.

¹Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: tdenardisouza@gmail.com

²Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: kelly_massa@hotmail.com

³Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: chiaraleal@gmail.com

⁴Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: dqmebf@furg.br

1. INTRODUÇÃO

A utilização de subprodutos e resíduos agroindustriais como fonte de carbono e energia para micro-organismos em especial fungos filamentosos, é uma prática consagrada para recuperar compostos e produtos de interesse [12,14,17,25]. Dentre os fungos filamentosos considerados seguros (*Generally Recognized as Safe- GRAS*) destaca-se o *Rhizopus oryzae*, que por sua atividade metabólica intensa é explorado comercialmente para produção de enzimas e outros compostos, cuja síntese pode ser induzida durante o cultivo [7].

Durante o cultivo sólido sobre material lignocelulósico, o *Rhizopus oryzae* atua liberando exoenzimas hidrolíticas que atuam sobre constituintes poliméricos e majoritários do substrato para utilizar as unidades monoméricas. Em função desta ação despolimerizante compostos derivados de lignina, celulose, proteínas e outros componentes da estrutura vegetal (substrato) são liberados [7,21]. Portanto, é uma alternativa interessante para melhorar as propriedades funcionais de resíduos lignocelulósicos ainda pouco explorados como fonte de compostos com atividade antioxidante, anti-hipertensiva ou antimicrobiana e outras de interesse tecnológico como capacidade de absorção de água, formação de gel e elaboração de filmes biodegradáveis [6,20].

Para explorar este potencial de despolimerização e metabolização do *Rhizopus oryzae* é necessário caracterizar cada estágio do seu desenvolvimento comparativamente ao material empregado como substrato, e a partir disto estabelecer parâmetros que promovam a maior liberação de cada composto em período característico do substrato e do micro-organismo [4,6,11,21,22].

Neste estudo se propõe acompanhar a variação do perfil de ácidos fenólicos durante o cultivo sólido de *Rhizopus oryzae* utilizando farelo de soja, farelo de trigo e farelo de arroz como substratos, visando identificar o mais promissor para recuperação destes compostos, cuja atividade biológica vem sendo demonstrada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os farelos de soja, de trigo e de arroz foram cedidos por agroindústrias localizadas no estado do Rio Grande do Sul, Brazil. O micro-organismo *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foi adquirido da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, Campinas, Brasil. Os padrões de ácidos fenólicos, caféico, clorogênico, p-cumárico, ferúlico, gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, siringico e vanilina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação do inóculo e cultivo de *Rhizopus oryzae*

As cepas do fungo *Rhizopus oryzae* foram mantidas em plano inclinado a 4°C em ágar batata dextrose (BDA). Os esporos foram raspados com Tween 80 (0,2%) formando uma emulsão aquosa. BDA foi utilizado para uma nova incubação dos esporos durante 7 dias à 30°C em placas de Petri. Os esporos raspados com alça de Drigalski foram enumerados em câmara de Neubauer (L. Opitik, Alemanha) e inoculados nos fermentadores [11].

O cultivo de *Rhizopus oryzae* foi realizado em reatores de bandeja (12x8x4 cm³) onde os farelos de soja, trigo e arroz com granulometria padronizada (<0,56 mm) foram dispostos em camada de 2 cm e, posteriormente, autoclavados. Os substratos foram homogeneizados com 45 mL de solução nutritiva (2 g/L KH₂PO₄, 1 g/L MgSO₄, 1,8 g/L NH₂CONH₂ em HCl 0,4 N), e a umidade do sistema foi corrigida para 50% com água estéril antes do início do cultivo. A inoculação foi realizada com uma suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* contendo 4,0 x 10⁶ esporos/g meio. Os reatores foram cobertos com gaze estéril para permitir a ventilação e incubados à 30°C, por 120 h com amostragem a cada 24 h. A biomassa foi armazenada à -18°C até o momento da caracterização da biomassa cultivada [11].

2.2.2 Evolução da biomassa fúngica

A produção de biomassa de *Rhizopus oryzae*, nos diferentes farelos, ao longo do cultivo foi avaliada indiretamente pela determinação do conteúdo de glicosamina. Para isto, 0,1 g de amostra foi hidrolisada com HCl 6 N (p/v) e a da n-acetilglicosamina foi determinada espectrofotometricamente à 530 nm, utilizando uma curva padrão de glicosamina (Sigma, EUA) em água (1 à 17 mg/mL) [1,23].

2.2.3 Perfil de ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos livres foram extraídos das biomassas cultivadas e seus controles (0 h) conforme descrito Schmidt et al. [21] utilizando metanol (1:10, m/v). Após a extração o solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em água destilada, clarificado com $ZnSO_4$ 0,1M e $Ba(OH)_2$ 5% e avolumado a 25 mL.

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos livres foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, CLASS-M10A, Tóquio, Japão) acoplado a detector ultravioleta e coluna C_{18} fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m, Discovery, EUA), de acordo com Scaglioni et al. [19], utilizando fluxo de metanol e água acidificada (ácido acético 1%; 20:80 v/v) à 0,7 mL/min e temperatura de 35°C durante 25 min (Figura 1).

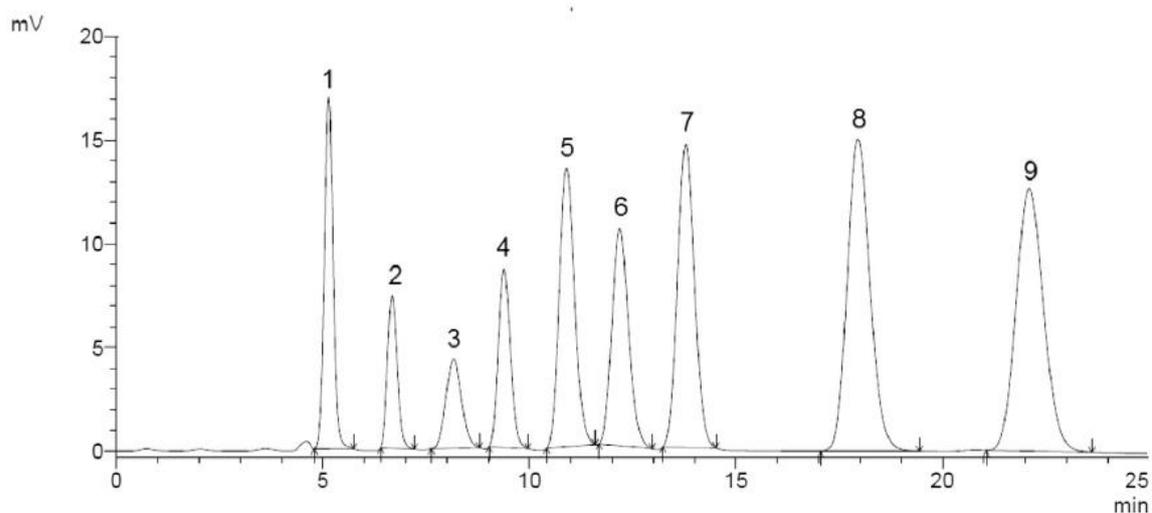


FIGURA 1. Eluição dos padrões de ácidos fenólicos: (1) gálico, (2) protocatecóiico, (3) clorogênico, (4) hidroxibenzóico, (5) cafeíico, (6) siríngico, (7) vanilina, (8) p-cumárico e (9) ferúlico. Fonte: Scaglioni et al. [19]

2.2.4 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, sendo a análise estatística das significâncias das diferenças promovidas pelos tratamentos dos resultados realizada por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software "Statistic 7.0".

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento fúngico

A evolução das biomassas fúngicas foi determinada através de glicosamina acumulada pela formação de micélio nos cultivos (Figura 2). A composição do substrato e as condições de cultivo afetam a regulação metabólica e, conseqüentemente, a formação morfológica das hifas [3,5,24]. A glicosamina está presente na estrutura do *Rhizopus oryzae*, cujas hifas possuem paredes celulares constituídas por quitosana e quitina ao invés de glucanas e mananos característicos de outras espécies, portanto o teor dela é um indicativo confiável de evolução de micélio fúngico [2,23].

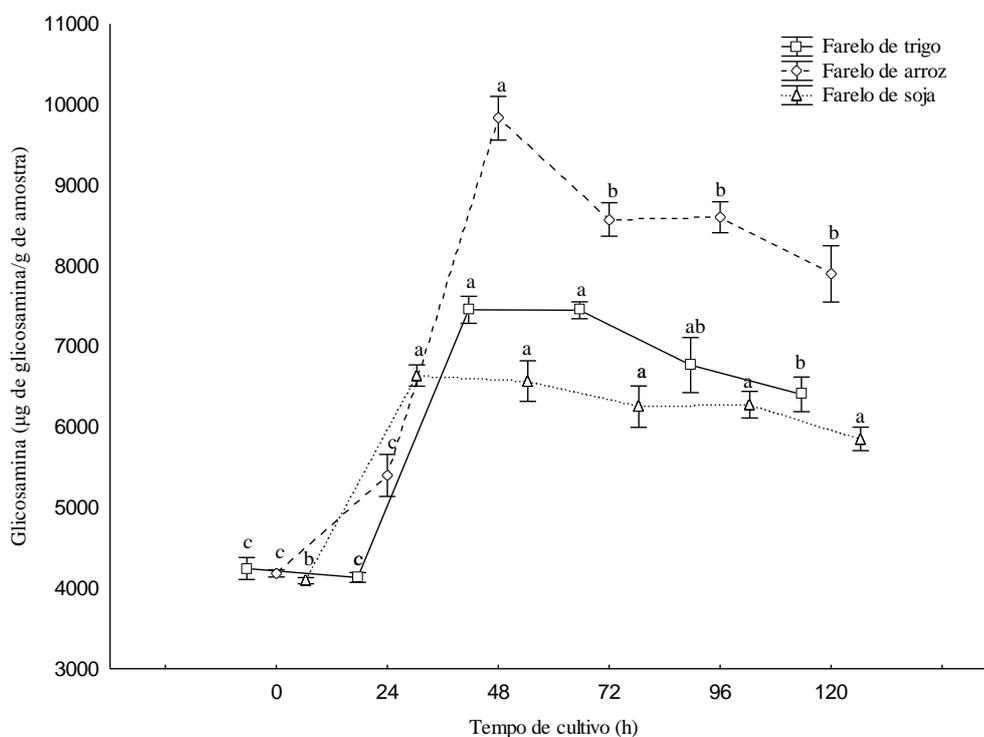


FIGURA 2. Evolução do conteúdo de glicosamina em farelo de trigo, arroz e soja cultivados com *Rhizopus oryzae*

Para cada farelo o maior conteúdo de glicosamina foi alcançado em intervalo diferente. Em 48 h de cultivo, quando os substratos eram farelo de arroz e trigo, o conteúdo foi de 9,8 e 7,5 mg de glicosamina, respectivamente. Quando o substrato era farelo de soja, o maior conteúdo de glicosamina foi encontrado em 24 h (6,6 mg de

glicosamina). Esta diferença no tempo necessário para atingir o auge do crescimento exponencial do fungo, novamente reforça o papel da composição do substrato para evolução da biomassa fúngica. O maior conteúdo proteico para a biomassa fúngica no substrato farelo de soja promoveu o final da fase a exponencial em menor intervalo, possivelmente, determinado pelo maior conteúdo de nitrogênio disponível para a evolução da massa celular fúngica. Assim, nos farelos de cereais que possuem os demais compostos químicos necessários para a evolução e diferenciação do *Rhizopus oryzae*, a fase exponencial foi mais prolongada.

3.2 Ácidos fenólicos

A fração de lignina é aquela que será a fonte de compostos fenólicos, principalmente ácidos ferúlico, p-cumárico, siringico, vanílico e ácido p-hidroxibenzóico [10], que podem ser disponibilizados pela degradação da celulose por ação de complexo celulolítico produzido pelo fungo [7,9,21]. Foi observado um aumento no conteúdo de alguns compostos fenólicos solúveis em metanol nas biomassas fúngicas (Tabela 1), confirmando que ocorreu uma clivagem de compostos fenólicos originalmente polimerizados no complexo lignina-celulose [15,20].

Os ácidos fenólicos disponibilizados pelo *Rhizopus oryzae* em farelo de soja foram o ácido clorogênico e o caféico que aumentaram em, aproximadamente, 3,7 (72 h) e 5,4 vezes (48 h) o seu teor inicial. Em 24 h, o aumento foi de 1,5 vezes para o ácido gálico e em 96 h de 2,2 vezes para o protocatecóico. A vanilina, derivado do ácido ferúlico, aumentou 3,1 vezes em relação ao inicial no intervalo de 48 h, enquanto este diminuía. Assim, prolongar o intervalo de cultivo do *Rhizopus oryzae* em farelo de soja beneficia a formação de vanilina, um aromatizante amplamente utilizado em produtos alimentícios, perfumes, bebidas e produtos farmacêuticos [27].

No farelo de trigo aumentou o ácido gálico (4,4 vezes em 48 h) e os ácidos caféico, siringico e hidroxibenzóico (4,0; 2,6; e 5,0 vezes, respectivamente, em 96 h). Ao passo que o ácido clorogênico teve sua concentração reduzida (8,0 vezes). No farelo de arroz, aumentaram o ácido gálico (1,6 vezes/ 96 h) e ácido clorogênico (13 vezes/ 24 h). Isto sugere que, os ácidos fenólicos que constituem a lignina das diferentes espécies vegetais são distintos ou, por outro lado, o micro-organismo pode usar enzimas com diferente especificidade em cada tipo substrato.

TABELA 1. Caracterização do perfil de ácidos fenólicos obtidos do cultivo de *Rhizopus oryzae* em farelo de soja, trigo e arroz.

Substrato	Tempo (h)	Gálico	Protocatecóico	Clorogênico	Hidroxibenzóico	Cafeíco	Siríngico	Vanilina	Cumárico	Ferúlico
Farelo de trigo	0	13,18 ^d (13,4)	1,39 ^c (2,6)	227,62 ^a (3,3)	0,93 ^c (20,8)	5,54 ^c (5,8)	4,16 ^d (4,7)	8,16 ^a (13,0)	0,05 ^d (19,0)	2,07 ^a (0,5)
	24	33,16 ^c (11,1)	2,4 ^b (9,3)	54,66 ^b (7,8)	2,95 ^b (4,2)	7,28 ^c (4,9)	5,03 ^{cd} (4,2)	2,43 ^c (7,4)	0,18 ^b (3,5)	1,97 ^a (4,7)
	48	55,78 ^a (5,4)	1,70 ^b (20,6)	53,61 ^{bc} (6,6)	3,64 ^{ab} (16,6)	12,31 ^{bc} (11,1)	6,81 ^{bc} (12,9)	4,3 ^{bc} (10,1)	0,34 ^{ab} (2,8)	1,27 ^a (8,4)
	72	35,31 ^{bc} (4,3)	1,33 ^c (4,4)	33,08 ^c (8,4)	3,63 ^{ab} (3,5)	13,43 ^b (7,8)	7,12 ^b (11,1)	4,23 ^b (7,4)	0,21 ^{ab} (0,8)	3,27 ^a (13,1)
	96	43,60 ^{ab} (6,3)	2,07 ^b (8,6)	47,81 ^{bc} (4,7)	4,69 ^a (10,3)	23,96 ^a (7,8)	10,74 ^a (2,3)	5,57 ^b (2,1)	0,65 ^a (12,6)	2,89 ^a (15,3)
	120	36,68 ^{bc} (6,7)	3,78 ^a (13,2)	17,92 ^c (5,8)	3,94 ^{ab} (13,5)	12,06 ^{bc} (12,7)	6,88 ^b (7,8)	3,83 ^{bc} (16,5)	0,18 ^{ab} (14,3)	2,61 ^a (3,9)
Farelo de arroz	0	37,72 ^c (3,6)	3,37 ^b (6,2)	5,88 ^e (7,6)	10,45 ^d (12,2)	13,84 ^a (1,2)	2,53 ^c (16,4)	17,83 ^a (2,7)	2,10 ^a (6,9)	3,44 ^a (9,2)
	24	49,18 ^{abc} (3,7)	3,69 ^{ab} (14,8)	70,16 ^a (1,9)	14,56 ^{ab} (3,9)	9,02 ^b (9,6)	7,54 ^{ab} (12,5)	12,40 ^b (4,2)	1,04 ^b (1,3)	13,7 ^c (10,9)
	48	59,68 ^{ab} (4,5)	4,51 ^a (9,8)	42,34 ^b (4,7)	15,10 ^{ab} (7,3)	13,80 ^a (0,7)	2,53 ^c (16,3)	16,59 ^a (8,0)	1,87 ^a (13,4)	2,21 ^{ab} (16,1)
	72	61,12 ^{ab} (4,1)	3,72 ^{ab} (2,9)	58,44 ^a (4,3)	15,07 ^a (11,6)	11,84 ^{ab} (1,0)	7,31 ^b (9,1)	9,97 ^{bc} (7,8)	0,20 ^c (17,6)	1,41 ^{bc} (17,0)
	96	63,53 ^a (11,3)	3,65 ^{ab} (13,7)	28,28 ^c (2,9)	16,36 ^a (12,01)	11,96 ^{ab} (11,7)	9,2 ^a (6,4)	6,72 ^d (13,3)	0,18 ^c (11,8)	0,89 ^c (12,1)
	120	49,36 ^{bc} (4,1)	2,18 ^c (13,4)	19,22 ^d (0,9)	12,49 ^{ab} (0,82)	10,28 ^b (6,5)	8,11 ^{ab} (8,4)	9,45 ^c (4,4)	0,08 ^c (8,9)	0,61 ^c (0,4)
Farelo de soja	0	16,32 ^c (10,8)	4,73 ^c (15,1)	34,2 ^d (4,2)	40,00 ^a (2,9)	7,29 ^c (2,1)	39,95 ^d (1,6)	8,50 ^a (6,6)	11,65 ^a (3,4)	28,35 ^a (4,2)
	24	23,79 ^a (4,5)	4,88 ^c (7,6)	70,00 ^c (1,4)	17,34 ^d (2,0)	28,13 ^b (3,2)	59,00 ^c (1,2)	1,63 ^c (5,0)	0,35 ^b (4,0)	5,03 ^b (11,8)
	48	20,28 ^{ac} (5,9)	7,23 ^b (4,5)	116,65 ^a (4,2)	28,52 ^c (1,7)	37,67 ^a (2,9)	64,20 ^b (1,8)	26,38 ^b (2,2)	0,41 ^b (4,3)	4,18 ^b (4,2)
	72	19,97 ^{bc} (1,0)	8,64 ^b (8,0)	120,03 ^a (9,9)	33,39 ^b (6,2)	21,12 ^b (17,8)	61,68 ^{bc} (1,4)	26,68 ^b (3,0)	0,35 ^b (5,2)	3,86 ^b (4,6)
	96	20,42 ^{ac} (7,9)	10,53 ^a (10,5)	111,81 ^{ab} (8,9)	35,61 ^{ab} (9,2)	26,38 ^b (19,0)	77,15 ^a (3,1)	1,46 ^c (2,3)	0,34 ^b (12,3)	4,49 ^b (2,8)
	120	17,21 ^{bc} (9,3)	8,76 ^{ab} (3,3)	94,60 ^b (4,6)	35,48 ^{ab} (1,4)	21,49 ^b (1,7)	63,05 ^b (2,9)	1,58 ^c (12,9)	0,37 ^b (11,2)	3,76 ^b (7,3)

(Resultados expressos em µg/g; as letras iguais na mesma coluna não representam diferença significativa com confiança de 95%).

Em estudo semelhante, Schmidt et al. [21] observaram que durante o cultivo de *Rhizopus oryzae* tendo farelo de arroz como substrato ocorria um aumento de solubilidade dos ácidos fenólicos, destando-se o ácido ferúlico que variou entre 33 mg/g e 765 mg/g em 120 h. Ryan et al. [18] relataram aumento no conteúdo de ácido clorogênico, hidroxibenzóico e vanilina usando este micro-organismo proveniente de outra cepa.

Razak et al. [16] determinaram em extratos de farelo de arroz cultivado com *Rhizopus oryzae* o perfil de ácidos fenólicos, e observaram um aumento no conteúdo de vanilina, caféico, protocatecoico e hidroxibenzóico que não haviam sido detectados em farelo de arroz antes do cultivo (0 h).

Portanto, as alterações verificadas no perfil de ácidos fenólicos dependem especialmente do tipo de substrato, o fungo usado e das condições de fermentação [9,20]. Neste caso, apenas uma condição foi empregada para cultivo, mas pode-se observar que especialmente no farelo de arroz pode promover um aumento marcante de ácido clorogênico, e nos demais o ácido gálico destacou-se. Cabe salientar que ambos os ácidos fenólicos são considerados bons antioxidantes e antifúngicos [8,13,26]. Portanto, o cultivo em estado sólido é uma alternativa para a produção de compostos fenólicos a partir de fontes naturais, desde que sejam controlados os parâmetros adequados para o micro-organismo atuar sobre o substrato lignocelulósico.

4. CONCLUSÃO

O substrato farelo de arroz foi o mais promissor para geração de biomassa fúngica, baseado no seu maior do conteúdo de glicosamina. Os ácidos fenólicos que apresentaram maior disponibilização durante o cultivo com *Rhizopus oryzae* foram clorogênico, hidroxibenzóico e caféico, para farelo de arroz, de soja e de trigo, respectivamente. Vanilina apresentou aumento no seu conteúdo somente durante o cultivo de farelo de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] OLIVEIRA, M.S.O; FEDDERN, V.; KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E.P.; SOUZA-SOARES, L.A. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8335-8338, 2011.

- [2] REZENDE, C.R.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuel**, v. 54, n. 4, 2011.
- [3] UENOJO, M; PASTORE, G.M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.
- [4] PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Technological potential of agro-industrial residues. **Bioresouce Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.
- [5] KUPSKI, L. ; SILVELLO, M.A.C. ; FONTES, M.R.V. ; LIMA, T.S. ; TREICHEL, H.; BADIALE-FURLONG, E. *R. oryzae* Cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, p. 129-138, 2015.
- [6] SCHMIDT, C.G.; GONÇALVES, L.M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H.S.; BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. **Food Chemistry**, v.146, p. 371-377, 2014.
- [7] KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M.S.; SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE-FURLONG, E. Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 937-942, 2012.
- [8] SCHMIDT, C.G.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, 2012.
- [9] DEY, T.B.; KUHAD, R.C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 120-127, 2014.
- [10] OLIVEIRA, M.S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA- Journal of Food**, v. 8, p. 229-236, 2010.

- [11] SILVEIRA, C.M.; BADIALE-FURLONG, E.B. Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermented bran. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2007.
- [12] SOUZA, M.M.; PRIETO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T.D.; BADIALE-FURLONG, E. Assesment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1050-1058, 2011.
- [13] AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.
- [14] SCAGLIONI, P.T.; DE SOUZA, T.D.; SCHMIDT, C.G.; BADIALE-FURLONG, E.; Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 526-532, 2014.
- [15] DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.
- [16] TOMASELLI-SCOTTI, C.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.
- [17] KROLL, K.; PÄHT, V.; KNIEMEYER, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 151-163, 2014.
- [18] CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.
- [19] MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. **Industrial Crops and Products**, v. 25, p. 231–237, 2007.
- [20] MARTINS, S.; MUSSATTO, S.I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

- [21] POURALI, O.; ASGHARI, F.S.; YOSHIDA, H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 259-266, 2010.
- [22] ZHENG, L.; ZHENG, P.; SUN, Z.; BAI, Y.; WANG, J.; GUO, X. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1115-1119, 2007.
- [23] RYAN, E.P.; HEUBERGER, A.L.; WEIR, T.L.; BARNETT, B.; BROECKLING, C.D.; PRENNI, J.E. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1862-1870, 2011.
- [24] RAZAK, D.L.A.; RASHID, N.Y.A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S.A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 33-38, 2015.
- [25] PAGNUSSATT, F.A.; LIMA, V.R.; DORA, C.L.; COSTA, J.A.V.; PUTAUX, J.L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616–623, 2016.
- [26] LI, G.; WANG, X.; XU, Y.; ZHANG, B.; XIA, X. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. **European Food Research and Technology**, 238, n. 4, p. 589–596, 2014.
- [27] VERMA, A.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 35, n. 3, p. 473-485, 2013.