



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Márcia Caetano de Sá Muniz

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE POLPA DE FRUTAS
POR AMOSTRAS DE *Aspergillus* sp ISOLADAS DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Recife

2014

Márcia Caetano de Sá Muniz

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE POLPA DE FRUTAS
POR AMOSTRAS DE *Aspergillus* sp ISOLADAS DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife
2014**

M966p

Muniz, Marcia Caetano de Sá

Produção de ácido cítrico utilizando resíduos da indústria de polpa de frutas por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco / Marcia Caetano de Sá Muniz ; orientador Carlos Alberto Alves da Silva, 2017.

75 f. : il.

Mestrado

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação.

em Desenvolvimento de processos Ambientais, 2017.

1. Ácido cítrico. 2. *Aspergillus*. 3. Fermentação. 4.

Agroindústria.

I. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada por Josefa Vital de Oliveira - CRB-543

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE
POLPA DE FRUTAS POR AMOSTRAS DE *Aspergillus* sp ISOLADAS DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Márcia Caetano de Sá Muniz

Examinadores:

Prof.. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientador

Profa. Dr^a Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em ____/____/____

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Clarissa Dayse Costa Albuquerque

Dedico a meu amado marido, Marcos,
e meus filhos, Linda Inês, Nívea Helena,
Marcos Antonio e Igor Morôni,
Porque “nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no lar”.
(David O. McKay)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e capacidade de realização;

A meus pais, pelo amor, carinho e cuidados ao longo de minha vida;

A meu marido e filhos pelo amor e compreensão devido às minhas ausências, ao apoio em minhas diversas funções como mãe, esposa, dona de casa e mestrande;

Ao professor Carlos Alberto, pelos conhecimentos e experiência que soube transmitir, pela orientação paciente e pelas valiosas instruções que me trouxeram ao nível que cheguei;

Às professoras Galba Takaki e Aline Elesbão pelo repasse de conhecimentos que contribuíram de forma direta e indireta para a composição dessa dissertação;

À professora Alexandra Amorim, pela ajuda, atenção carinhosa e preciosas dicas para a realização desse trabalho;

Às colegas e amigas de “bancada” Andreza, Nadielly e Brindize, as quais compartilharam comigo dia a dia todos os sucessos e insucessos dentro do laboratório, todos os obstáculos que surgiram ao longo dos meses, bem como a superação dos mesmos; amigas com quem tive o privilégio de crescer e aprender, de trocar conhecimentos, de dar e pedir conselhos, de rir e chorar: amigas que não serão jamais esquecidas;

A Cláudia, a qual passou a fazer parte de meu círculo de amizades dentro do laboratório, com quem passei bons e alegres momentos e que sempre me deu boas ideias. A Thaís e Marcelly, alunas da Iniciação Científica, que me deram uma “mãozinha” com meus experimentos e que foram de grande ajuda nos momentos finais. A Marcos e Grayce, os quais me socorreram com as análises de meus resultados e formatação da parte escrita; foram amigos de verdade, dedicando de seu tempo, sem esperar nada em troca.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
Resumo	vi
Abstract	vii
CAPÍTULO I.....	8
1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 Revisão da Literatura	12
3.1 A Biotecnologia e os Bioativos	12
3.2 Ácidos Orgânicos.....	13
3.3 Ácido Cítrico	14
3.4 Micro-Organismos Produtores de Ácido Cítrico.....	18
3.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	19
3.6 Solo da Caatinga	20
3.7 Processos Fermentativos	21
3.8 Resíduos Agroindustriais.....	22
3.9 Frutas Cítricas	26
3.9.1. Acerola	29
3.9.2 Abacaxi.....	31
4. Referências Bibliográficas	33
CAPÍTULO II	39

seleção de amostras de <i>Aspergillus</i> sp isoladas da caatinga de Pernambuco e produção de ácido cítrico por fermentação submersa.....	39
1 Introdução.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3 Resultados e discussão	43
4 Considerações finais	47
Referências	47
CAPÍTULO III	51
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FONTES DE CARBONO E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>ASPERGILLUS</i> sp (SIS09) ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL.....	52
Resumo.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO IV.....	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	65
ANEXO I.....	66
Carta de Aceite – Revista Exacta	66
ANEXO II	67
Normas da Revista Exacta.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido cítrico.(fonte:)	14
Figura 2. Ciclo de Krebs ou ciclo do Ácido cítrico	15
Figura 3. Ácido cítrico anidro comercial.	17
Figura 4. Micrografia de <i>Aspergillus niger</i> (fonte:)	20
Figura 5. Laranjal em Avaré, SP.	28
Figura 6. Aceroleira apresentando acerolas maduras (<i>Malpighia glabra</i>) de coloração vermelho intenso.	29

CAPÍTULO II

Figura 1 . produção de ácido cítrico em diferentes meios no intervalo de 144 horas.	44
Figura 2. Consumo de glicose em diferentes meios testados para produção de AC.	46

CAPÍTULO III

Figura 1. Produção de AC no tempo decorrido de 120h de fermentação com os ensaios 5, 7, 8 e 9.	57
Figura 2. Variação de pH nos ensaios 5, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial experimental.	58
Figura 3. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis independentes na produção de ácido cítrico a 120h de fermentação. (1) sacarose, (2) Ureia e (3) pH.	59
Figura 4. Gráfico da concentração de açúcar redutor nos ensaios 5, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial experimental a 120h de fermentação.	59
Figura 5. Resultado da produção de ácido cítrico com os resíduos de abacaxi e acerola em 120 horas de cultivo. (1, 2 e 3: abacaxi em 30g/L; 50g/L; 70g/L); 4, 5 e 6: acerola em 30g/L; 50g/L; 70g/L); 7: meio controle.	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Aplicações do ácido cítrico. Fonte: Soccol et al, 2006; Sá, 2011.....	16
Tabela 2. Fatores químicos que afetam a produção de ácido cítrico (Fonte: Soccol et al, 2006).	18
Tabela 3. Micro-organismos produtores de ácido cítrico. (Fonte: Malagoni, 2010).....	19
Tabela 4. Matérias-primas empregadas em fermentação submersa e semi-sólida para produção de ácido cítrico. (^a com base no consumo de açúcar; ^b com base em óleos e ácidos graxos) Fonte: SOCCOL et al, 2006; SÁ, 2011.....	24
Tabela 5. Matérias-primas empregadas em fermentação no estado sólido para a produção de ácido cítrico. (a - com base no consumo de açúcar; b - com base na matéria seca). Fonte: SOCCOL et al, 2006; SÁ, 2011.	25
Tabela 6. Teores de ácido ascórbico das variedades de citros.	27
Tabela 7. Capacidade antioxidante das variedades de citros.....	28
Tabela 8. Padrões de qualidade (composição) para suco tropical de acerola. Fonte: Brasil, 2003.	30
Tabela 9. Padrões de identidade e qualidade para suco tropical de abacaxi. Fonte: Brasil, 2003.	32
Tabela 10. Caracterização físico-química do abacaxi da variedade pérola. Fonte: Oliveira et al, 2012; Parente, 2014.....	32

CAPÍTULO II

Tabela 1. Produção de Ácido Cítrico em meio sólido por isolados <i>Aspergillus sp</i> durante 96 horas de crescimento.....	44
Tabela 2. Variação do pH na produção de AC em diferentes meios testados nos intervalo de 144 horas.....	46

CAPÍTULO III

Tabela 1. Níveis de fatores utilizados no planejamento fatorial 2 ³	55
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial experimental 2 ³ com resultados de produção de ácido cítrico (AC) a 120h de fermentação.....	57

Resumo

A utilização de micro-organismos isolados de ambientes diversos, principalmente de regiões pouco exploradas biotecnologicamente como a Caatinga Nordestina, tem gerado novos estudos no sentido de isolar e identificar novas espécies microbianas com elevado potencial biotecnológico, através da seleção de novas amostras e ensaios envolvendo testes de meios de produção de metabólitos secundários microbianos com elevado potencial biotecnológico. O ácido cítrico (AC) é um ácido orgânico comum de quase todos os seres vivos, presente naturalmente em frutas cítricas e apresenta vasta aplicabilidade comercial. Sua produção via micro-organismos é realizada por espécies capazes de converter carboidratos em ácido cítrico, cuja produção é fortemente influenciada pela natureza dos substratos presentes nos meios de fermentação. Foram realizados inicialmente estudos de seleção de três amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga do Estado de Pernambuco, denominadas de SIS 09, 10 e 16 para produção de AC em meio sólido e produção de AC através de fermentação submersa com a melhor amostra selecionada. Foram testados três meios com diferentes composições. Os experimentos foram realizados em shaker orbital a 28°C, 150 rpm, durante 144 horas. Foram coletadas amostras a cada 24 horas para determinações da presença de AC, pH e açúcares redutores totais. Os resultados obtidos evidenciaram que nos ensaios de seleção de produção de AC em meio sólido, a amostra SIS 09 apresentou a formação do maior halo característico, 3,0 cm, respectivamente. Já na produção através de fermentação submersa, o meio denominado M₁, que apresentou uma produção de AC de 3,05 g/L, pH final de 5,0. Após a seleção do melhor meio de produção juntamente com a melhor amostra, foram realizados novos ensaios envolvendo a elaboração de meios alternativos utilizando resíduos agroindustriais da indústria de polpas de frutas (abacaxi e acerola), através de um planejamento fatorial completo 2³. Os resultados obtidos revelaram que o meio alternativo contendo abacaxi na concentração de 50g/L obteve a condição para a produção do AC, tendo obtido 31,51 g/L durante de 120h de fermentação. A seleção de novos microrganismos produtores de moléculas potencialmente ativas e a formulação de meios alternativos contendo resíduos agroindustriais geram a realização de novos estudos biotecnológicos para melhorarem as condições de produção dos bioprodutos desejados.

Palavras-Chave: Produção ácido cítrico, *Aspergillus*, fermentação submersa, resíduos agroindustriais.

Abstract

The utilization of microorganisms isolated from diverse environments, mainly unexplored regions as biotechnologically Northeast Caatinga, has generated new studies to isolate and identify new microbial species with high biotechnological potential, through the selection of new samples and tests involving tests means of production of microbial secondary metabolites with high biotechnological potential. Citric acid (CA) is a common organic acid in almost all living beings, naturally present in citrus fruits and has extensive commercial applicability. Production via micro-organisms is performed by species able to convert carbohydrates into citric acid, whose production is strongly influenced by the nature of the substrates in fermentation media. Studies of selection of three samples isolated from *Aspergillus* sp Caatinga of Pernambuco, named SIS 09, 10 and 16 for production of AC on solid medium and production of AC through submerged with the best selected sample fermentation were initially performed. Three media with different compositions were tested. The experiments were performed on an orbital shaker at 28 ° C, 150 rpm for 144 hours. Samples were collected every 24 hours for determination of the presence of AC, pH and total reducing sugars. The results showed that for tests of selection of AC production on solid medium, the SIS 09 sample showed the formation of higher characteristic halo, 3.0 cm, respectively. Already in production by submerged fermentation, the medium termed M1, which showed the yield of AC with 3.05 g / L, final pH 5.0. After selecting the best means of production along with the best sample were conducted further tests involving the development of alternative means using agro-industrial waste of mashed fruit (pineapple and acerola) industry through a full 2³ factorial design. The results showed that alternative pineapple medium containing a concentration of 50g/L was obtained the condition for producing the AC, obtaining 31. 51 g/L during the fermentation 120 h. The selection of new potentially active molecules producing microorganisms and the formulation of alternative media containing agro-industrial wastes generate the realization of new biotechnological studies to improve the conditions of production of desired bioproducts.

Keywords: production citric acid, *Aspergillus*, submerged fermentation, agroindustrial wastes.

CAPÍTULO I

1. Introdução

O ácido cítrico (AC) é um dos ácidos carboxílicos mais importantes para a Biotecnologia atualmente, ao lado de outros ácidos orgânicos, como o acético e o láctico. Ele é o responsável pelo sabor ácido das frutas cítricas. O ácido cítrico atualmente é fabricado pela fermentação aeróbica do açúcar, mas também por fontes renováveis e é bastante utilizado na indústria alimentícia e de bebidas como um antioxidante, acidulante, cujo efeito antibacteriano está associado não somente à sua ação acidulante, mas também à sua atividade quelante de íons Ca^{+2} , conforme demonstrado por Graham e Lund (1986) em estudos com a bactéria proteolítica *Clostridium botulinum*.

O AC é um metabólito comum de quase todos os seres vivos, presente naturalmente em frutas cítricas e apresenta vasta aplicabilidade comercial, desde preparação de citratos medicinais, sais efervescentes até como produto biodegradável (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2012). Sua biossíntese é confirmada pela ação microbiana do *Aspergillus niger* e da *Candida sp.*, espécies capazes de converter carboidratos em ácido cítrico, cuja produção é fortemente influenciada pela natureza dos substratos (ANDRADE et al., 2009); como também, as condições do processo. O *Aspergillus niger* se destaca por suas características morfológicas quanto à formação deste ácido; porém existem outros fungos produtores como: *Penicillium citrinum* e *Mucor piriformis* (PASTORE et al., 2011), e as leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Kluveromyces marxianus* (SILVA et al, 2012).

Como principal produto intermediário dos carboidratos, este ácido é produzido puramente por ação enzimática, que dependerá da atuação das mesmas que são controladas por alguns co-fatores, por exemplo, íons metálicos que controlam a concentração de elementos traço.

Diversos substratos têm sido utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de ácido cítrico, tais como melaço de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, resíduos de frutas, como pinha e graviola (MARCELLINI et al, 2003) ou mangaba e acerola (SILVA et al, 2012), manipueira (LEONEL e CEREDA, 1995), soro de queijo e de leite, soro de soja, etc. Em sua pesquisa, Jamal et al (2005) aproveitaram lodo de estação de tratamento de esgoto, devido à presença de quantidade de nutrientes e elementos traço suficientes para o crescimento de micro-organismos. Hoje em dia, na produção de ácido cítrico são utilizados resíduos do processamento de frutas cítricas como substrato, tornando o processo mais rentável (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2012), levando em conta que tais resíduos seriam descartados por terem perdido a utilidade (SILVA et al, 2012). Resíduos de frutas cítricas, importantes economicamente, são igualmente úteis como fontes nutritivas para o meio fermentativo, tais como a laranja, a acerola e o abacaxi, as quais são ricas em

sólidos solúveis, como açúcares e vitaminas (B₁, B₂, B₃ e C), possuem alto aproveitamento da polpa, e são comercializadas sob diversas formas, tais como sucos, sorvetes, geleias, pedaços cristalizados, no caso do abacaxi e do caju, etc.

Dentre outros fatores que tornam o processo fermentativo mais eficiente pode-se citar o pH, a temperatura, a composição nutricional do meio e o desempenho fúngico. Assim, este trabalho tem como intuito produzir ácido cítrico a partir de fontes naturais eficientes, introduzindo-se ao meio fermentativo resíduos de polpa de frutas cítricas (acerola e abacaxi) o qual foi suplementado de diversas fontes de nitrogênio e carbono, baseando-se no potencial biotecnológico do *Aspergillus* sp, cujos estudos revelam a necessidade em viabilizar comercialmente o processo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Produzir ácido cítrico por *Aspergillus* sp por meio de fermentação submersa, utilizando como substratos resíduos do processamento de polpas de frutas (acerola, laranja e abacaxi).

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar amostras de *Aspergillus* sp produtores de ácido cítrico através de um screening em meio sólido;
- Realizar fermentação submersa em meios de produção de ácido cítrico, utilizando as amostras de *Aspergillus* sp previamente selecionadas;
- Utilizar resíduos agroindustriais de polpas de frutas (acerola e abacaxi) para formulação de meios alternativos para produção do ácido cítrico;
- Realizar um planejamento fatorial completo para seleção do melhor meio alternativo de produção do ácido cítrico.

3 Revisão da Literatura

3.1 A Biotecnologia e os Bioativos

A Biotecnologia pode ser conceituada como um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos, ou parte deles, no desenvolvimento de processos que exerçam uma função econômica e social (FALEIRO, et al, 2011; ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013). Pode-se afirmar também que a Biotecnologia compreenda as técnicas de manipulação de micro-organismos, plantas e animais, com o objetivo de se obter processos e produtos de interesse para a sociedade (GARCIA, 2013). Dentre as diversas técnicas utilizadas, têm-se como exemplo as fermentações industriais para produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; bem como a produção de fármacos e biofungicidas, o uso de microrganismos visando à biodegradação de resíduos sólidos e líquidos e o desenvolvimento de plantas e animais melhorados geneticamente (FALEIRO, et al, 2011). É o caso da agricultura orgânica, que é um tipo de agricultura que valoriza os produtos agrícolas, reduz o uso e a dependência de insumos externos à propriedade rural, aumentando a sustentabilidade ambiental e econômica das famílias rurais (GARCIA, 2013).

O número de substâncias excretadas pelos micro-organismos é considerado infinito, e inúmeras substâncias com elevado potencial biotecnológico têm surgido a medida que novos estudos têm sido realizados (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013). Por causa disso, atualmente a Biotecnologia é uma das ferramentas mais importantes da ciência e que encontra um emprego útil para essas substâncias, proporcionando dessa forma vários benefícios a diferentes setores da sociedade, por ser uma ciência de natureza multidisciplinar, envolvendo profissionais de diversas áreas (FALEIRO, et al, 2011).

Dentre os diversos benefícios à sociedade e ao mundo científico, podemos citar as pesquisas realizadas pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, que desenvolve sistemas de informações sobre Biologia Molecular por meio de programas aplicativos, disponíveis através de seu website. O GenBank® é um desses aplicativos e consiste em uma base de dados de sequência de ácido nucléico, que recebe informações através da colaboração internacional de toda a comunidade científica (SAYERS et al, 2011).

Os micro-organismos, como os fungos e bactérias, são geralmente associados às doenças que podem provocar aos outros seres vivos, especialmente o homem. No entanto, graças aos avanços da ciência, em especial a biotecnologia, muitas são as substâncias químicas conhecidas e que são produzidas pelos micro-organismos, pois eles

desempenham papel fundamental nesse sentido (CHAPLA, 2012), através de seu metabolismo secundário, as quais encontram aplicações, inclusive na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, todas com um elevado potencial biológico. Dentre esses produtos, denominados bioativos ou naturais, podemos citar os antibióticos, anticancerígenos, imunossupressores e agentes redutores de colesterol sanguíneo (CONTI et al, 2012); como também as endotoxinas produzidas por bactérias e que são utilizadas como inseticidas (MELO et al, 2013).

Bactérias são excelentes produtoras, como os actinomicetos endofíticos (bactérias que se assemelham aos fungos filamentosos, por apresentarem cadeias de esporos ou conídios), que são fontes de produtos bioativos, como a actinomicina (CARVALHO et al, 2012). Alguns desses bioativos, como antibióticos e antifúngicos, são largamente aplicados na agricultura para proteção de plantas e sementes (SALAMONI et al, 2012).

3.2 Ácidos Orgânicos

Dá-se a denominação de ácidos orgânicos àqueles que possuem átomos de carbono em sua fórmula molecular. São produzidos pelas atividades metabólicas dos seres vivos. Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, quando encontrados no solo, são produzidos pelas raízes das plantas ou durante a decomposição da matéria orgânica (CARVALHO et al, 2013). Eles podem atuar como indicadores dos controles antissépticos e de temperatura em processos de produção, como o da aguardente (SERAFIM et al, 2011). Diversos são os ácidos orgânicos obtidos por processos fermentativos, como o ácido itacônico, o qual é produzido pelo *Aspergillus terreus* (LI et al, 2013). Alguns desses ácidos são produzidos em escala industrial e empregados como aditivos alimentares, como os ácidos cítrico, acético, láctico, glicônico (CARVALHO et al, 2005)

O mais expressivo dos grupos de ácidos orgânicos são os ácidos carboxílicos, ou seja, aqueles que apresentam o grupo funcional carboxila (COOH) (FIORUCCI et al, 2002) ligado ao carbono da cadeia principal, formado por um carbono ligado a uma hidroxila (OH) por ligação simples e a um átomo de oxigênio (O) por ligação dupla. Várias propriedades organolépticas apresentadas por esses ácidos são utilizadas como critérios para a sua classificação, tais como cheiro intenso, irritante e sabor azedo (Ex: ácidos fórmico e acético). Os ácidos de quatro a oito átomos de carbono possuem odores desagradáveis: ácidos capróico (hexanóico), caprílico (octanóico) e cáprico (decanóico). Porém, sob baixas concentrações, os ácidos orgânicos podem exalar fragrâncias agradáveis, como aqueles presentes em alguns óleos essenciais voláteis: ácidos benzóico, cinâmico, mirístico e

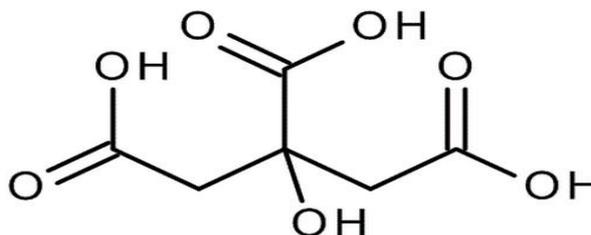
isovalérico (FIORUCCI et al, 2002). O corpo humano produz ácidos carboxílicos de baixa massa molar, resultantes do metabolismo de cada indivíduo, facilmente diferenciados pelos cães, devido a sua alta sensibilidade olfativa.

A descoberta dos ácidos carboxílicos teve contribuição importante do notável químico sueco Carl Wilhelm Scheele (1742-1786), o qual desenvolveu de 15 a 20 mil experimentos químicos, dentre os quais os compostos orgânicos de natureza ácida (ácidos carboxílicos e os fenóis), como os ácidos tartárico (2,3 – dihidroxibutanodióico), málico (2-hidroxibutanodióico), láctico (2-hidroxiopropanóico), oxálico (etanodióico), úrico, gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) e o cítrico (2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) (FIORUCCI et al, 2002).

3.3 Ácido Cítrico

O ácido cítrico, ou citrato de hidrogênio, é um ácido orgânico do tipo fraco (2-hidroxi-1,2,3,-propanotricarboxílico), cuja fórmula $C_6H_8O_6$, conforme figura x.

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido cítrico



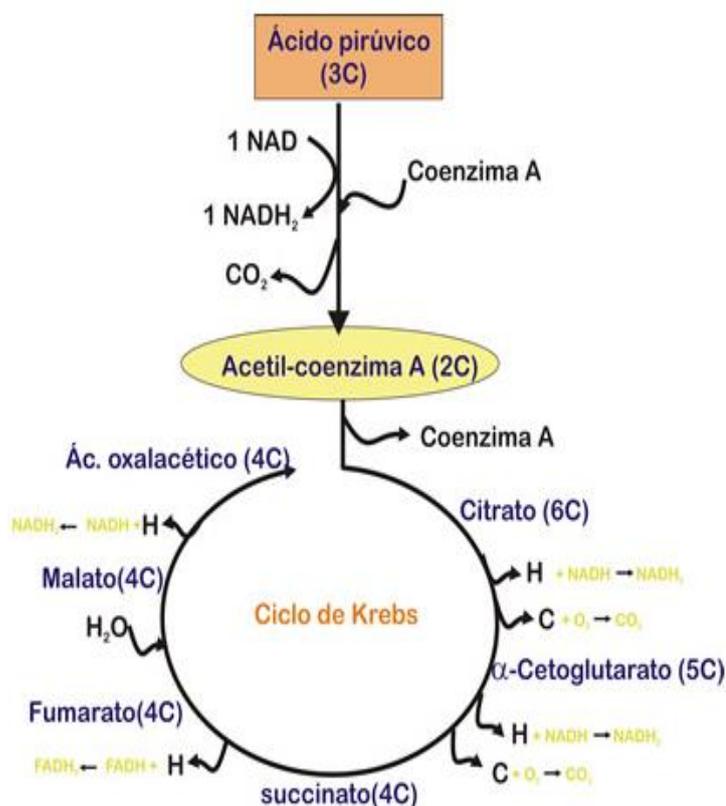
Em Bioquímica, ele tem fundamental participação no ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, também conhecido como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Corresponde a subseqüentes reações químicas que ocorrem na vida da célula e seu metabolismo. Recebe essa denominação por ter sido descoberto por Sir Hans Adolf Krebs (1900-1981), biólogo, médico e químico alemão.

O ciclo ocorre a nível mitocondrial nos seres eucariotes e no citoplasma dos procariontes, correspondente a uma parcela do metabolismo dos organismos aeróbicos. Tem como objetivo a oxidação de uma molécula da substância conhecida como coenzima A, a qual reage com o ácido pirúvico (resultante da degradação da glicose e outros carboidratos), gerando acetil-CoA, CO_2 e hidrogênio; ou seja, é uma rota anfibólica (de características catabólicas e anabólicas). De cada molécula de glicose metabolizada

formam-se duas moléculas de ATP, seis moléculas de NADH, duas de $FADH_2$ e quatro de CO_2 , a partir do ciclo de Krebs (RODRIGES, 2014).

Após o ciclo de Krebs, ocorre outro processo denominado fosforilação oxidativa. Ver figura z.

Figura 2. Ciclo de Krebs ou ciclo do Ácido cítrico



O ácido cítrico é amplamente utilizado na indústria de alimentos, bebidas, cosméticos e de fármacos (RODRIGUES et al, 2013), conforme aplicações descritas na Tabela 1.

Deste modo, a demanda anual de ácido cítrico no mundo atualmente ultrapassa 1,4 bilhões de toneladas (LIU et al, 2013). Liebig (1838) foi quem o classificou como um ácido hidróxi tribásico, o qual foi isolado pela primeira vez a partir do citrato de cálcio. Wehmer, em 1893, foi o primeiro a observar a presença do ácido cítrico como um dos subprodutos da fermentação do fungo filamentosso da espécie *Penicillium glaucum*, em meio contendo glicose (BEROVIC e LEGISA, 2007; MALAGONI, 2010), porém havia constantes riscos de contaminação nos processos. Currie (1917) encontrou uma outra espécie de fungo que realizava o processo de produção de ácido cítrico, crescendo muito bem nesses meios: o *Aspergillus niger* (BEROVIC e LEGISA, 2007).

Tabela 1. Aplicações do ácido cítrico. Fonte: Soccol et al, 2006; Sá, 2011.

Aplicações	Indústria	Função
Bebidas	Vinhos e cidras	Previne escurecimento em alguns vinhos brancos. Previne turvação de vinhos e cidras. Usado no ajuste do pH.
	Refrigerantes e xaropes	Previne acidificação excessiva. Estimula <i>flavour</i> natural de fruta. Acidulante em bebidas gaseificadas à base de sacarose
Alimentos	Geleias, compotas e conservantes	Usado no ajuste de pH. Fornece grau desejado de acidez e <i>flavour</i> . Aumenta a eficácia de conservantes antimicrobianos.
	Produtos lácteos	Como emulsificantes em sorvetes e queijos processados. Agente acidificante e antioxidante em produtos de queijo.
	Frutas congeladas	Protege ácido ascórbico por inativação de metais pesados. Abaixa pH, inativando enzimas oxidativas.
	Óleos e gorduras	Sinérgico de outros antioxidantes, como sequestrante. Ação estabilizante.
	Alimento animal	Complemento alimentar.
Agricultura	Agroindústria	Avaliação de micronutrientes em fertilizantes. Aumenta disponibilidade de fósforo em plantas.
Farmacêutica	Produtos farmacêuticos	Como efervescente em pós e tabletes em combinação com bicarbonatos. Anticoagulante. Promove rápida dissolução de ingredientes ativos. Acidulante em formulações levemente adstringentes.
	Cosméticos	Agente tamponante. Antioxidante como um quelante de íons metálicos.
Outros	Aplicações industriais	Atua como agente tamponante e sequestrante de íons metálicos. Neutraliza bases. Utilizado em processos biodegradáveis não tóxicos e não corrosivos.

Figura 3. Ácido cítrico anidro comercial.



Na indústria alimentícia, o ácido cítrico é empregado como acidulante devido a sua baixa toxicidade e alta solubilidade (RODRIGUS et al, 2013).

O ácido cítrico é um dos produtos obtidos por meio fermentativo mais largamente utilizados no mundo atualmente (RODRIGUES, 2006). Atualmente, ele é quase que exclusivamente produzido pelo fungo filamentoso amorfo *Aspergillus niger* (PASTORE et al, 2011), o qual realiza a fermentação da sacarose. O ácido cítrico é produzido por meio de processos fermentativos de dois tipos: fermentação de superfície ou em estado sólido, e fermentação submersa (PASTORE et al, 2011; SILVA, et al, 2012). O processo, em larga escala, envolve diversas etapas como a preparação do substrato de melaço; a fermentação aeróbia da sacarose pelo *A. niger*; a separação do ácido cítrico do substrato por precipitação, ao adicionar hidróxido de cálcio, ou cal apagada, para formar citrato de cálcio e, depois, adiciona-se ácido sulfúrico para decompor o citrato de cálcio. Eliminam-se impurezas com carvão ativado ou resinas de troca iônica, até a cristalização, secagem, desidratação e empacotamento do produto (SOCCOL et al, 2006).

Diversos são os fatores que influenciam na produção de ácido cítrico, tais como fontes de carbono, fósforo e nitrogênio introduzidos no meio de cultivo, elementos traços, presença de íons metálicos, tempo e quantidade de inoculação (SÁ, 2011), etc. descritos na tabela 2.

Tabela 2. Fatores químicos que afetam a produção de ácido cítrico (Fonte: Soccol et al, 2006).

Fator	Efeito positivo	Nível	Efeito negativo
Fontes de carbono	Sacarose	1-22%	Amido
	Glicose		Xilose
	Frutose		Arabinose
	Galactose		Sorbitol Ácido pirúvico
Fonte de fósforo	Fosfato monopotássico	Baixo (0,5 a 5,0g/L)	
Fonte de nitrogênio	Nitrato de amônio	Abaixo de 25% (0,1 a 4.0g/L)	Alta concentração (Produção de biomassa)
	Sulfato de amônio		
	Peptona		
	Extrato de malte		
Elementos traço	Ureia	Baixos níveis (0,02 a 0,025%)	Manganês (1ppm)
	Zinco		
	Cobre		
	Sulfato de magnésio		
Álcoois inferiores	Metanol	1-4% (volume por unidade de massa)	
	Etanol		
	N-propanol		
	Isopropanol		
Óleos e gorduras	Metilacetato	0,05 a 0,3%	
Outros componentes	Fluoreto de cálcio		Ferrocianeto de potássio Compostos de quaternário de amônio Óxidos de aminas
	Fluoreto de sódio		
	Potássio		
	3-hidroxi-2-ácido naftoico		
	4-metil umbeliferona		
	Ácido benzoico		
	2-ácido naftoico		
	Cianeto de ferro		
	EDTA		
	Vermiculite		
H ₂ O ₂			

3.4 Micro-Organismos Produtores de Ácido Cítrico

Além dos micro-organismos citados acima, há outros que são produtores de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico. Dentre eles, podemos citar a *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium luteum*, *Aspergillus clavatus*. As espécies das quais se obtém os maiores rendimentos de ácido produzido são de particular interesse para a indústria e o gênero *Aspergillus* tem-se apresentado como o maior produtor

atualmente (PASTORE, et al, 2011). O *Aspergillus niger* tem como principal vantagem o fato de poder crescer bem em meios com valores baixos de pH (em torno de 2,5 a 3,5), o que pode evitar os riscos de contaminação, muito comuns nos processos fermentativos de Wehmer (BEROVIC e LEGISA, 2007). Os fungos do gênero *Penicillium* necessitam de uma solução de 10 a 12% de glicose no meio fermentativo, dos quais 50% serão convertidos em ácido cítrico (MALAGONI, 2010). A única levedura descrita na literatura capaz de produzir ácidos orgânicos, tais como o cítrico e o isocítrico, é a *Yarrowia lipolytica* (KAMZOLOVA, et al, 2003; DARVISHI et al, 2009; YALCIN, 2012; ÁVILA-NETO et al, 2014).

Segundo Alexopoulos et al (1996), fungos são micro-organismos eucarióticos, produtores de esporos, aclorofilados, com nutrição por absorção, que se reproduzem tanto de forma sexuada como assexuada, de cuja estrutura somática podem ramificar-se filamentos, denominados hifas – no caso dos fungos filamentosos – que são rodeados por parede celular.

Tabela 3. Micro-organismos produtores de ácido cítrico. (Fonte: Malagoni, 2010).

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Penicillium restrictum</i>
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>	<i>Trichodema viride</i>
<i>Aspergillus luchensis</i>	<i>Mucor piriformis</i>
<i>Aspergillus urentti</i>	<i>Ustulina vulgaris</i>
<i>Aspergillus saitoi</i>	<i>Botrytis</i> sp
<i>Aspergillus usami</i>	<i>Ascochyta</i> sp
<i>Aspergillus fumaricus</i>	<i>Absidia</i> sp
<i>Aspergillus phoenicius</i>	<i>Talaromyces</i> sp

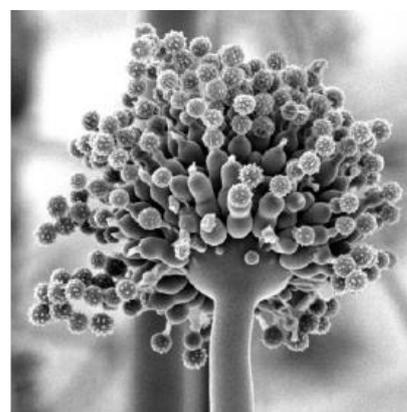
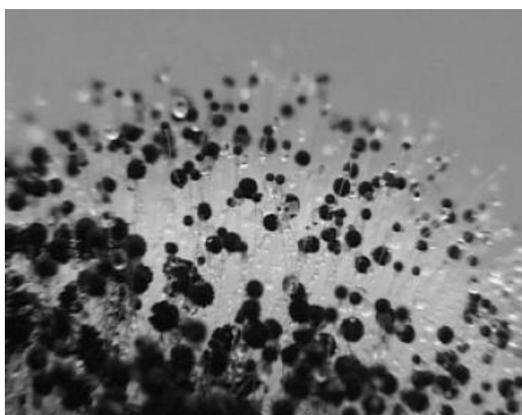
3.5 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* (principal gênero produtor de ácido cítrico conhecido na literatura) pertence ao filo *Ascomycota*, na ordem dos *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*. O filo *Ascomycota* caracteriza-se por apresentar micélio compartimentado, uma fase dicariótica no seu ciclo de vida, certas estruturas associadas com produção de esporos, conídios e, algumas vezes, com um complexo sistema de dispersão. Possuem dois tipos distintos de reprodução: sexuada, envolvendo a formação de ascos (células dicarióticas) e ascósporos; e assexuada, com esporos produzidos em diferentes períodos no mesmo micélio (ALEXOPOULOS et al, 1996). Os fungos do gênero *Aspergillus*, em especial o *Aspergillus* de cor preta, são um importante grupo que fazem parte da micologia de alimentos, micologia médica e biotecnologia (PERRONE et al, 2013), podendo associar-se tanto com leveduras

quanto com bactérias, em fermentações mistas na indústria de alimentos e bebidas em todo o mundo, particularmente na Ásia (ALEXOPOULOS et al, 1996).

Recentemente, estudos mostraram os perigos para a saúde humana e animal que espécies do gênero *Aspergillus* podem provocar, por serem produtores de duas micotoxinas: a ocratoxina A e as fumonisinas (RODRIGUES, VENÂNCIO, LIMA, 2013), além de apresentar mais ocorrências de infecções humanas invasivas e não invasivas que o *A. fumigatus*, *A. terreus* ou *A. flavus* (PERRONE et al, 2013).

Figura 4. Micrografia de *Aspergillus niger*



3.6 Solo da Caatinga

Os solos de modo geral apresentam características e propriedades que podem variar de acordo com o tamanho das partículas ou agregados, a porosidade entre e no interior dos agregados, bem como a quantidade destes, definindo assim a sua estrutura. Além do mais, a estrutura do solo exerce uma importância fundamental em diversos processos físico-químicos, tais como, movimentação hídrica, aeração e transferência de calor (COSTA et al, 2014).

De modo geral, os solos são ambientes amplamente enriquecidos de natureza complexa, dinâmica e heterogênea, em virtude de compor uma enorme variedade de espécies, incluindo micro-organismos, os quais metabolizam substâncias de forma equilibrada a toda a biodiversidade existente nesse habitat (OSAKI, 2008; BRAZ et al, 2014), inclusive ácidos orgânicos de baixo peso molecular e que possuem um ou mais grupos carboxílicos (CARVALHO et al, 2013). Portanto, de todos os componentes do solo, a fração biológica é a que se apresenta como a mais influente sobre as demais características

(BRAZ et al, 2014), em consequência da grande parcela de material orgânico que se dispõe sobre a sua camada mais superficial e passa a interagir com seus diversos componentes.

O bioma da Caatinga está inserido entre os 42% correspondentes às florestas secas que compõem todo o globo terrestre e caracteriza-se por apresentar vegetação arbórea ou arbustiva, com árvores e arbustos xerófitos, apresentando espinhos, microfilia, caducifolia, raízes tuberosas e dormência das sementes (FERREIRA, 2013). Predominante em grande parte da Região Nordeste do Brasil, os solos do semiárido nordestino ocorrem na transição entre a Mata Atlântica e a Caatinga (RODAL et al, 2008), apresentando características de alta complexidade e diversidade biológica, resultante da heterogeneidade de microambientes (CABRAL et al, 2013), sendo alvo de intensa exploração e degradação ao longo dos anos.

Os solos da Caatinga apresentam características singulares, intimamente atreladas ao clima extremo que as envolve, que os obriga a sobreviver a longos períodos de seca e falta de regularidade pluviométrica, o que corresponde a precipitações anuais em torno de 260 a 800mm (SOUTO, 2006; CABRAL et al, 2013).

3.7 Processos Fermentativos

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente produzido pelo fungo filamentoso amorfo *Aspergillus niger* (PASTORE et al, 2011), o qual realiza a fermentação da sacarose. O ácido cítrico pode ser produzido pelos dois tipos de fermentação citados anteriormente, ou seja, fermentação no estado sólido (FES), e fermentação submersa (FSm) (PASTORE et al, 2011; SILVA, et al, 2012). Na FES adiciona-se geralmente o ágar ao meio fermentativo, onde os micro-organismos crescem na ausência ou quase na ausência de água livre (FERNANDES et al, 2007). Esse processo ocorre na superfície de materiais sólidos capazes de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis (SILVA, 2002). O acréscimo de substratos fibrosos ao meio fermentativo é essencial como fonte nutritiva para o micro-organismo (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Na fermentação submersa (FSm) os nutrientes são disponibilizados para o micro-organismo em meio líquido, ao qual são adicionados nutrientes como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons), dissolvidos em água ou mesmo soluções tampões. A agitação constante é ideal para a aeração e disponibilidade de nutrientes (FERNANDES et al., 2007; FARINAS et al., 2011).

Os bioativos assumem as características dos fungos que os originaram direta ou indiretamente, incluindo sabor e aroma. Isso se deve às atividades fermentativas dos mesmos. Os processos fermentativos, portanto, são de vital importância para a indústria

química, farmacêutica e a agricultura, no desenvolvimento de produtos, como etanol, ácidos orgânicos (cítrico, láctico, acético, etc.), solventes (acetona, butanol, etc.), enzimas (lipases, amilases, proteases, etc.), vitaminas e antibióticos. Essas atividades fermentativas podem ser do tipo submersa ou em meio líquido, ou fermentação em meio sólido. Em ambos os casos, o fungo específico é inoculado no meio nutritivo apropriado para a produção do bioativo que se deseja, convertendo o substrato em produto. O sucesso de qualquer processo fermentativo depende principalmente da escolha do melhor micro-organismo, do meio de cultura selecionado, da forma com que será conduzido o processo e das etapas de recuperação dos bioativos. Carvalho e Zambiasi (2011) verificaram que no processo fermentativo da produção da cerveja, certos fatores foram indispensáveis, como composição e concentração do meio (mosto), características do micro-organismo, quantidade de oxigênio, temperatura, pressão do meio e tempo de fermentação. Um ajuste em cada um deles influenciou na qualidade do produto final.

É importante também levar-se em consideração os principais constituintes do meio, onde utilizam-se as fontes de nitrogênio adicionadas, pois o nitrogênio é um componente essencial do tecido fúngico e está presente em todas as moléculas de aminoácidos e, conseqüentemente nas proteínas. Das várias fontes de nitrogênio conhecidas, os micro-organismos, de modo geral, assimilam melhor a amônia (PASTORE et al, 2011).

O sulfato de amônio prolonga o crescimento vegetativo dos fungos, enquanto que o nitrato de amônio o reduz, além de acumular o ácido oxálico. O KNO_3 e o $NaNO_3$ são também mais efetivos que o nitrato de amônio para a produção, pois estimula o crescimento de *A. niger* (PASTORE et al, 2011; MALAGONI, 2010). Outro aspecto que contribui para a produção de ácido cítrico é a incorporação de outros componentes, além do nitrogênio, como fósforo, enxofre e traços de elementos. No que diz respeito à concentração de açúcar utilizada, observa-se que a baixas concentrações, o percentual de ácido oxálico formado aumenta e a taxa de produção de ácido cítrico diminui muito. Porém, a altas concentrações, o processo de extração do ácido cítrico torna-se economicamente inviável (MALAGONI, 2010).

3.8 Resíduos Agroindustriais

A agroindústria consiste em uma série de atividades que se relacionam com a transformação de matérias-primas oriundas da agricultura, pecuária, aquicultura ou silvicultura, as quais visam ao fornecimento de insumos para o consumidor. A agroindústria vive um grande momento no cenário nacional, registrando um crescimento de 4,7% em 2010, segundo o IBGE. O desenvolvimento dessas atividades contribui de forma significativa

para a crescimento da indústria alimentícia, em especial a indústria de polpa de frutas, a qual tem apresentado um grande aumento na produção (SANT'ANNA et al, 2012).

Em todas essas atividades, devido ao acelerado desenvolvimento da agroindústria, grande parte da matéria-prima passa a gerar uma enorme quantidade de resíduos e rejeitos (ASHOUR et al, 2014) que precisam ser descartados ou destruídos de forma a provocar o mínimo de impactos ao meio ambiente.

Dessa forma, faz-se necessário definir resíduo e rejeito. Pode-se conceituar resíduo como algo que fez parte de um processo produtivo ou não, e que, a princípio, torna-se inservível, necessitando ser disposto de maneira atóxica e, de preferência, que não seja percebido pelas atuais e futuras gerações; ou então ser reaproveitado, ao ser incorporado a outros processos ditos sustentáveis. Rejeito consiste na parte inaproveitável dos resíduos, restando apenas a sua disposição final a qual compreende sua inativação, neutralização, descontaminação ou desintoxicação.

Resíduos de naturezas diversas têm sido utilizados como substratos para a produção do ácido cítrico, tais como melação de cana-de-açúcar, melação de beterraba, resíduos de frutas, como manipueira (LEONEL, CEREDA, 1995), pinha e graviola (MARCELLINI et al, 2003) ou mangaba e acerola (SILVA et al, 2012), soro de queijo e de leite, soro de soja, sabugo de milho (ASHOUR et al, 2014) etc. Além do mais, diversos outros produtos da agroindústria são empregados para produção deste ácido, conforme Tabela 4 e 5, dependendo do tipo de fermentação utilizada:

Em sua pesquisa, Jamal et al (2005) aproveitaram lodo de estação de tratamento de esgoto, devido à presença de quantidade de nutrientes e traços de elementos suficientes para o crescimento de micro-organismos. Majumder et al (2010) realizaram estudos com o *Aspergillus niger* utilizando como substratos para a produção melação de cana-de-açúcar e abóbora. Sá (2011) e Ávila-Neto et al (2014) utilizaram o glicerol, um derivado do biodiesel, para a produção do ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. Kamzolova et al (2011) realizaram ensaios com 66 cepas de diferentes gêneros de leveduras, utilizando glicerol como substrato para a produção do ácido.

Tabela 4. Matérias-primas empregadas em fermentação submersa e semi-sólida para produção de ácido cítrico. (^a com base no consumo de açúcar; ^b com base em óleos e ácidos graxos) Fonte: SOCCOL et al, 2006; SÁ, 2011.

Matérias-primas	micro-organismos	Y (AC) Kg/m³	Rendimento (%)
Melaço de beterraba	<i>A. niger</i> ATTC 9142	109	--
	<i>Yarrowia lipolytica</i> A101	54	68,7a
Melaço preto	<i>A. niger</i> GCM 7	86	--
Resíduos de cervejaria	<i>A. niger</i> ATTC 9142	19	78,5
Melaço de cana-de-açúcar	<i>A. niger</i> T 55	--	65
	<i>A. niger</i> GCM 7	113,6	100
Extrato de alfarroba	<i>A. niger</i>	86	
Óleo de coco	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	99,6
Amido de milho	<i>A. niger</i> IM-155	--	62
Xarope de data	<i>A. niger</i> ATTC 9142	--	50
Glicerol	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	58,8
Amido hidrolisado	<i>Y. lipolytica</i> DS-1	--	--
	<i>Y. lipolytica</i> A101	--	75
	<i>A. niger</i> UE-1	74	49
n-parafina	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	161b
Azeite de oliva	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	119b
Óleo de palma	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	155b
Azeite de colza	<i>S. lipolytica</i> A101	--	57
	<i>A. niger</i>	--	115b
Óleo de soja	<i>Y. lipolytica</i> A101	--	63
	<i>C. lipolytica</i> N-5704	--	115b
Hemicelulose da madeira	<i>A. niger</i> IMI-41874	27	45a
	<i>S. lipolytica</i> IFO-1658	9	41
Xilana hidrolisada	<i>A. niger</i> YANG No.2	72	--
Inhame e amido de feijão	<i>A. niger</i> YW-112	--	74a

Tabela 5. Matérias-primas empregadas em fermentação no estado sólido para a produção de ácido cítrico. (a - com base no consumo de açúcar; b - com base na matéria seca).

Fonte: SOCCOL et al, 2006; SÁ, 2011.

Matérias-primas	Micro-organismos	w (AC) Kg/m ³	Rendimento (%)
Bagaço de maçã	<i>A niger</i> NRRL 2001	766a	--
	<i>A niger</i> NRRL 2270	816a	--
	<i>A niger</i> NRRL 599	771a	--
	<i>A niger</i> NRRL 328	798a	--
	<i>A niger</i> NRRL 567	883a	--
	<i>A niger</i> BCI	124	80
Alfarroba	<i>A niger</i> ATCC 9142	264	60
Resíduos de cenoura	<i>A niger</i> NRRL 2270	29a	36
Bagaço de mandioca (frascos) (escala semi-piloto)	<i>A niger</i> LPB-21	347b	67
	<i>A niger</i> LPB-21	260b	--
	<i>A niger</i> CFTRI-30	234	--
Hidrolisado de Celulose e cana-de-açúcar	<i>A niger</i>	29	44
Casca de café	<i>A niger</i> CFTRI-30	150b	--
Sabugo de milho	<i>A niger</i> NRRL 2001	250	50
	<i>A niger</i> NRRL 2270	603,5	--
Farelo de arroz oleoso	<i>A niger</i> CFTRI-30	92	--
Bagaço de uva	<i>A niger</i> NRRL 2001	413a	88
	<i>A niger</i> NRRL 2270	511a	--
	<i>A niger</i> NRRL 599	498a	--
	<i>A niger</i> NRRL 328	523a	--
	<i>A niger</i> NRRL 567	600a	--
Casca de kiwi	<i>A niger</i> NRRL 567	100a	--
Kumara (com amido)	<i>A niger</i> YANG No.2	103b	--
Melaço (bagaço de cana)	<i>A niger</i> DSI		
	(clarificado)	198	64,5
	(não clarificado)	179	62,5
Resíduos de process. de mexilhão (espuma de poliuretano)	<i>A niger</i>	300	--
Okara (resíduo de soja)	<i>A niger</i>	51a	53
Resíduos de laranja	<i>A niger</i>	46	--
Resíduos de abacaxi	<i>A niger</i> ATCC 1015	132b	--
	<i>A niger</i> ACM 4942	194b	74
Farelo de arroz	<i>A niger</i> CFTRI-30	127	--
Sacarose (bagaço de cana- de-açúcar)	<i>A niger</i> CFTRI-30	174b	--
Caldo de cana e farelo de trigo	<i>A niger</i> CFTRI-30	116	--
Farelo de trigo	<i>A niger</i> CFTRI-30	85	--

Atualmente, na produção de ácido cítrico também são utilizados resíduos do processamento de frutas cítricas como substrato, tornando o processo mais rentável (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2012), levando em conta que tais resíduos seriam descartados por terem perdido a utilidade (SILVA et al, 2012).

Esses resíduos de frutas cítricas, além de importantes economicamente, são igualmente úteis como fontes nutritivas para o meio fermentativo, tais como a acerola e o abacaxi, as quais são ricas em sólidos solúveis, como açúcares e vitaminas (B₁, B₂, B₃ e C), possuem alto aproveitamento da polpa, e são comercializadas sob diversas formas, tais como sucos, sorvetes, assim como em pedaços cristalizados, no caso do abacaxi e do caju, etc.

3.9 Frutas Cítricas

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas (MACIEL et al, 2009) e possui uma vasta diversidade de frutas cítricas as quais são responsáveis, em grande parte, por um impulso na economia, tanto pelo comércio interno quanto pela exportação. A região do Vale do São Francisco é considerada uma das áreas mais produtoras e exportadoras do país (MACIEL et al, 2009). Como representantes da Região Nordeste, podemos citar a acerola (*Malpighia glabra* e *Malpighia emarginata*) e o abacaxi (*Ananas comosus*). Outro exemplo, pertencente ao Sudeste, é a laranja (*Citrus aurantium*), que é produzida em larga escala, fato que coloca o Brasil, e mais especificamente o Estado de São Paulo, como o maior produtor de laranjas do mundo.

O cultivo de frutas cítricas, ou também chamadas de citros, foi introduzido no Brasil ainda no período colonial, entre 1530 e 1540, e desde essa época passou a fazer parte dos hábitos alimentares da população. No entanto, o Brasil só assumiu sua posição como maior produtor mundial apenas em meados da década de 80 (USP, 2004; COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Os citros carregam em si substâncias que fornecem diversos benefícios à saúde humana. Essas substâncias são capazes de reduzir os radicais livres e possuem atividades antioxidantes e antiinflamatórias; são elas: ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides, antocianinas, carotenoides e diversos compostos fenólicos (MACIEL et al, 2009; FERREIRA et al, 2012; NUNES et al, 2012; PEREIRA et al, 2013; OLIVEIRA-JUNIOR et al, 2014).

A capacidade antioxidante e o valor nutricional, devido principalmente ao ácido ascórbico e compostos fenólicos, variam de acordo com a composição dessas substâncias encontradas nas frutas. Outros fatores que influenciam são as condições de plantio, estações do ano e condições climáticas. De acordo com os estudos realizados por Couto e Canniatti-Brazaca (2010) com diversas espécies de laranjas e tangerinas, em colheitas feitas entre outubro de 2006 e maio de 2007, eles concluíram que as laranjas são mais ricas em vitamina C e em antioxidantes do que as tangerinas. (Tabelas 6 e 7).

É de extrema importância o conhecimento das propriedades físico-químicas de frutas nativas (MELO, SELEGUINI, VELOSO, 2013) para que assim se possam encontrar as aplicações biotecnológicas mais apropriadas. Apesar do conhecimento que se tem com respeito à composição nutricional dessas frutas e de todos os efeitos benéficos à saúde da população, ainda é grande o desperdício de alimentos, alcançando, de acordo com a Embrapa (2007), cerca de 26 milhões de toneladas ao ano, o que poderia alimentar uma população de 35 milhões de pessoas. Ainda não se tem uma preocupação em se utilizar todas as partes que as compõem, tais como, folhas, talos, cascas e sementes, ao invés de apenas fazer um aproveitamento da parte nobre das mesmas, sabendo-se que a maior parcela nutricional se concentra justamente nessas partes que são rejeitadas. Sabe-se que cascas, talos e folhas são ricos em fibras e lipídios, como as cascas da banana, laranja e limão (ROCHA et al, 2008).

Tabela 6. Teores de ácido ascórbico das variedades de citros.

Amostra	Ácido ascórbico (mg.100mL⁻¹ suco)
Tangerina ponkã	32,47 ± 1,79 ^{1d2}
Tangerina murcote	21,47 ± 1,11 ^c
Laranja pêra	62,50 ± 0,96 ^c
Laranja lima	64,58 ± 0,46 ^c
Laranja natal	84,03 ± 3,18 ^a
Laranja valência	78,47 ± 1,20 ^b
Laranja bahia	80,03 ± 1,03 ^{ab}

¹ Média ± desvio padrão de três repetições; e ² Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ($p \leq 0,05$). Fonte: Couto e Canniatti-Brazaca (2010).

Tabela 7. Capacidade antioxidante das variedades de citros.

Amostra	Ácido ascórbico (mg.100mL⁻¹ suco)
Tangerina ponkã	29,30 ± 1,43 ^{1d2}
Tangerina murcote	12,78 ± 3,47 ^c
Laranja pêra	49,15 ± 3,32 ^b
Laranja lima	66,24 ± 2,35 ^a
Laranja natal	51,28 ± 2,03 ^b
Laranja valência	41,84 ± 0,49 ^c
Laranja bahia	60,32 ± 2,62 ^a

¹ Média ± desvio padrão de três repetições; e ² Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ($p \leq 0,05$). Fonte: Couto e Canniatti-Brazaca (2010).

Figura 5. Laranjal em Avaré, SP.



Fonte: www.wikipedia.org

No entanto, há poucos estudos abordando esse tema, o que seria interessante, uma vez que diversas frutas sofrem perdas significativas, tais como o abacate (31%), abacaxi (24%), laranja (22%), banana (40%), manga (27%) e morango (39%) (STORCK, et al, 2013). O reaproveitamento dessas partes, que seriam descartadas, em processos, tais como a

produção de ácido cítrico em larga escala, assumiria também um cunho ambiental, uma vez que as mesmas seriam inutilizadas.

3.9.1. Acerola

Os frutos da acerola (*Malpighia glabra* ou *Malpighia emarginata*) são uma drupa de superfície lisa ou dividida em três gomos, com tamanhos variados de 3 a 6 cm de diâmetro (Ver figura). A acerola pertence à família *Malpighaceae* (PEREIRA et al, 2013), a qual possui cerca de 63 gêneros e 850 espécies, das quais em torno de 30 espécies pertencem ao gênero *Malpighia*. Sua coloração pode variar do alaranjado ao vermelho intenso e quando maduros (Ver figura 3), apresentam polpa carnosa e suculenta (ARAÚJO et al, 2013).

A acerola é igualmente conhecida como “cereja-das-antilhas”, por ser uma fruta originária das Antilhas, Norte da América do Sul e América Central e foi introduzida na Região Nordeste, mais especificamente no Estado de Pernambuco, no ano de 1955, a partir de sementes trazidas de Porto Rico, vindo a adquirir, posteriormente, importância mundial (ARAÚJO et al, 2013). Atualmente, a cultura de acerola no Brasil tem sido bastante difundida em virtude da boa aceitação e adaptabilidade da espécie ao clima e solos brasileiros (NEVES, LIMA, 2010).

Figura 6. Aceroleira apresentando acerolas maduras (*Malpighia glabra*) de coloração vermelho intenso.



Essa fruta é considerada uma fonte natural de vitamina C e possui, além de compostos antioxidantes, carotenoides e fitoquímicos, como flavonoides (antocianinas), bem

como tiamina, niacina, proteínas e minerais, como sódio, cálcio, potássio e, principalmente, ferro (MACIEL et al, 2009; PEREIRA et al, 2013). Apesar de ser uma rica fonte de vitamina C, e embora a concentração dessa vitamina sofra um decréscimo no processo de maturação da fruta, a acerola madura ainda conserva em si um alto teor da vitamina C (NEVES, LIMA, 2010). A seleção dos frutos para a comercialização é feita com base em seu teor vitamínico; desse modo, aqueles que produzem mais que 1000mg de ácido ascórbico por 100g de suco (polpa) são considerados apropriados para consumo por atenderem aos padrões de qualidade. Aqui no Brasil, a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina C para adultos é de 60mg (BRASIL, 1998; ARAÚJO et al, 2013).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por intermédio de sua Instrução Normativa n.12, de 04 de setembro de 2003, regulamenta os padrões de identidade e qualidade para o suco tropical de acerola, devendo a fruta se adequar aos padrões de cor (variando do amarelado ao vermelho) e sabor e aroma próprios (ver Tabela 6).

De particular interesse para a indústria farmacêutica, encontram-se os flavonoides, importantes componentes da acerola, que são compostos de natureza fenólica e podem ser encontrados em espécies vegetais, principalmente em plantas vasculares, apresentando ampla ocorrência e importância terapêutica. Entre as principais famílias botânicas cuja ocorrência de flavonoides é significativa, encontram-se as famílias *Fabaceae*, *Bromeliaceae*, *Annonaceae* e *Moraceae* (VUKICS, GUTTMAN, 2010; NUNES et al, 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al, 2014).

Tabela 8. Padrões de qualidade (composição) para suco tropical de acerola. Fonte: Brasil, 2003.

	Não adoçado		Adoçado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Polpa de acerola (g/100g)	60,00	-----	35,00	-----
Sólidos solúveis em °Brix,a 20°C	5,00	-----	10,00	-----
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g)	0,80	-----	0,20	-----
Açúcares totais (g/100g)	-----	8,50	7,00	-----
Ácido ascórbico (mg/100g)	600,00	-----	200,00	-----

De modo geral, as frutas tropicais, como acerola e pitanga, são bastante frágeis em termos de conservabilidade, chegando a perecer em poucos dias (MORAIS et al, 2010;

OLIVEIRA et al, 2014). Esse fato impõe a necessidade de serem comercializadas sob a forma de diversos produtos industrializados com o objetivo de viabilizar o acesso e o consumo, como polpas, geleias, sorvetes e doces, além do comércio *in natura*. Devido ao alto teor de fitoquímicos bioativos presentes na acerola, esta pode ser vista também como agente enriquecedor na produção de geleias mistas com outras frutas, néctares e refrigerantes (MACIEL et al 2009).

3.9.2 Abacaxi

O Abacaxi (*Ananas comosus*) é uma fruta exótica típica de países tropicais e subtropicais, não se adaptando a regiões de clima frio; pertencente à família *Bromeliacea*. É um dos mais importantes exemplos do setor internacional de frutas, com uma crescente produção de 4 milhões de toneladas em 1960 para 16 milhões de toneladas em 2005 (LUN, WAI, LING, 2014). O abacaxi é considerada uma fruta exótica, dentre a imensa variedade de espécies frutíferas exóticas, as quais vêm alcançando um grande potencial para o mercado industrial, contribuindo para o desenvolvimento de produtos que vêm adquirindo forte aceitação entre os consumidores (ASSUMPÇÃO et al, 2013; CASTRO et al, 2014).

A Embrapa (2013) realizou estudos para uma produção de cultivares de abacaxis, que resultaram em três cultivares diferentes: BRS Ajubá, BRS Imperial e BRS Vitória, os quais desenvolveram características de resistência à fusariose, elevado teor de açúcar, acidez titulável moderada (cerca de 0,8%), frutos mais pesados (em torno de 1.600g, sem a coroa), folhas completamente lisas, resistência ao escurecimento interno (facilitando assim a exportação e a aceitação no mercado internacional), compreendendo uma poderosa solução tecnológica feita em parceria com outras instituições.

Quanto a composição nutricional, o abacaxi tem elevado índice de carboidratos e vitamina C, sendo um fruta muito apreciada tanto na forma *in natura* ou para a fabricação de sucos a tabela 9 indica a caracterização físico-química do abacaxi.

Tabela 9. Caracterização físico-química do abacaxi da variedade pérola. Fonte: Oliveira et al, 2012; Parente, 2014.

Determinações	Valor Médio
pH (25°C)	3,06
Sólidos Solúveis	13,56
Acidez titulável (% Ác. Cítrico)	0,57
Umidade (%)	85,50
Cinzas (%)	0,31
Açúcares totais (%)	9,60
Açúcares redutores (%)	4,36
Carboidratos (%)	13,18
Vitamina C (mg.Kg ⁻¹)	287,20

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por intermédio de sua Instrução Normativa n.12, de 04 de setembro de 2003, regulamenta os padrões de identidade e qualidade para o suco tropical de abacaxi, que deve se adequar aos padrões de cor (variando do branco ao amarelado) e sabor e aroma próprios (ver Tabela 10).

Tabela 10. Padrões de identidade e qualidade para suco tropical de abacaxi. Fonte: Brasil, 2003.

	Não adoçado		Adoçado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Polpa de abacaxi (g/100g)	60,00	-----	50,00	-----
Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C	6,00	-----	11,00	-----
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g)	0,16	-----	0,20	-----
Açúcares totais (g/100g)	15,00	-----	8,00	-----

4. Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.

ANDRADE, V.; COSTA, M.; COSTA, M.; LIMA, T.; CRUZ, F. **Ácidos orgânicos: ácido cítrico, ácido acético e ácido láctico sua importância a biotecnologia**. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, Belém- PA, 2009.

ANGUMEENAL, A. R. e VENKAPPAYYA, D. **An overview of citric acid production**. LWT - Food Science and Technology, v. 50, n. 2, p. 367-370, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.016.

ASHOUR, A.; EL-SHARKAWY, S.; AMER, M.; MARZOUK, A.; ZAKI, A.; KISHIKAWA A.; OHZONO, M.; KONDO, R.; SHIMIZU, K. Production of citric acid from corncobs with its biological evaluation. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, n. 3, p. 141-149, 2014.

ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; GUAGLIANONI, D. G.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; **Partial purification and characterization pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.)**. Journal of Agricultural Food Chemistry, Easton, v. 5, p. 4103-4107, 2002.

ASSUMPÇÃO, C. F.; BACHIEGA, P.; SANTANA, A. T. M. C.; MORZELLE, M. C.; VILASBOAS, B. M.; SOUZA, E. C. Néctar misto de mangaba (*Hancoria speciosa* Gomes) e cagaita (*Eugenia dysenterica*): perfil sensorial e características físico-químicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 219-224, 2013.

BENNETT, J. An overview of the genus *Aspergillus*. In: Masayuki Machida, Katsuya Gomi. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Grã-Bretanha: Caister Academic Press, 2010. P. 1-17.

BEROVIC, M.; LEGISA, M. **Citric acid production**. Biotechnology Annual Review, v. 13, p.303-343, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.12, de 04 de setembro de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; e os Padrões de Identidade e Qualidade para Néctares. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

BRASIL. Portaria SVS/MS no33, de 13 de janeiro de 1998. Tabelas de Ingestão Diária Recomendada (IDR). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3922ed804aaa75899e68de4600696f00/Portaria_SVS_MS_33_de_janeiro_de_1998.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 mai. 2014.

BRAZ, M. R. S.; RODRIGUES, L.; SILVEIRA, I. A.; SANTOS, E. C. G. Substâncias antagonistas produzidas por bactérias isoladas de amostras de solo do Rio Pitimbu/RN contra cepas de *Staphylococcus* spp. **FACIDER Revista Científica, Colider**, n. 06, p. 32-50, 2014.

CABRAL, G. A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. **Estrutura espacial e biomassa da parte aérea em diferentes estádios sucessionais de caatinga em Santa Terezinha, Paraíba**. Revista Brasileira de Geografia Física, v. 6, n. 03, p. 566-574, 2013.

CARVALHO, D. S.; ZAMBIAZI, R. C. **Avaliação do processo fermentativo de cerveja Pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae***. Alim. Nutr., v. 22, n. 3, p. 351-357, 2011.

CARVALHO, S. A.; LIMA, J. M.; CURI, N.; SILVA, C. A.; TOLEDO, J. P. V. F.; SOARES, F. V. **Coeficiente de distribuição do inseticida Tiametoxam na fração mineral de solos sob efeito de ácidos orgânicos mono, di e tricarbônicos**. Química Nova, v. 36, n. 9, p. 1323-1331, 2013.

CARVALHO, T. S. OLIVEIRA, D. V.; VAN DER SAND, S. T. **Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos**. Revista Tropica: Ciências Agrárias e Ambientais, v. 6, n. 3, p. 154-157, 2012.

CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. **Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa – Parte I: ácidos orgânicos**. Revista Analytica, n.18, p. 70-76, 2005.

CHAPLA, V. M.; BIASSETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais**. Revista Virtual de Química. No prelo 2012.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. **Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos**. Ciência e Cultura, v.64, n. 3, p. 43-46, 2012.

COSTA, P. A.; MOTA, J. C. A.; ROMERO, A. G. F.; FERREIRA, T. O. **Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast Brazil**. Soil & Tillage Research, v. 137, p. 23-32, 2014b.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. **Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 30 (Supl. 1), p. 15-19, 2010.

DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 562943, 2009.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Abacaxis da Embrapa chegam ao mercado: BRS Imperial, BRS Ajubá e BRS Vitoria**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/960339/abacaxis-da-embrapa-chegam-ao-mercado-brs-imperial-brs-ajuba-e-brs-vitoria>>. Acesso em: 20 abril 2014.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O papel dos bancos de alimentos na redução do desperdício de alimentos**. Set, 2007. Disponível em: <<http://pessoal.utfpr.edu.br/marlenesoares/arquivos/BancodeAlimentosEmbrapa.pdf>>Acesso em: set. 2013.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, 730 p.

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. **Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced**

by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. Brazilian Journal Chemical Engineering, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media**. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 44, n. 1, p. 8-13, 2007.

FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; LAGES, M. M. B.; RODRIGUES, V. A. F.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D. Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jabuticaba em biscoitos tipo cookie. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

FERREIRA, E. G. B. S. **Potencial fisiológico de sementes e produção de mudas de espécies florestais ocorrentes na Caatinga de Pernambuco**. 2013, 161p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2013.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano**. Química Nova na Escola, n. 15, p. 6-10, 2002.

GARCIA, Antônio Corrêa. **A biotecnologia e a extensão rural como ferramentas de transformação da realidade rural em Alpestre-RS**. 2013. 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GRAHAM, A. F.; LUND, B. M. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 61, Issue 1, p. 39-49, 1986.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed., p. 70-76; 90-112, 2008.

JAMAL, P. et al. **Sewage treatment plant sludge: a source of potential microorganism for citric acid production**. American Journal of Applied Sciences, v. 2, n. 8, p. 1236-1239, 2005.

JIN, E. S.; SHERRY, A. D.; MALLOY, C. R. Metabolism of glycerol, glucose and lactate in the citric acid cycle prior to incorporation into hepatic acylglycerols. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 20, p. 14488-14496, 2013.

KAMZOLOVA, S. V. **Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica***. Elsevier Science, v. 3, p. 217-222, 2003.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger***. Sci. Agric., v. 52, n. 2, p. 299-304, 1995.

LI, A.; PFELZER, N.; ZUIJDERWIJK, R. BRICKWEDDE, A.; ZEIJL, C.; PUNT, P. Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-4684-x.

LIU, X. Y.; CHI, Z.; LIU, G. L.; MADZAK, C.; CHI, Z. M. **Both decrease in *ACL1* gene expression and increase in *ICL1* gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing *INU1* gene enhance citric acid production from inulin**. Marine Biotechnology, v. 15, Issue 1, p. 26-36, 2013.

- LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; HELOW, E. R. **Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies**. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3464-3469, 2007.
- LUN, O. K.; WAI, T. B.; LING, L. S. Pineapple cannery waste as a potential substrate for microbial transformation to produce vanillic acid and vanillin. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 953-958, 2014.
- MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; SILVA, W. S.; MARANHÃO, C. M. C.; SOUZA, K. A. **Características sensoriais e físico-químicas de geleias mistas de manga e acerola**. *B. Ceppa*, v. 27, n. 2, p. 247-256, 2009.
- MALAGONI, R. A. **Cristalização de ácido cítrico em leite vibrado**. 2010. 297p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2010.
- MARCELLINI, P. S.; CORDEIRO, C. E.; FARAONI, A. S.; BATISTA, R.A.; RAMOS, A. L. D.; LIMA, A. S. **Comparação físico-química e sensorial da atemoia com a pinha e a graviola produzidas e comercializadas no Estado de Sergipe**. *Alim. Nutr.*, v.14. p. 187-189, 2003.
- MELO, A. L. A.; SILVA, A. L. L.; COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; MIYAOKA, M. F.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. **Selection of *Bacillus thuringiensis* Berliner strains to control *Aedes aegypti* Linnaeus**. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 4, n. 1, p. 78-83, 2013. *Comunicata Scientiae*, v. 4, n.1, p. 91-95, 2013.
- MELO, A. P. C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V. R. S. Caracterização física e química de frutos de araçá. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 91-95, 2013.
- MORAIS, F. A.; ARAÚJO, F. M. M. C.; MACHADO, A. V.; RICARTE, F. D. N.; SALES JUNIOR, R. Influência da atmosfera sob a vida útil pós-colheita do mamão “formosa”. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 4, p. 01-09, 2010.
- NEVES, M. V. M.; LIMA, V. L. A. G. Avaliação sensorial e caracterização físico-química de néctar de acerola adicionado de extrato comercial de própolis. **Alim. Nutr.**, v. 21, n. 3, p. 399-405, 2010.
- OLIVEIRA, T. A.; LEITE, R. H. L.; AROUCHA, E. M. M.; FREITAS, T. G. G.; SANTOS, F. K. G. Avaliação da qualidade físico-química de polpa de frutas congeladas na cidade de Mossoró-RN. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 248-255, 2014.
- OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; FERRAZ, C. A. A.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, J. R. G. S. Utilização de flavonoides no setor industrial farmacêutico: um estudo de prospecção tecnológica. **Revista Geintec**, v. 4, n. 2, p. 859-866, 2014.
- OSAKI, F. Distribuição espacial de microrganismos e fertilidade em solos de dois ecossistemas florestais: floresta ombrófila mista e povoamento florestal com *Pinustaeda* L. em Tijucas do Sul-PR. 281p. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.
- PASTORE, N. S. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como**

substrato. 2010. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Toledo, 2010.

PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A. **Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose**. *Engevista*, v. 13, n. 3, p. 149-159, 2011.

PAUL, G. C.; PRIEDE, M. A.; THOMAS, C. R. **Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 121-129, 1999.

PEREIRA, C. T. M.; SILVA, C. R. P.; LIMA, A.; PEREIRA, D. M.; COSTA, C. N.; CAVALCANTE NETO A. A.. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Acta Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 50-56, 2013.

PERRONE, G.; STEA, G.; KULATHUNGAC. N.; WIJEDASA, H.; ARSECULERATNE, S. N. *Aspergillus fijiensis* n. sp. Isolated from bronchial washings in a human case of bronchiectasis with invasive aspergillosis: the first report. **Microbiology Discovery**. DOI: 10.7243/2052-6180-1-9, 2013.

Resíduos Agroindustriais: caracterização e utilização. Disponível em: <http://www.gconci.com.br/site/default.aspx?pagina=noticias_detalhe&codigo_pagina=100>. Acesso em: 01 de ago. 2013.

ROCHA, S. A.; LIMA, G. P. P.; LOPES, A. M.; BORGUINI, M. G.; CICCONE, V. R.; BELUTA, I. **Fibras e lipídios em alimentos vegetais oriundos do cultivo orgânico e convencional**. *Revista Simbio-Logias*, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2008.

RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; THOMAS, W. W. **Do the seasonal forests in northeastern Brazil represent a single floristic unit?** *Braz. J. Biol.*, v. 68, n. 3, p. 467-475, 2008.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; STURM, W.; DERGINT, D. E. A.; SPIER, M. R.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. **Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus* sp. Mutant in SSF**. *World J. Microbiology Biotechnology*, n. 29, p. 2317-2324, 2013. DOI 10.1007/s11274-013-1397-y.

RODRIGUES, J. F. M. Hipoglicémia – da bioquímica à clínica. 2014. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2014.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. **Eur. J. Pathol.**, v. 137, p. 197-209, 2013. DOI: 10.1007/s10658-013-0233-4.

SALAMONI, S. P.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. **Estudo de produção de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp.** 1S. *Evidência*, v. 12, n. 12, p. 175-186, 2012.

SANT'ANNA, M. C. S.; LOPES, D. F. C.; CARVALHO, J. B. R.; SILVA, G. F. **Caracterização de briquetes obtidos com resíduos da agroindústria**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 14, n. 3, p. 289-294, 2012.

SAYERS, E. W., et al. **Database resources of the National Center for Biotechnology Information**. Nucleic Acids Research, v. 39, p. 38-51, 2011. DOI:10.1093/nar/gkq1172.

SERAFIM, F. A. T.; BUCHVISER, S. F.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. **Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna**. Química Nova, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.

SILVA, A.R.Z. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de fitase por Aspergillus niger em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos**. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S.A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; MIRANDA, R. C. M.; NARAIN, N. **Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para a produção de ácido cítrico por Kluyveromyces marxianus URM 4404**. Scientia Plena. v. 8, n. 5, p. 1-6, 2012.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil**. Biochemical Engineering Journal, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. **New perspectives for citric acid production and application**. Food Technology, v.44, p. 141-149, 2006.

SOUTO, P. C. **Acumulação e decomposição da serapilheira e distribuição de organismos edáficos em áreas de Caatinga na Paraíba, Brasil**. 163p. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, 2006.

STORCK, C. R.; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, B. B.; BASSO, C. **Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações**. Ciência Rural, v. 43, n. 3, p. 537-543, 2013.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP. **Citros colorem Sudeste brasileiro de verde e laranja**. Visão Agrícola, v. 1, n. 2, p. 90-99, 2004.

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* SP ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Artigo submetido à Revista Exacta

ISSN: 1984-3151



ISSN: 1984-3151

SELECTION OF SAMPLES ISOLATED *ASPERGILLUS* SP ISOLATED FROM CAATINGA IN PERNAMBUCO AND PRODUCTION CITRIC ACID FROM SUBMERGED FERMENTATION

Márcia Caetano de Sá Muniz¹; Brindize Ferreira de Lima²; Galba Maria de Campos Takaki³;
Carlos Alberto Alves da Silva⁴

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco marciamuniz8@yahoo.com.br
- 2 Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco brindizeflima@hotmail.com
- 3 Doutora em Microbiologia Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. takaki@unicap.br
- 4 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. calves@unicap.br

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

RESUMO: O isolamento de novas espécies microbianas, principalmente em regiões ainda pouco exploradas, como a Caatinga nordestina, tem direcionado novos estudos para a identificação de novas espécies e gêneros microbianos, realização de ensaios biotecnológicos voltados para produção de metabólitos de alto valor agregado. O ácido cítrico (AC) é um ácido orgânico comum de quase todos os seres vivos, presente naturalmente em frutas cítricas e apresenta vasta aplicabilidade comercial. Sua produção via micro-organismos é realizada por espécies capazes de converter carboidratos em ácido cítrico, cuja produção é fortemente influenciada pela natureza dos substratos presentes nos meios de fermentação, pois alguns micronutrientes são de extrema importância para a fixação biológica, transformando-se em co-fatores na incorporação de nitrogênio, e ocasionando uma melhor produção de AC. O gênero *Aspergillus* tem se destacado como um bom produtor de AC e de outros metabólitos e interesse biotecnológico. Foram realizados estudos de seleção de três amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga do Estado de Pernambuco, denominadas de SIS 09, 10 e 16 para produção de AC em meio sólido e produção de AC através de fermentação submersa com a melhor amostra selecionada. Foram testados três meios com diferentes composições. Os experimentos foram realizados em shaker orbital a 28°C, 150 rpm, durante 144 horas. Foram coletadas amostras a cada 24 horas para determinações da presença de AC, pH e açúcares redutores totais. Os resultados obtidos evidenciaram que nos ensaios de seleção de produção de AC em meio sólido, a amostra SIS 09 apresentou a formação do maior halo característico, 3,0 cm, respectivamente. Já na produção através de fermentação submersa, o meio denominado M₁, que apresentou uma produção de AC de 3,05g/L, pH final de 5,0, A seleção de novos microrganismos produtores de moléculas potencialmente ativas,

geram a realização de novos estudos biotecnológicos para melhorarem as condições de produção dos bioprodutos desejados.

PALAVRAS-CHAVE: seleção de meios, *Aspergillus*, ácido cítrico.

ABSTRACT: The isolation of new microbial species, especially in regions not yet explored, such as the northeastern Caatinga, has directed new studies for the identification of new microbial species and genera, conducting assays involving biotechnological production of metabolites with high added value. Citric acid (CA) is a common organic acid in almost all living beings, naturally present in citrus fruits and has extensive commercial applicability. Production via micro-organisms is performed by able to convert carbohydrates into citric acid species, whose production is strongly influenced by the nature of the substrates in fermentation media, as some micronutrients are of extreme importance for the biological fixation, becoming cofactors in the nitrogen incorporation, and resulting improved production of CA. The *Aspergillus* genus has emerged as a good producer of AC and other metabolites of biotechnological interest. Studies of selection of three samples isolated from *Aspergillus* sp from Caatinga region of Pernambuco, denominated SIS 09, 10 and 16 for production of AC on solid medium and production of AC through submerged fermentation. The best sample was selected fermentation were performed. Three media with different compositions were tested. The experiments were performed on an orbital shaker at 28 °C, 150 rpm for 144 hours. Samples were collected every 24 hours for determination of the presence of AC, pH and total reducing sugars. The results showed that for tests of selection of CA production on solid medium, the SIS 09 sample showed the formation of higher characteristic halo, 3.0 cm, respectively. Already in production by submerged fermentation, the medium denominated M1, which had a production of CA 3.05g/L, final pH of 5.0. The selection of new microorganisms producing potentially active molecules produced new studies biotechnology to improve the conditions of production of desired bioproducts.

KEYWORDS: media selection, *Aspergillus*, citric acid

1 INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana é considerada extensa, embora seja desconhecida em sua plenitude. A diversidade de espécies está associada ao seu número (opulência de espécies) e à distribuição do número de indivíduos entre as espécies, ou seja, a equitabilidade, (ZILLI *et al.*; 2003; DIONISI, LOZADA, OLIVEIRA, 2012; VALENCIA, CHAMBERGO, 2013).

A utilização biotecnológica de micro-organismos isolados de ambientes diversos, principalmente aqueles em que se tenham sido pouco estudados, tem sido alvo de inúmeras pesquisas biotecnológicas sobre a diversidade microbiana, no sentido de isolar, caracterizar e produzir substâncias com elevado potencial biotecnológico, aumentando assim os benefícios econômicos e estratégicos relacionados com a descoberta de novos micro-organismos potencialmente exploráveis nos diferentes processos biotecnológicos (STEVEN *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; NELSON, WEAR, 2014).

A Caatinga é um ecossistema do sertão nordestino que se situa na maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. Estende-se por cerca de 735.000 Km², sendo limitada a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado. Apresenta um clima semi-árido, quente e com baixos índices pluviométricos, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas durante quase todo o ano (SILVA *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2005; PINHEIRO, COSTA, ARAÚJO, 2013; COSTA *et al.*; 2014).

O ácido cítrico (AC), ou citrato de hidrogênio (C₆H₈O₇.H₂O), é um ácido tricarboxílico orgânico fraco amplamente utilizado na indústria alimentícia como conservante natural, acidulante, antioxidante e estabilizador. Após processos de purificação, é incolor e solúvel em água, apresenta peso molecular de 210,14 g/mol, sendo um metabólito comum de plantas e animais e está presente em diversos sucos de

frutas, frutas cítricas e abacaxi (SOCCOL *et al.*, 2006; ANGUMEENAL, VENKAPPAYYA, 2013; ESWARAPPA, FOX, 2013).

O AC é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo (GREWAL, KALRA, 1995; BEROVIC, LEGISA, 2007; MAX *et al.*, 2010; DHILLON *et al.*, 2011; ALI, HAQ, 2014), principalmente através da fermentação submersa, utilizando meios de produção a base de sacarose ou amido, e também utilizando resíduos agroindustriais (PAUL *et al.*, 1999; DHILLON *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2013; AMENAGHAWON *et al.*, 2013; AMENAGHAWON, OSAZUWA, OKIEIMEN, 2014; ALONSO, RENDUELES, DÍAZ, 2014).

O gênero *Aspergillus* tem se destacado como um dos melhores produtores de diversos metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental (YIGITOGU, 1992; DEMAÏN, 1999; SCHUSTER *et al.*, 2002; NIELSEN *et al.*, 2009; MAJUMDER *et al.*, 2010; BRAKHAGE, SCHROECKH, 2011; FRISVADI *et al.*, 2011; ALJUBOORI *et al.* 2013; PASIN *et al.*, 2014), devido a sua elevada taxa de crescimento, e elevada termotolerância, o que tem favorecido a execução de inúmeros estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (DRIOUCH, SOMMER, WITTMANN, 2010; LIMA *et al.*; 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Este trabalho teve como objetivos a seleção de amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco com potencial de produção de ácido cítrico e a seleção de meios de produção de ácido cítrico através de fermentação submersa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas culturas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp isolados da Caatinga de Pernambuco, denominados de SIS 09, 10 e 16,

previamente catalogados no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40 g/L), peptona (10 g/L), ágar (20 g/L), água destilada 1000 mL e pH 7,0. As amostras testadas foram aclimatadas em meios de manutenção contendo 2g/L de ácido cítrico.

2.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE ÁCIDO CÍTRICO EM MEIO SÓLIDO

A seleção foi realizada através da metodologia descrita por FOSTER, 1949. O meio utilizado apresentava a seguinte composição: 5g/L de glicose; 1g/L de peptona; 1g/L de KH_2PO_4 ; 0,5g/L de MgSO_4 ; 15g/L de Ágar e 65mL/L de solução de Verde de Bromocresol (0,5g Verde de Bromocresol em 7mL de NaOH 0,1 N). O pH foi ajustado para 4,5. As placas foram incubadas durante 96 horas, 28 °C com acompanhamento diário. O aparecimento de um halo amarelo brilhante evidenciava a produção de ácido cítrico no meio testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2 SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Após a seleção da melhor amostra produtora de ácido cítrico, foram selecionados e testados meios de produção de AC através de fermentação submersa.

Meio 1 (M₁)- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,23g/L; KH_2PO_4 , 1,0g/L; NH_4NO_3 , 1,0g/L; sacarose, 50g/L; uréia, 2,5g/L; peptona, 2,5g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5g/L;

Meio 2 (M₂)- KH_2PO_4 , 5,0g/L; citrato trissódico, 5,0g/L; NH_4NO_3 , 2,0g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,0g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g/L; peptona, 1,0g/L; glicose, 0,2g/L; extrato de levedura, 2,0g/L;

Meio 3 (M₃)- NaNO_3 , 6,0g/L; KH_2PO_4 , 1,5g/L; KCl , 0,5g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g/L; FeSO_4 , 0,01g/L; ZnSO_4 ,

0,01g/L; glicose, 10g/L; peptona, 2,0g/L; extrato de levedura, 2,0g/L; tiamina, 0,3g.

2.3. DETERMINAÇÃO DO PH

Todas as amostras coletadas foram submetidas a leituras no potenciômetro para leitura do pH.

2.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO (AC)

Para a determinação do ácido cítrico produzido através de fermentação submersa, utilizou-se a metodologia de Saffran e Denstedt (1948), onde a quantidade de ácido cítrico é identificada através da formação de uma cor amarela, na reação entre o ácido tricloroacético (TCA) com piridina e o anidrido acético.

A reação é realizada colocando-se 1,0mL das amostras coletadas ao longo do processo fermentativo, em um recipiente contendo 8,0mL de anidrido acético. Em seguida, leva-se o frasco para o banho-maria durante 10 minutos, até o aquecimento da mistura. Após o aquecimento, acrescenta-se 1,0 mL de piridina em cada tubo, agita-se e retorna-se ao banho-maria por mais 40 minutos.

Durante esse período as amostras assumem uma coloração que pode variar do amarelo ao marrom escuro, dependendo da concentração de ácido cítrico presente em cada amostra. Retiram-se as amostras do banho-maria para um banho de gelo durante 5 minutos. A leitura das amostras é feita em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 400 nm.

Para o branco, foi utilizado 1,0mL de TCA (15%), e adicionado 8,0mL de anidrido acético, seguido de banho-maria por 10 minutos à 60°C. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de piridina, tendo o material retornado ao banho-maria por mais 40 minutos, seguido de banho de gelo durante 5 minutos.

A curva padrão foi construída utilizando-se 1 mL de solução de ácido cítrico (4g de ácido cítrico em 100mL de TCA a 15%). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 400 nm.

2.5. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

Os açúcares redutores totais foram determinados através da metodologia de Miller (1959), que utiliza o DNS (ácido dinitro-salicílico) que oxida o grupo carbonila presente na solução.

Foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras coletadas no processo de fermentação, e colocadas em frascos contendo 0,5 mL da solução do reagente DNS. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho-maria durante 5 minutos, em temperatura de ebulição.

Após resfriamento em água corrente, foi adicionado 5 mL de água destilada em cada amostra. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

A absorbância obtida foi correlacionada em concentração de açúcar redutor (AR) utilizando uma curva padrão de glicose.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grewal, Kalra (1995); Vanderberghe *et al.*, (1999); Angumeenal, Venkappayya, (2013), Thevenieau, Nicaud (2013) descreveram que ao longo das últimas décadas, um elevado número de microrganismos isolados de ambientes diversos têm sido testados para avaliação do potencial biotecnológico para produção de ácido cítrico, incluindo principalmente fungos filamentosos, leveduras e bactérias. No entanto, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, principalmente da espécie *niger*, têm sido usados para produção comercial de AC. As principais vantagens da utilização desses organismos são: (i) a sua facilidade de manuseio; (ii) a sua capacidade para fermentar a uma ampla variedade de matérias-primas baratas

utilizadas na formulação dos meios de produção e (iii) elevados rendimentos alcançados.

Foram realizados ensaios de detecção da produção de ácido cítrico em meio sólido, através da metodologia descrita por Foster, 1949. Três amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga do Estado de Pernambuco, denominadas de SIS 09, 10 e 16. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de Ácido Cítrico em meio sólido por isolados *Aspergillus* sp durante 96 horas de crescimento.

Amostras	24h (cm)	48h (cm)	72h (cm)	96h (cm)
SIS 09	1,5	3,0	4,0	6,0
SIS 10	1,0	2,0	2,5	3,0
SIS 16	2,0	2,0	2,5	2,5

Os resultados obtidos indicaram que todos os microrganismos testados apresentaram a habilidade em produzir o AC, porém a amostra denominada de SIS 09 apresentou o maior halo característico formado, após 96 horas, que foi de 6,0 cm.

As demais amostras testadas (SIS 10 e SIS 16), também produziram AC em todo período do ensaio, apresentando a formação de halos característicos de 3,0 e 2,5 cm, respectivamente.

Rodrigues (2006) descreve que cada amostra de microrganismo do mesmo gênero, isolada em ambientes diversos, pode apresentar particularidades quanto ao tempo de produção, quantidade de AC produzido e adaptação ao meio utilizado.

A produção do AC é realizada através de processos fermentativos, sendo essa a maneira mais econômica de obtenção desse ácido orgânico, pois mais de 90%

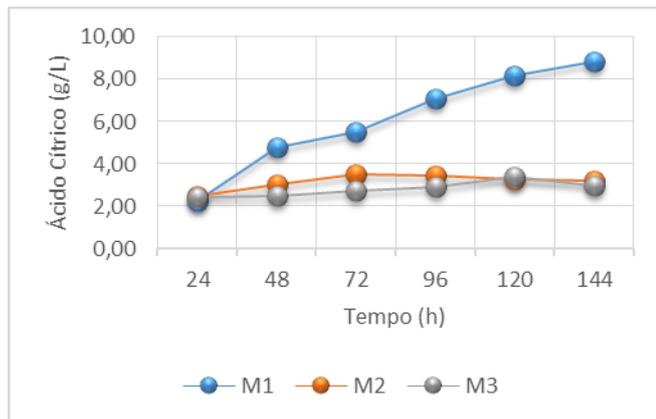
da produção mundial de AC é obtida por fermentação (KOLICHESKI, SOCCOL, 1995; DASHEN *et al.*, 2013).

Os processos fermentativos utilizados para produção do AC industrial podem ser realizados de três maneiras diferentes: através fermentação submersa (o mais utilizado), fermentação de superfície e por fermentação em estado sólido (PAUL, PRIEDE, THOMAS, 1999; KUMAR *et al.*, 2003; DHILLON *et al.*, 2013).

Para que a obtenção do ácido cítrico seja considerada viável comercialmente, vários fatores devem ser levados em consideração durante a elaboração das condições operacionais do processo fermentativo, como os constituintes do meio de produção, o pH, a aeração, a temperatura e a seleção do microrganismo produtor (KOLICHESKI, 1995; PASTORE, HASAN, ZEMPULSKI, 2011; LÓPEZ-GARZÓN, STRAATHOF, 2014).

Foram realizados ensaios de produção de AC com a amostra selecionada SIS 09 em três diferentes meios de produção. Verifica-se que o meio denominado de M₁ apresentou o melhor resultado em termos de produção de ácido cítrico, durante 144h de fermentação, apresentando um valor de produção de 8,85 g/L. A mesma amostra testada no meio M₂ obteve 3,19 g/L durante 144h de fermentação enquanto que o M₃, obteve uma produção de 2,99 g/L à 144h de fermentação (Figura 1).

Figura 1 . produção de ácido cítrico em diferentes meios no intervalo de 144 horas.



A formulação de meios de produção de AC por fermentação submersa envolvem uma série de fatores que podem influenciar diretamente na produção. Angumeenal, Venkappayya (2013) descrevem que a composição dos substratos utilizados no meio de produção de AC está relacionada diretamente com a quantidade e a qualidade da fonte de carbono selecionada.

Vandenberghe *et al.*, (1999), Dhillon *et al.*, (2010) Angumeenal, Venkappayya (2013) descreveram a necessidade da utilização de fontes de carbono, devido a rápida assimilação dos fungos filamentosos, principalmente o gênero *Aspergillus* pelas variadas fontes de carbono usualmente utilizadas nas composições dos meios de produção, como a glicose, frutose, sacarose, geram um elevado rendimento final na produção do AC.

Estudos realizados por Xu *et al.*, 1989 com uma amostra denominada B60 de *A. niger* utilizando dois dissacarídeos na composição do meio de produção, a maltose e a sacarose, demonstraram serem as melhores fontes de carbono para produção do AC, quando comparadas a glicose e a frutose. Alguns açúcares monossacarídeos, como galactose e arabinose, são relatados pela literatura, como inibidores da produção de AC (Hossain *et al.*, 1985; Maddox *et al.*, 1985).

Outra característica importante a ser avaliada na produção de AC é a concentração da fonte de carbono a ser utilizada na composição do meio de produção. Shu, Johnson (1948) demonstraram que a taxa de produção do AC máxima é obtida com uma concentração de açúcares na faixa de 14 a 22%. Estudos realizados por Anderson *et al.*, (1980), descrevem que a utilização de soluções contendo açúcares com 2, 6 e 10% dão rendimentos baixos de produção de AC, quando comparados a soluções com concentrações de 14, 18 e 20 %. Xu *et al.*, (1989) indicaram através dos resultados obtidos nos experimentos realizados, que a concentração ótima de sacarose utilizada fica em torno de 10-14%.

Pastore *et al.*, (2011) descrevem a necessidade da utilização de fontes de nitrogênio na composição do meio de produção de AC, pois dependendo da espécie do fungo, o nitrogênio pode ser obtido nas formas de nitrato, nitrito, amônia ou nitrogênio orgânico. Soccol *et al.*, (2006) citam que na fermentação cítrica submersa requer também uma concentração de fonte de nitrogênio na faixa de 0,1 a 0,4 g/L, pois uma elevada quantidade de nitrogênio na composição do meio, propicia o crescimento fúngico e o consumo do substrato, diminuindo o acúmulo do AC.

Em relação ao estudo de pH na produção de AC utilizando os três diferentes meios, os resultados demonstraram que os valores obtidos dos pH finais, apresentaram um aumento significativo quando comparados aos valores iniciais (Tabela 2).

Em todos os experimentos realizados, os valores de pH dos meios de produção do AC foram iniciados com valores na faixa de 4,0. Essas condições de acidez no pH são devido os fungos filamentosos geralmente realizarem uma boa produção de AC quando se encontram sob condições de estresse, ou seja pH ácido no início do processo fermentativo. Verifica-se

que nas primeiras 24 horas, não houve uma variação significativa dos valores, tendo apenas o Meio 2 aumentado para 4,5, os demais meios (M1 e M3) permaneceram constantes.

Tabela 2. Variação do pH na produção de AC em diferentes meios testados nos intervalo de 144 horas

	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Meio 1	4,0	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0
Meio 2	4,0	4,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Meio 3	4,0	4,0	4,5	5,5	6,0	6,0	6,0

Durante quase todo processo de produção do AC, o Meio 1 (M₁) permaneceu com o valor de 4,5, tendo aumentado para 5,0 ao término do processo, ou seja, após 144 horas de produção. Os demais meios testados (M₂ e M₃), após 144 horas apresentaram valores de pH de 6,0, respectivamente.

Pastore *et al.*, (2011) descrevem que as mudanças de pH ao longo do processo de produção, dependem principalmente do microrganismo utilizado e dos substratos utilizados para composição dos meios de produção, bem como a utilização de sais de amônio ou uréia para amenizarem a variação brusca de pH durante as várias etapas do processo fermentativo.

Não existe um consenso na literatura com relação sobre um pH inicial para o AC, ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos filamentosos esteja numa faixa que varia entre 5, 6 e 7, pois a maioria dos fungos tolera uma ampla variação entre 1,5 e 11, porém o pH ótimo deve estar entre valores de 4 e 6 (DEL BIANCHI *et al.*, 2001;)

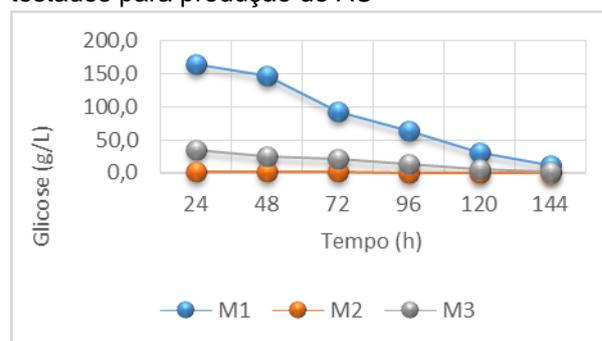
Rodrigues (2006) descreveu que o ideal é iniciar uma fermentação submersa para produção de AC com um pH um pouco elevado, entre 5,0 e 6,0, para permitir um bom crescimento dos esporos fúngicos, e durante

o processo fermentativo, a produção de ácidos irá contribuir para a redução gradativa do pH.

Pastore *et al.*, (2011) relataram que a utilização de valores de pH baixos apresentam como vantagem, a inibição da produção de alguns ácidos considerados indesejáveis, como o oxálico e o glucônico.

O consumo dos açúcares redutores totais foi acompanhado nas diferentes composições de meios testados para produção de AC (Figura 2). Verifica-se que o consumo da glicose ao longo da fermentação ocorreu de forma regular, porém a amostra SIS 09 conseguiu produzir um maior acúmulo de AC no meio M1, devido à concentração de sacarose introduzida na composição original do meio.

Figura 2. Consumo de glicose em diferentes meios testados para produção de AC



Os resultados obtidos indicaram que as concentrações iniciais de açúcares nas primeiras 24 horas de produção de AC nos Meios M₁, M₂ e M₃ foram de 166, 0,7 e 35 g/L, respectivamente. Ao término do processo, após 144 horas, foram obtidos valores de 12, 0,5 e 0,7 g/L, respectivamente.

Pastore *et al* (2011), descreveram que o AC pode ser acumulado de duas maneiras: ou quando vários nutrientes estão presentes em altas concentrações (açúcar, acidez, oxigênio) ou quando estão em níveis abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato).

Penna (2001) relatou que os diferentes tipos de açúcares introduzidos na composição dos meios de produção, são assimilados de forma rápida pelos

fungos como fonte de carbono nos processos fermentativos, onde a concentração e tipo de fonte de carbono utilizada são relevantes fatores respostas relacionados ao acúmulo ou não de AC. A baixa concentração de açúcar nos meios de produção, podem comprometer diretamente à formação de AC, facilitando assim o acúmulo de outros ácidos orgânicos, como o oxálico.

Roehr, Kubicek, Kominek (1996) afirmaram que a principal fonte de carbono empregada na formulação de meios de produção de AC deve ser a sacarose, seja na forma pura ou na forma de melaços de cana-de-açúcar ou beterraba.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pouca quantidade de informações referentes ao potencial biotecnológico dos microrganismos habitantes de regiões como a Caatinga do Nordeste brasileiro, têm gerado novos estudos referentes ao isolamento e a avaliação do potencial biotecnológico desses organismos, onde na maioria das vezes novas

espécies de microrganismos são identificadas através de estudos taxonômicos.

O AC é um composto orgânico que apresenta inúmeras aplicações tecnológicas, sendo aplicado em diversos processos industriais, e produzido na maioria das vezes, através de fermentação submersa. A habilidade da amostra SIS 09 (*Aspergillus* sp), isolada da Caatinga de Pernambuco, foi evidenciada através de estudos envolvendo a seleção e a produção de AC em diferentes meios de produção, evidenciando assim uma potencial biotecnológico desse bioproduto de alto valor agregado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA – CNPq e à FACEPE, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

REFERÊNCIAS

- ALJUBOORI, A.H.R.; IDRIS, A.; ABDULLAH, N.; MOHAMAD, R. Production and characterization of a bioflocculant produced by *Aspergillus flavus*. **Bioresource Technology**, v.127, p.489-493, 2013.
- ALI, S.; HAQ, I.U. Process Optimization of citric acid production from *Aspergillus niger* using fuzzy logic design. **Pak. J. Bot**, v. 46, n. 3, p.1055-1059, 2014.
- ALONSO, S., RENDUELES, M., DÍAZ, M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1-17, 2014.
- AMENAGHAWON, N.A.; NWARU, K.I.; AISIEN, F.A.; OGBEIDE, S.E.; OKIEIMEN, C.O. Application of Box-Behnken Design for the optimization of citric acid production from corn starch using *Aspergillus niger*. **British Biotechnology Journal**, n.3, v.3, p.236-245, 2013.
- AMENAGHAWON, N.A.; OSAZUWA, O.U.; OKIEIMEN, C.O. Dynamic modeling and simulation of citric acid production from dilute acid hydrolysed corn starch using *Aspergillus niger*. **Nigerian Journal of Technology**, v.33, n.2, p.222-229, 2014.
- ANGUMEENAL, A.R., VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **Food Science and Technology**, v.50, p.367-370, 2013.
- BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites- Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v.48, n.1, p.15-22, 2011.
- BEROVIC, M.; LEGISA, M.. Citric acid production. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, p. 303-343, 2007.
- COSTA, P.A.; MOTA, J.C.A.; ROMERO, R.E.; FREIRE, A.G.; FERREIRA, T.O. Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast

- Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 137, p. 23–32, 2014.
- DASHEN, M.M., ADO, S.A., AMEH, J., AMAPU, T., ZAKARI, H. Screening and improvement of local isolates of *Aspergillus niger* for citric acid production. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, n.6, n.1, p.105-111, 2013.
- DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, n.4, p.455-463, 1999.
- DEL BIANCHI, V. L. et al. Fermentação em estado sólido. **SCHMIDELL, W. et al.(Coords). Biotecnologia industrial**, v. 2, 2001.
- DHILLON, G.S.; BRAR, S.K.; KAUR, S.; VERMA, M. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1560-1567, 2013.
- DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, R.D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v.54, p.83-92, 2011.
- DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. **Food Bioprocess Technol.** v.4, n.4, p.505-529, 2011.
- DIONISI, H.M.; LOZADA, M.; OLIVEIRA, N.L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina de Microbiología**, v.44, p. 49-60, 2012.
- DRIOUCH, H.; SOMMER, B.; WITTMANN, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.105, n.6, p.1058-1068, 2010.
- ESWARAPPA, S.M., FOX, P.L. Citric acid cycle and the origin of MARS. **Trends Biochem. Sci.** v.38, n.5, p. 222-228, 2013.
- FOSTER, J. W. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York, 1949.
- FRISVADI, J.C.; LARSEN, T.O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. Fumonisin and Ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23496, 2011
- GREWAL, H.S., KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v.13, n.2, p. 209-234, 1995.
- HOSSAIN, M.; BROOKS, J.D.; MODDAX, I.S. Galactose inhibition of citric production from glucose by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 98-102, 1985.
- KOLICHESKI, M.B., SOCCOL, C.R. Otimização do meio e condições de cultura na produção de ácido cítrico por fermentação submersa. **B. Ceppa**, v.13, n.2, 109-118, 1995.
- KUMAR, D., JAIN, V.K., SHANKER, G., SRIVASTAVA, A. Utilisation of fruits wastes for citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, p.1725-1729, 2003.
- LARBA, R., BOUKERCHE, I., ALANE, N., HABBACHE, N., DJERAD, S., TIFOUTI, L. Citric acid as an alternative lixiviant for zinc oxide dissolution. **Hydrometallurgy**, v.134-135, p.117-123, 2013.
- LEAL, I.R.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; LACHER JR, T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.
- LIMA, B.F.; AMORIM, H.S.; NASCIMENTO, A.E.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; ALVES DA SILVA, C.A. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco. **Revista e-xacta**, v.7, n.1, p.147-157, 2014.
- LÓPEZ-GARZÓN, C.S.; STRAATHOF, A.J.J. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. **Biotechnology Advances**, v.32, p.873-904, 2014.
- MADDOX, I. S.; SPENCER, K.; GREENWOOD, J. M.; DAWSON, M. W.; BROOKS, J. D. Production of citric acid from sugar present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 815-818, 1985.
- MAJUMDER, L., KHALIL, I., MUNSHI, M.K., ALAM, K., RASHID, H.O., BEGUM, R., ALAM, N. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. **European Journal of Biological Sciences**, n.2, v.1, p. 1-8, 2010.
- MAX, B.; SALGADO, J.M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of citric acid, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.862-875, 2010.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.
- NASCIMENTO, K.B.M.; MARTINS, A.G.R.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; ALVES DA SILVA, C.A.; OKADA, K.

Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil. **Revista e-xacta**, v.7, n.1, p.95-103, 2014.

NELSON, C.E.; WEAR, E. K. Microbial diversity and the ability of dissolved organic carbon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. 7166 - 7167, 2014.

NIELSEN, K.F.; MOGENSEN, J.M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, n.5, p.1225-1242, 2009.

PANDEY, P., PUTATUNDA, S., DEWANGAN, L., PAWAR, V.S., BELORKAR, S.A. Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* in batch fermentation. **Recent Research in Science and Technology**, v.5, n.2, p. 66-67, 2013.

PASIN, T.M.; BENASSI, V.M.; MOREIRA, E.A.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions. **British Biotechnology Journal**, v.4, n.4, p. 482-498, 2014.

PASTORE, N.S., HASAN, S.M., ZEMPULSKI, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* : avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engvista**, v.13, n.3, p.149-159, 2011.

PAUL, G.C., PRIEDE, M.A., THOMAS, C.R. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, n.3, p.212-129, 1999.

PENNA, T.C.V. **Produção de ácidos**. In: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W.,Schidell, W. *Biotechnology Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v.3, p. 45-50.

PINHEIRO, E.A.R.; COSTA, C.A.G.; ARAÚJO, J.C. Effective root depth of the caatinga biome. **Journal of Arid Environments**, v.89, p. 1-4, 2013.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

ROEHR, M.; KUBICEK, C.P.; KOMINEK, J. Citric acid. **Biotechnology Set**, second edition, p.307-345, 1996.

SAFFRAN, M.; DENSTEDT, O.F. A rapid method for the determination of citric acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.175, p.849-855, 1948.

SANTOS, T.M.C., SANTOS, M.A.L., SANTOS, C.G., SANTOS, V.R., PACHECO, D.S. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. **Revista Caatinga**, v.22, n.1, p.155-160, 2009.

SAUER, M., PORRO, D., MATTANOVICH, D., BRANDUARDI, P. Microbial production of organics acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.2, p.100-108, 2007.

SHU, P.; JOHNSON, M. J. The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 56, n. 5, p. 577, 1948.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.59, p.426-435, 2002.

SILVA, G.K.C., RAMALHO, S.A., GUALBERTO, N.C., GOMES, E.B., MIRANDA, R.C.M., NARAIN,N. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria – prima para produção de ácido cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**, v.8, n.5, p.1-6, 2012.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S., RODRIGUES, C., PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application, **Food Technol. Biotechnol.**, v44, n.2, p.141-149, 2006.

STEVEN, B., LÉVEILLÉ, R., POLLARD, W.H., WHYTE, L.G. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. **Extremophiles**, v.10, n.4, p. 259-267, 2006.

THEVENIEAU, F; NICAUD, J.M. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds & Fats Crops and Lipids**, v. 20, n. 6, p. D603, 2013.

VALENCIA, E.Y., CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p.9-18, 2013.

VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., LEBEAULT, J.M. Microbial production of citric acid. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.42, n.3, p. 1-14, 1999.

XU, D.P.; MADRID, C.P.; ROHR, M.; KUBCEK, C.P. The influence of type and concentration of carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.30, p.553-558, 1989.

YIGITOGU, M. Production of citric acid by fungi.
Journal of Islamic Academy of Sciences, v.5, n.2,
p.100-106, 1992.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido à Revista Engevista

ISSN: 1415-7314 e-ISSN: 2317-6717

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FONTES DE CARBONO E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *ASPERGILLUS* sp (SIS09) ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL

Márcia Caetano de Sá Muniz¹,

Marcos Antônio Cavalcanti Luna²;

Grayce Kelli Barbosa da Silva²;

Marcelly Figueiredo Alves³;

Carlos Alberto Alves da Silva⁴

1 – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2 – Doutorado em Ciências Biológicas; 3 – Iniciação Científica; 4 – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) – Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) – R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, Pernambuco, 50050-900.

Resumo

O mercado industrial de polpa de frutas gera toneladas de resíduos que apresentam potencial altamente nutritivo, sendo considerados como fontes de carbono. Entretanto, a grande maioria desses resíduos são descartados de forma aleatória, sem descarte adequado, provocando danos ambientais irreparáveis. Muitos desses resíduos, quando reaproveitados, podem vir a se tornar matéria-prima para a produção de muitos bioprodutos da indústria, como os ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos são aqueles obtidos através do metabolismo dos seres vivos, tanto por vegetais quanto por micro-organismos, como resultado da excreção celular, dentre os quais destaca-se o ácido cítrico. O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um reduzido número de experimentos. Estudos foram realizados para se avaliar a produção de ácido cítrico por *Aspergillus* sp (SIS09) isolado de solos da Caatinga de Pernambuco. Os experimentos foram realizados em 2 etapas: 1) um planejamento de 2^3 , com 12 ensaios e 4 repetições do ponto central, conforme seleção prévia (*screen*) de meios de produção e de cepas do fungo. As variáveis testadas foram: sacarose, ureia e pH. 2) um planejamento fatorial de 2^2 , com 21 ensaios, substituindo-se a sacarose utilizada na primeira etapa por resíduos de frutas (abacaxi e acerola) em três concentrações diferentes (30g/L; 50g/L; 70g/L) em triplicata, elaborando assim 2 meios alternativos, tendo como meio controle a melhor condição do primeiro experimento. As fermentações submersas de ambas as etapas foram conduzidas em frascos Erlenmeyers e em agitador *shaker* por 120 horas a 150 rpm e 28°C. Em todos os ensaios foi constatada a produção de ácido cítrico. Verificou-se que a associação da sacarose sob concentração de 70g/L com a ureia a 4,5g/L e pH inicial 6,0, no ensaio 8 a 120h de fermentação, foi a condição que apresentou os melhores resultados, com valor de 28,1g/L de ácido cítrico, na etapa 1. Na etapa 2, os resultados alcançados apontaram o meio alternativo

contendo abacaxi à concentração de 50g/L como a melhor condição para a produção, obtendo-se 31,51g/L de ácido cítrico no tempo decorrido de 120h de fermentação.

Palavras-chave: ácido cítrico, acerola, abacaxi, resíduos agroindustriais.

Abstract

The fruit pulp industrial Market generates tons of waste that have highly nutritious potential, considered as sources of carbon. However, the vast majority of these wastes are disposed of without proper disposal procedures, causing irreparable environmental damage. Many of these residues can be used as raw material for the production of many industrial bioproducts, such as organic acids. Organic acids, such as citric acid, are those obtained through both plant and microorganism metabolism as a result of cell excretion. Factorial design is a statistical tool widely used in studies of fermentation process that allows one to simultaneously evaluate the effect of a large number of variables from a small number of experiments. Studies were conducted to evaluate the production of citric acid by *Aspergillus* sp (SIS09) isolated from soil in Caatinga of Pernambuco. The experiments were performed in two steps: 1) a factorial 23 design, with 12 assays and four repetitions of central point, according to a-priori selection (screen) of the media of production and fungal strains. The variables tested were sucrose, urea and pH; 2) a factorial 22 design with 21 assays, replacing the sucrose used in the first step by residues from fruit (pineapple and acerola) at three different concentrations (30g/L, 50g/L, 70g/L) in triplicate thus developing two alternative media to improve the results of the first experiment. The submerged fermentation of both steps were conducted in Erlenmeyer flasks in an rotating shaker for 120 hours at 150 rpm and 28°C. All assays were found to produce citric acid. It was found that the combination of the concentration of 70g/L sucrose, 4,5g/L urea, with initial pH 6,0, assay 8 at 120 hours in fermentation, was the condition that showed the best results with a value of 28,1g/L of citric acid in step 1. In step 2, the results obtained indicated the alternative pineapple medium containing a concentration of 50g/L as the best condition for production, yielding 31,51g/L citric acid at 120h of fermentation.

Keywords: citric acid, acerola, pineapple, agroindustrial residues.

INTRODUÇÃO

Os conceitos relacionados ao meio ambiente e à sustentabilidade fizeram aflorar um particular interesse no reaproveitamento de resíduos de diversas naturezas e fontes (INFANTE et al, 2013; ASHOUR et al, 2014). Os resíduos da agroindústria têm encontrado vasta aplicabilidade na biotecnologia como substrato para os micro-organismos produzirem diversos metabólitos úteis para a indústria de alimentos, bebidas, fármacos, etc. (FERREIRA et al, 2012; ASHOUR et al, 2014). O consumo de sucos e néctares de frutas tem aumentado

nos últimos anos motivado, principalmente, pela maior consciência dos consumidores sobre a importância da escolha de alimentos saudáveis e funcionais, para redução do risco de desenvolver doenças e para a melhoria da qualidade de vida (NEVES, LIMA, 2010; FARAONI et al, 2012; ASSUMPÇÃO et al, 2013).

O elevado número de espécies frutíferas presentes no Brasil classifica-o como um país com grande biodiversidade (ASSUMPÇÃO et al, 2013; CASTRO et al, 2014). O abacaxi e a acerola são frutas cítricas de alta importância econômica na Região Nordeste, devido ao seu alto

potencial nutritivo e por conterem outros componentes fisiologicamente importantes para o ser humano, além de possuírem sabor conhecido e terem vasta aceitabilidade. A acerola é uma fruta rica em vitamina C, antocianinas e carotenoides, além de outros compostos (ASSIS et al, 2002; MACIEL et al, 2009; FARAONI et al, 2012; PEREIRA et al, 2013).

O abacaxi oferece baixo índice de vitamina C em relações a outras frutas, porém contribui de forma significativa na digestão de alimentos e na extração da enzima bromelina (CASTRO et al 2014).

Diversas são as aplicações biotecnológicas dessas frutas: Araújo et al (2013) desenvolveram em seus estudos um catchup de acerola; Faraoni (2012) elaborou um suco misto de acerola, manga e goiaba; Castro et al (2014) elaboraram um néctar misto de abacaxi e seriguela.

O ácido cítrico, ou citrato de hidrogênio, é um ácido carboxílico (2-hidroxi-1,2,3,-propanotricarboxílico), do tipo ácido orgânico fraco, atualmente produzido pela fermentação aeróbica do açúcar, mas também por fontes renováveis. É bastante utilizado na indústria alimentícia (KAMZOLOVA et al, 2011; ÁVILA-NETO et al, 2014; COSTA et al, 2014) cosmética, de fármacos e de bebidas como um antioxidante, acidulante (RODRIGUES et al, 2013). Sua demanda anual alcança os bilhões de toneladas atualmente (LIU et al, 2013). É o principal constituinte das frutas cítricas e um dos mais importantes ácidos produzidos por micro-organismos (MAJUMDER et al, 2010; COSTA et al, 2014), apresenta vasta aplicabilidade comercial, desde preparação de citratos medicinais, sais efervescentes até como produto biodegradável (ANGUMEENAL, VENKAPPAYYA, 2012).

Vários procedimentos fermentativos são utilizados para a produção em larga escala de compostos orgânicos, dentre eles o ácido cítrico, utilizando produtos químicos

e combustíveis de alta energia a partir de fontes renováveis. Além do mais, uma grande diversidade de micro-organismos são explorados para beneficiar a humanidade e são reconhecidos como produtivos e promissores, por apresentarem eficiência e baixo custo ao longo dos processos (JAMAL et al, 2005; MAJUMDER et al, 2010; SILVA et al, 2012; YALCIN, 2012).

A biossíntese do ácido cítrico é confirmada pela ação, principalmente, do *Aspergillus niger* e da *Candida* sp., espécies capazes de converter carboidratos em ácido cítrico, cuja produção é influenciada de maneira significativa pela natureza dos substratos (ANDRADE et al., 2009), como também das condições do processo. Devido às suas características morfológicas, o fungo *Aspergillus niger* encabeça a lista de micro-organismos produtores deste ácido; porém existem outros fungos produtores como: *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Penicilium luteum*, *Aspergillus clavatus*, *Ustilina vulgaris*, entre outros (PASTORE et al., 2011).

Como principal produto intermediário dos carboidratos, este ácido é produzido puramente por ação enzimática, que dependerá da atuação das mesmas que são controladas por alguns co-fatores, tais como íons metálicos que controlam a concentração de elementos traço.

Dentre outros fatores pode-se citar o pH, a temperatura, a composição nutricional do meio, aeração (KAMZOLOVA et al, 2003; PASTORE et al, 2011) e o desempenho fúngico. Com respeito à composição nutricional, é importante levar-se em consideração as fontes de nitrogênio utilizadas. Das várias fontes de nitrogênio conhecidas, os micro-organismos, de modo geral, assimilam melhor a amônia (PASTORE et al, 2011; SÁ, 2011). O sulfato de amônio prolonga o crescimento vegetativo dos fungos, enquanto que o nitrato de amônio o reduz, além de

acumular o ácido oxálico. O KNO_3 e o NaNO_3 são também mais efetivos que o nitrato de amônio para a produção, pois estimula o crescimento de *A. niger* (PASTORE et al, 2011; MALAGONI, 2010). Outro aspecto que contribui para a produção de ácido cítrico é a incorporação de outros componentes, além do nitrogênio, como fósforo, enxofre.

No que diz respeito à concentração de açúcar utilizada, observa-se que a baixas concentrações, o percentual de ácido oxálico formado aumenta e a taxa de produção de ácido cítrico diminui muito. Porém, a altas concentrações, o processo de extração do ácido cítrico torna-se economicamente inviável (MALAGONI, 2010).

Esse estudo teve como objetivo a produção de ácido cítrico a partir de fontes renováveis, como os resíduos da agroindústria de polpa de frutas, por fermentação submersa do *Aspergillus* sp, utilizando como ferramenta o planejamento fatorial.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Micro-organismo

Foi utilizada uma cultura do fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* sp isolada da Caatinga de Pernambuco, denominada de SIS09, previamente catalogada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). Fez-se a inoculação do fungo para manutenção em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: glicose (40 g/L), peptona (10 g/L), ágar (15 g/L), água destilada (1000 mL) e pH 7,0. A cultura foi aclimatada em meio de manutenção contendo 2g/L de ácido cítrico e pH ajustado em 3,0 por um período de 7 dias.

2. Fermentação Submersa e Planejamento Fatorial

A fermentação submersa para o estudo da produção de ácido cítrico em meio sob diferentes concentrações de fontes de carbono ocorreu por meio de um planejamento fatorial de 2^3 com 12 ensaios e 4 repetições do ponto central.

O meio químico utilizado apresenta a seguinte composição:

- NH_4NO_3 , 1g/L; KH_2PO_4 , 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,23g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5g/L; peptona, 2,5g/L.

As variáveis estudadas foram a concentração de sacarose, de ureia e o pH, conforme níveis de fatores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de fatores utilizados no Planejamento Fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	30	50	70
Ureia (g/L)	0,5	2,5	4,5
pH	2	4	6

Os valores obtidos nos experimentos para a produção de ácido cítrico de ambas as fermentações foram analisados com suporte do Software Statistica 7.0 da Stat Soft, onde estimou-se a influência das variáveis sobre a resposta analisada.

Após a seleção do meio com a melhor condição para a produção de ácido cítrico, a cultura SIS09 foi submetida a outra fermentação submersa para avaliação da utilização de resíduos agroindustriais na produção, onde foram utilizados um meio controle e dois meios alternativos. O meio controle apresentou a seguinte composição:

Meio controle: NH_4NO_3 , 1g/L; KH_2PO_4 , 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,23g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

2,5g/L; peptona, 2,5g/L; sacarose, 70g/L; ureia, 4,5g/L; pH = 6,0.

Os meios alternativos foram elaborados utilizando resíduos agroindustriais de frutas cítricas: abacaxi e acerola, ambas adquiridos do mercado local de Olinda-PE. As frutas foram processadas para retirada da polpa, sendo reaproveitados bagaço, cascas e sementes, os quais foram desidratados em estufa por 3 dias a 40°C. Posteriormente, os resíduos foram novamente processados em processador industrial e tamisados até apresentarem-se em partículas de granulação em torno de 4µm de diâmetro.

Os resíduos em pó foram então acondicionados em potes de plástico com tampa e armazenados em local seco e arejado.

Essa fermentação desenvolveu-se por meio de um planejamento fatorial de 2² com 21 ensaios, e a composição dos meios foram os seguintes:

Meio 1: meio controle, substituindo-se a sacarose por resíduos de abacaxi sob três concentrações diferentes: 30g/L, 50g/L, 70g/L (em triplicata), com pH ajustado para 6,0.

Meio 2: meio controle, substituindo-se a sacarose por resíduos de acerola sob três concentrações diferentes: 30g/L, 50g/L, 70g/L (em triplicata), com pH ajustado para 6,0.

No monitoramento dos ensaios, analisou-se a produção de ácido cítrico (g/L), a variação do pH durante o processo fermentativo e a concentração de açúcares redutores totais (g/L).

Após a esterilização dos meios, fez-se a inoculação da cultura com 25mL de suspensão esporica 10⁷ (esporos/mL) em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250mL (% p:v), e incubados em *shaker* orbital a 150 rpm e 28°C por 120 horas de

fermentação. A cada 24h, alíquotas de 25 mL foram coletadas e acondicionadas em freezer para posteriores análises.

3. Determinação da Produção de Ácido Cítrico (AC)

A produção de ácido cítrico foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Saffran e Denstedt (1948), no qual pequenas quantidades de ácido cítrico são determinadas baseando-se na formação da cor amarela na presença de ácido tricloroacético (TCA), anidrido acético e piridina.

A reação acontece da seguinte forma: coloca-se 1,0mL das amostras coletadas ao longo do processo fermentativo, em tubos contendo 8,0mL de anidrido acético. Em seguida, leva-se o frasco para o banho-maria durante 10 minutos a 60°C, até o aquecimento da mistura. Após o aquecimento, acrescenta-se 1,0 mL de piridina em cada tubo, agita-se e retorna-se ao banho-maria por mais 40 minutos.

Durante esse período as amostras assumem uma coloração que pode variar do amarelo ao marrom escuro ou vermelho carmim, dependendo da concentração de ácido cítrico presente em cada amostra. Retiram-se as amostras do banho-maria para um banho de gelo durante 5 minutos. A leitura das amostras é feita em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 400 nm.

Para o branco, foi utilizado 1,0mL de TCA (15%), no lugar da amostra e seguiu-se o mesmo processo para a reação e leitura no espectrofotômetro.

A curva padrão foi construída utilizando-se 1 mL de solução de ácido cítrico (4g de ácido cítrico em 100mL de TCA a 15%). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 400 nm.

4. Determinação dos Açúcares Redutores Totais

Para a determinação dos açúcares redutores totais, seguiu-se a metodologia de Miller (1959), que utiliza o DNS (ácido dinitro-salicílico) que oxida o grupo carbonila presente na solução.

Foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras coletadas no processo de fermentação, e colocadas em frascos contendo 0,5 mL da solução do reagente DNS. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho-maria durante 5 minutos, em temperatura de ebulição.

Após resfriamento em água corrente, foi adicionado 5 mL de água destilada em cada amostra. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

A absorbância obtida foi correlacionada em concentração de açúcar redutor (AR) utilizando uma curva padrão de glicose.

5. Determinação do pH

Para medição do pH, todas as amostras coletadas foram submetidas a leituras no potenciômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O anidrido acético quente reage com a piridina e dá a coloração vermelho carmim na presença de ácido cítrico; vermelho violeta para ácido aconítico e verde esmeralda para ácido tartárico, segundo o método desenvolvido por Saffran e Denstedt (1948).

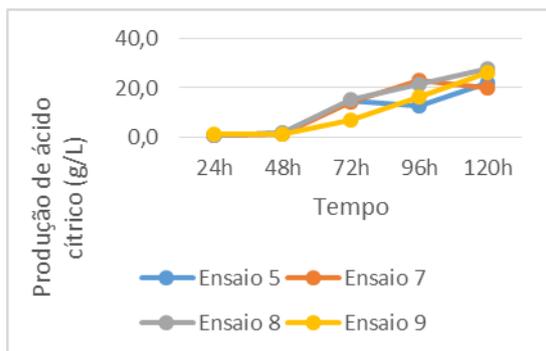
Após análises realizadas com o referido método para avaliar a produção de ácido cítrico, realizou-se estudos com o meio químico variando-se sua composição, a concentração de sacarose, ureia e valores de pH, encontrando-se os seguintes resultados, conforme matriz de planejamento fatorial de 2^3 , com quatro repetições do ponto central (Ver tabela 2):

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial experimental 2^3 com resultados de produção de ácido cítrico (AC) a 120h de fermentação.

Ensaio	Sacarose	Ureia	pH	Prod. AC (g/L) 120h
1	-1	-1	-1	4,7
2	+1	-1	-1	12,0
3	-1	+1	-1	2,9
4	+1	+1	-1	5,2
5	-1	-1	+1	22,0
6	+1	-1	+1	14,7
7	-1	+1	+1	20,1
8	+1	+1	+1	28,1
9	0	0	0	26,1
10	0	0	0	12,8
11	0	0	0	19,8
12	0	0	0	19,2

Após análise da produção de ácido cítrico, verificou-se que os ensaios de números 5, 7, 8 e 9 apresentaram os melhores resultados, obtendo-se, respectivamente, 22,0g/L, 20,1g/L, 28,1g/L e 26,1g/L a 120h de fermentação. Todos os outros ensaios obtiveram resultados abaixo de 20,0g/L de produção de AC. Por meio desses resultados, pode-se contatar que sob altas concentrações de sacarose (70g/L) e concentração de ureia de 4,5g/L com pH 6,0, a cultura SIS09 alcançou sua maior produtividade do ácido no ensaio 8 a 120h de fermentação, estabelecendo-se esse tempo, para este caso, como o ideal (ver figura 1).

Figura 1. Produção de AC no tempo decorrido de 120h de fermentação com os ensaios 5, 7, 8 e 9.



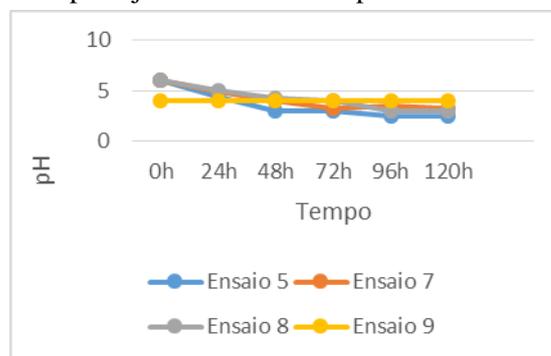
Pastore (2011) alcançou, em seus estudos de produção do ácido cítrico com *Aspergillus niger*, uma produção de 62,9 g/L.dia de ácido cítrico, no tempo decorrido de 24 horas de fermentação, por meio de planejamento fatorial de 2^4 , com sextuplicata do ponto central, onde se verificou a influência da associação entre as variáveis peptona e sulfato de amônio para o meio sintético de Prescott & Dunn, na melhor condição encontrada.

O ácido cítrico pode ser produzido mais facilmente de duas formas: ou quando vários componentes são adicionados ao meio fermentativo sob elevadas concentrações, tais como açúcares, acidez, oxigênio, ou quando certos componentes encontram-se abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato) (PASTORE et al, 2011). Segundo Sá (2011), os açúcares constituem-se nas fontes nutritivas mais facilmente metabolizadas por micro-organismos.

Nos resultados do planejamento fatorial em estudo, mais precisamente nos pontos centrais, verificou-se uma produção com valores próximos aos do ensaio de número 8, considerado o melhor resultado. Segundo Pastore (2011), isso é normalmente o que acontece para então se fazer uma análise do processo nos demais níveis, significando que o ponto central situa-se em um local decisivo, onde qualquer alteração acima ou abaixo pode resultar em um aumento da produtividade do ácido cítrico.

No gráfico da figura 2, é possível observar a variação do pH ao longo da fermentação nos ensaios 5, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial experimental, verificando-se que, em todos os ensaios citados, houve uma queda nos valores iniciais de pH, alcançando-se o menor valor de 2,5 no ensaio 5 (pH inicial = 6,0) a 120h de fermentação; seguido por 3,0 no ensaio 8 (pH inicial = 6,0), 3,5 no ensaio 7 (pH inicial = 6,0) e 4,0 no ensaio 9 (pH inicial = 4,0).

Figura 2. Variação de pH nos ensaios 5, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial experimental.



Esse abaixamento nos valores iniciais de pH evidencia a formação de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo, dentre eles, o ácido cítrico.

O pH é um fator de extrema importância na produção de ácido cítrico. Em se tratando tanto de fungos filamentosos quanto de leveduras, o valor ótimo encontra-se entre 5,0 e 6,0 (RODRIGUES, 2006). Pastore (2011) constatou que a variação temporal do acúmulo do ácido cítrico corresponde exatamente com a diminuição do pH assim que se inicia a sua produção.

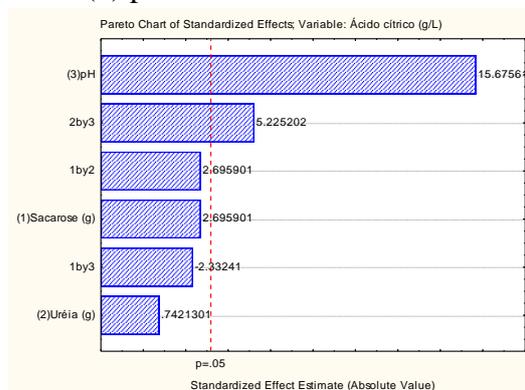
O Diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a produção de ácido cítrico, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise

estatística (SÁ, 2011). Neste experimento, o diagrama apresentou a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos na Tabela 2.

As alturas das barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente, conforme a Figura 3. As variáveis que apresentaram valores positivos indicam que o aumento de seus níveis proporciona um maior rendimento da produção do ácido cítrico. Observando o gráfico da Figura 3, é possível afirmar que as variáveis pH e a interação de Ureia e pH ultrapassaram o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95%, comprovando que são valores estatisticamente significativos.

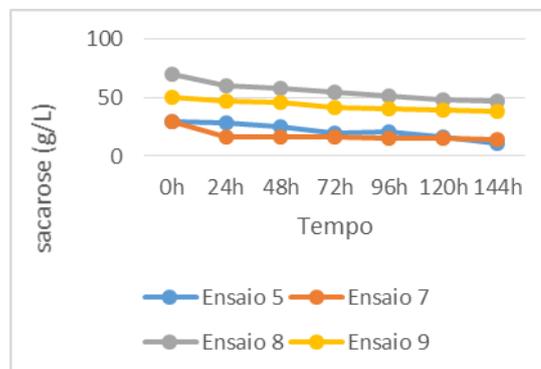
Nota-se que a variável pH é a que mais influenciou no processo de produção de ácido cítrico, indicando que com o maior valor de pH, maior será a produção de ácido cítrico (Ver figura 3).

Figura 3. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis independentes na produção de ácido cítrico a 120h de fermentação. (1) sacarose, (2) Ureia e (3) pH.



Quanto aos resultados das análises do açúcar redutor, os valores obtidos são expressos na figura 4.

Figura 4. Gráfico da concentração de açúcar redutor nos ensaios 5, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial experimental a 120h de fermentação.



O consumo dos açúcares redutores totais foi acompanhado em todas as diferentes concentrações nos meios testados para produção de AC (Figura 2). O consumo de açúcar (sacarose) ao longo da fermentação ocorreu de maneira regular, porém a amostra SIS 09 conseguiu produzir um maior acúmulo de AC nos ensaios 2, 4, 6 e 8, devido à alta concentração de sacarose (70g/L) introduzida na composição original dos meios.

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações iniciais de açúcares apresentaram uma variação nesses 4 ensaios citados acima, nos quais foram obtidos valores de 50,09g/L, 49,79g/L, 36,66g/L e 46,77 g/L, respectivamente.

A influência da adição de fontes de carbono e nitrogênio ao meio de produção de ácido cítrico se apresenta como bastante significativa, uma vez que são constituintes essenciais do tecido fúngico.

A segunda fermentação, na qual foram utilizados resíduos agroindustriais, foi executada tendo-se como base a melhor condição encontrada no primeiro experimento, ou seja, o ensaio 8, o qual apresentou a seguinte composição:

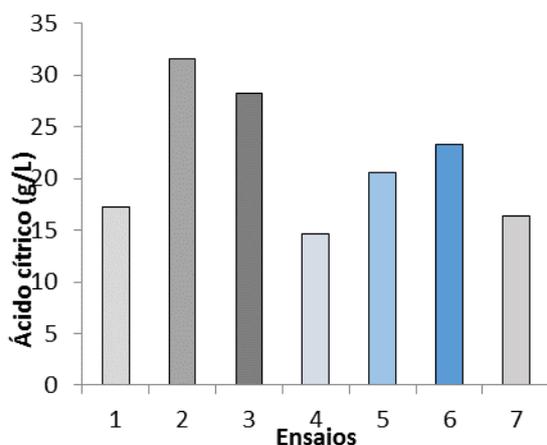
- NH_4NO_3 , 1g/L; KH_2PO_4 , 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,23g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5g/L; peptona, 2,5g/L; sacarose, 70g/L; ureia, 4,5g/L; pH = 6,0.

Todos os componentes foram mantidos nas mesmas concentrações, inclusive o valor de pH, com exceção da sacarose, a qual foi substituída por concentrações diferentes de resíduos de abacaxi e acerola (30g/L; 50g/L; 70g/L), na elaboração dos meios alternativos.

Após análises realizadas, verificou-se uma maior produção do ácido a 120h de fermentação (31,51g/L), com os resíduos de abacaxi sob concentração de 50g/L, conforme expresso na Figura 5.

Os meios contendo abacaxi à concentração de 70g/L e o de acerola à 70g/L também apresentaram bons resultados, respectivamente 28,23g/L e 23,29g/L de ácido cítrico, não superando, no entanto, a condição citada acima.

Figura 5. Resultado da produção de ácido cítrico com os resíduos de abacaxi e acerola em 120 horas de cultivo. (1, 2 e 3: abacaxi em 30g/L; 50g/L; 70g/L); 4, 5 e 6: acerola em 30g/L; 50g/L; 70g/L); 7: meio controle.



Majumder et al (2010) obtiveram os maiores valores na produção de ácido cítrico com a mistura de substratos de melação e abóbora em meio sem a presença do sal Prescott, utilizado em outras amostras, por meio de cepas mutantes de *Aspergillus niger*, induzidas com raio gama, encontrando em sua maior produção o valor de 14,86 mg/mL.

Ávila-Neto et al (2014) obtiveram uma produção de ácido cítrico de 59,0 g/L⁻¹ a 144 horas de fermentação, por *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095, utilizando glicerol como substrato para a produção, em planejamento fatorial.

CONCLUSÕES

Diante das análises realizadas, pode-se verificar que, após o planejamento fatorial de 2³, que teve como variáveis a sacarose, a ureia e o pH, os melhores resultados obtidos, com o ensaio 8, alcançaram uma produção de 28,1g/L de ácido cítrico a 120h de fermentação, com pH inicial 6,0, tendo seu valor rebaixado para 3,0 ao final das 120h.

Com relação à utilização dos resíduos agroindustriais, obteve-se a maior produção de ácido cítrico a 120h de cultivo, no meio alternativo em que foi utilizado o abacaxi à concentração de 50g/L, com rendimento de 31,51g/L.

Estudos poderão ser realizados utilizando-se outros tipos de resíduos da agroindústria em meios alternativos para a produção de ácido cítrico.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, V.; COSTA, M.; COSTA, M.; LIMA, T.; CRUZ, F. Ácidos orgânicos: ácido cítrico, ácido acético e ácido lático, sua importância na

biotecnologia. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, Belém-PA, 2009.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. Na overview of citric acid production. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 367-370, 2013.

ASHOUR, A.; EL-SHARKAWY, S.; AMER, M.; MARZOUK, A.; ZAKI, A.; KISHIKAWA A.; OHZONO, M.; KONDO, R.; SHIMIZU, K. Production of citric acid from corncobs with its biological evaluation. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, n. 3, p. 141-149, 2014.

ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; GUAGLIANONI, D. G.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; **Partial purification and characterization pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.)**. Journal of Agricultural Food Chemistry, Easton, v. 5, p. 4103-4107, 2002.

ASSUMPÇÃO, C. F.; BACHIEGA, P. SANTANA, A. T. M. C.; MORZELLE, M. C.; VILAS-BOAS, B. M.; SOUZA, E. C. Néctar misto de mangaba (*Hancoria speciosa* Gomes) e cagaita (*Eugenia dysenterica*): perfil sensorial e características físico-químicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 219-224, 2013.

ÁVILA-NETO, P. M.; DA-SILVA, G. P.; LIMA, C. J. B.; DE-PAULA, F. C.; CONTIERO, J. Evaluation and optimization of growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 using glycerol as carbon source as alternative to use biodiesel byproduct. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 25-31, 2014.

CASTRO, D. S.; NUNES, J. S.; SILVA, F. B.; OLIVEIRA, T. K. B.; SILVA, L. M. M. **Desenvolvimento e avaliação físico-química de néctar misto de abacaxi (*Ananás comosus*) e seriguela (*Spondias purpúrea*)**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 9, n. 1, p. 06-09, 2014.

COSTA, L. M. A. S.; SOUZA, S. M. C.; ABREU, P. S.; BASTOS, S. C.; NASCIMENTO, M. N.; MALLET, A. C. T. Citric acid production and citrate synthase genes in distinct strains of *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 22, p. 2220-2226, 2014.

EL-HOLI, M.; AL-DELAIFY, K. S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 10, p. 356-359, 2003.

FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; GUEDES, D. B.; OLIVEIRA, A. N.; LIMA, T. H. S. F.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de um suco misto de manga, goiaba e acerola, utilizando delineamento de misturas. **Ciência Rural**, v. 42, n.5, p. 911-917, 2012.

FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; LAGES, M. M. B.; RODRIGUES, V. A. F.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D. Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jabuticaba em biscoitos tipo cookie. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais.

- JAMAL, P. et al. Sewage treatment plant sludge: a source of potential microorganism for citric acid production. **American Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 8, p. 1236-1239, 2005.
- KAMZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V.; MORGUNOV, I. G.; FINOGENOVA, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 217-222, 2003.
- MADZAK, C.; CHI, Z. M. Both decrease in ACL1 gene expression and increase in ICL1 gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing INU1 gene enhance citric acid production from inulin. **Marine Biotechnology**, v. 15, Issue 1, p. 26-36, 2013.
- MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; SILVA, W. S.; MARANHÃO, C. M. C.; SOUZA, K. A. **Características sensoriais e físico-químicas de geleias mistas de manga e acerola**. B. Ceppa, v. 27, n. 2, p. 247-256, 2009.
- MAJUMDER, L.; KHALIL, I.; MUNSHI, M. K.; ALAM, K.; RASHID, H. O.; BEGUM, R.; ALAM, N. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. **European Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 01-08, 2010.
- MALAGONI, R. A. Cristalização de ácido cítrico em leito vibrado. 2010. 297p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NEVES, M. V. M.; LIMA, V. L. A. G. Avaliação sensorial e caracterização físico-química de néctar de acerola adicionado de extrato comercial de própolis. **Alim. Nutr Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 399-405, 2010.
- PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engvista**, v. 13, n. 3, p. 149-159, 2011.
- PEREIRA, C. T. M.; SILVA, C. R. P.; LIMA, A.; PEREIRA, D. M.; COSTA, C. N.; CAVALCANTE NETO A. A. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Acta Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 50-56, 2013.
- RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; STURM, W.; DERGINT, D. E. A.; SPIER, M. R.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus* sp. Mutant in SSF. **World J. Microbiology Biotechnology**, n. 29, p. 2317-2324, 2013. DOI 10.1007/s11274-013-1397-y.
- SÁ, T. N. M. Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato. 2011, 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

SAFFRAN, M.; DENSTEDT, O. F. A rapid method for the determination of citric acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 175, p. 849-855, 1948.

SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; MIRANDA, R. C. M.; NARAIN, N. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para produção de ácido cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, 2012.

YALCIN, S. K. Enhancing citric acid production of *Yarrowia lipolytica* by mutagenesis and using natural media containing carrot juice and celery byproducts. **Food Sci. Biotechnol.** V. 21, n. 3, p. 867-874, 2012.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Dentre as amostras de *Aspergillus* testadas neste estudo, para a seleção de melhores cepas produtoras de ácido cítrico, o micro-organismo SIS09 foi o que se apresentou com os melhores resultados diante das outras amostras testadas;
- Nos ensaios referentes a seleção dos meios de produção do ácido cítrico, o meio que apresentou os melhores resultados foi o meio denominado 1, dentre os três meios selecionados para produção do AC;
- Os ensaios utilizando o planejamento fatorial 2^3 para a produção de ácido cítrico, utilizando o Meio 1, dentre os 12 ensaios realizados, tendo como variáveis independentes a sacarose, a ureia e o pH, o ensaio 8 foi o que demonstrou os melhores resultados de produção,
- A influência da fonte de carbono na produção de ácido cítrico, foi verificada através do ensaio 8, onde a sacarose foi substituída por resíduos agroindustriais (abacaxi e acerola), através de fermentação submersa por 120 horas, 150 rpm, a 28°C, onde a maior produção do AC foi obtida com o resíduo de abacaxi(50g/L a 120h de cultivo);
- Os resultados obtidos demonstraram a eficácia na utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos na produção de ácido cítrico, através da formulação de meios alternativos, pois o reaproveitamento desses resíduos contribui para minimização dos impactos ambientais, bem como a redução dos custos da produção de ácidos orgânicos de vasta utilização biotecnológica.

ANEXO I

Carta de Aceite – Revista Exacta

Márcia

Trabalho submetido com sucesso.

Carlos

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Magali Barroso" <exacta@unibh.br>

Para: "Professor Carlos Alberto Alves da Silva" <calves@unicap.br>

Enviadas: Terça-feira, 9 de setembro de 2014 19:17:51

Assunto: [exacta] Agradecimento pela Submissão

Professor Carlos Alberto Alves da Silva,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Seleção de amostras de *Aspergillus* so isoladas da Caatinga de Pernambuco e Produção de ácido cítrico por fermentação submersa" para e-Xacta. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://revistas.unibh.br/index.php/dcet/author/submission/1316>

Login: carlos-alves

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Magali Barroso
e-Xacta

e-xacta Revista Científica do Instituto de Engenharia e Tecnologia do
Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH
<http://localhost/ojs12/index.php/dcet>

ANEXO II

Normas da Revista Exacta



ISSN: 1984-3151

MODELO DE ARTIGO DA REVISTA E-XACTA

TEMPLATE FOR REVISTA E-XACTA

Magali Maria de Araújo Barroso¹; Autor²; Autor³

- 5 Doutora em Ciências em Engenharia de Sistemas e Computação. COPPE/UFRJ, 1987. Professora do Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH. Belo Horizonte, MG. magali.barroso@prof.unibh.br.
- 6 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.
- 7 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

*RESUMO: Estabelece o modelo de formatação dos artigos a serem submetidos à **Revista e-xacta**, publicada pelo Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH.*

PALAVRAS-CHAVE: Artigo. Formatação. Revista e-xacta.

*ABSTRACT: It establishes the formatting template for the papers to be submitted to **Revista e-xacta**, which is published by UniBH.*

KEYWORDS: Article. Formatting. Revista e-xacta.

1 INTRODUÇÃO

A **e-xacta** é a revista eletrônica do UniBH, registrada no Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT) com o ISSN: 1984-3151. O ISSN (*International Standard Serial Number*) é o Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas, conforme (IBICT, 2012). A Revista **e-xacta**, criada em 2008, tem como objetivo divulgar trabalhos relativos às Ciências Exatas e Tecnologia.

O público-alvo deste periódico é composto pela comunidade acadêmica universitária, profissionais das áreas mencionadas ou que delas se servem no

exercício de sua atividade fim, além de organizações públicas, privadas e do terceiro setor; todos atentos à incorporação do conhecimento científico-tecnológico como uma das bases do desenvolvimento social e econômico.

A periodicidade da revista é semestral (julho e dezembro) com edições especiais temáticas, publicadas esporadicamente. A revista utiliza o software livre SEER - Sistema Eletrônico de Editoração de Revistas, desenvolvido pelo IBICT, para construção e gestão de publicações periódicas eletrônicas. Todo o seu acervo tem livre acesso,

disponibilizado pelo *site*: www.unibh.br/revistas/exacta/. As seções da revista, com exceção do Editorial, estão abertas à submissão de trabalhos e participam do processo de avaliação pelos pares no sistema de avaliação anônima (*double blind review*), por pelo menos dois pareceristas.

Os artigos submetidos devem atender aos objetivos da **Revista e-xacta**, serem inéditos, teóricos ou aplicados às diversas áreas do conhecimento. E realizados em universidades, centros de pesquisa e organizações nacionais ou internacionais, a partir de atividades de ensino, pesquisa ou extensão.

Os interessados em enviar contribuições à revista devem acessar o *site* www.unibh.br/revistas/exacta/ e seguir as instruções contidas nas Normas Editoriais disponíveis na aba Sobre. As submissões são *online* e além do envio do artigo, seguindo o modelo apresentado na edição Atual da revista, os autores devem preencher os metadados. Tratam-se de informações importantes sobre cada um dos autores e da área temática abordada no conteúdo do trabalho científico. Esclarecimentos de dúvidas e informações adicionais podem ser obtidos pelo e-mail: exacta@unibh.br.

As seções subsequentes deste documento se compõem das normas de formatação a serem adotadas, bem como a estruturação básica de um artigo científico. São estabelecidas as formas de inclusão de objetos ilustrativos, necessários para enriquecer e facilitar o entendimento do texto, e esclarecem a necessidade da inserção das citações, bem como a forma em que as mesmas devem ser apresentadas. Além disso, o texto explicita, conforme as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), o formato das referências de documentos frequentemente consultados, cujas informações podem ser complementadas por França e Vasconcellos (2011). As últimas seções descrevem os

procedimentos utilizados para a avaliação dos artigos e para a publicação da revista.

2 NORMAS PARA FORMATAÇÃO

A formatação dos artigos submetidos deve obedecer às diretrizes estabelecidas neste documento, que seguem a padronização da ABNT – NBR 6022 (2003) e NBR 14724 (2005). Aconselha-se ao autor a utilização deste modelo para editar o artigo. As informações sobre a autoria (Nome do autor, Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail) serão excluídas, pela Comissão Editorial, durante o processo de avaliação.

O artigo deve estar salvo no formato Microsoft Word (.doc) contendo de 6 a 20 páginas. A linguagem deve ser clara, gramaticalmente correta e na terceira pessoa do singular.

O alinhamento do texto deve ter formatação justificada, sem cabeçalho, rodapé, notas de pé de página, nem número da página. O formato do papel deve ser A4, com margens superior e inferior de 2,5 cm e margens laterais de 1,5 cm. A fonte do documento é Arial, o tamanho e estilo da fonte dependem da seção em que o texto se insere. Os parágrafos não possuem recuo, têm espaçamento anterior de 0 pt. e, posterior, de 6 pt.. O espaçamento entre linhas é de 1,5, salvo em casos particulares, explicitados na sequência do texto.

Em um artigo científico destacam-se três elementos:

1. Pré-textuais;
2. Textuais;
3. Pós-textuais.

Optou-se por apresentar esses elementos com enumeração de tópicos para que se esclareça tal formatação. Observe-se que os tópicos são separados por ponto-e-vírgula e o último finalizado com ponto. O

afastamento dos marcadores é de 0,75 e o texto de 1,25.

2.1 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

O primeiro elemento do artigo é o título. É expresso em Português e em Inglês, deve ser breve e inspirado no objetivo geral do trabalho, refletindo o conteúdo do texto. Em títulos não se coloca ponto final. Se houver subtítulo, este deve ser separado do título por dois pontos (:). Essas informações ocupam as linhas iniciais do documento, ao lado da logomarca da revista. Devem estar centralizadas, em negrito e efeito Versalete. O título em português possui tamanho da fonte 16 e, o em inglês, 14.

Há uma linha em branco de 12 pontos entre o título e as informações sobre os autores, com espaçamento entre linhas de 1,5. Os nomes em negrito, centralizados e fonte 12, separados por ponto-e-vírgula e identificados, posteriormente, por sobrescritos em algarismos arábicos. Na sequência, para cada autor, devem-se apresentar as seguintes informações em fonte de tamanho 8: Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Observe-se que uma linha em branco deve separar os dados supracitados da seção seguinte.

O Resumo e as Palavras-chave, editados na margem esquerda, seguidos de dois pontos, são formatados em itálico, fonte de tamanho 10 e espaçamento simples entre linhas. Nos títulos destas seções usa-se o efeito Versalete. Conforme esclarece a ABNT NBR 6028 (2003), é aconselhável que o resumo contenha no máximo 250 palavras e seja editado em um único parágrafo, no qual se ressaltam o objetivo, o método, os resultados e a conclusão do artigo. Ele deve ser expresso na voz ativa, na terceira pessoa do singular. Composto por frases concisas e afirmativas. Devem-

se evitar a enumeração de tópicos e a inserção de símbolos e ilustrações. Na linha posterior são discriminadas de três a seis palavras-chave, que representam o conteúdo do documento, sendo utilizadas como chave de busca. São separadas entre si e finalizadas por ponto.

Após uma linha em branco, inserem-se o *Abstract* e *Keywords*, que são a versão em inglês das duas seções anteriores, com a mesma formatação.

2.2 ELEMENTOS TEXTUAIS

São compostos pela Introdução, Desenvolvimento e Conclusão.

Como pode ser observado, existem linhas em branco e um traço separando a última seção dos elementos pré-textuais para a Introdução, que é a primeira seção dos elementos textuais. A partir desse ponto o texto é formatado em duas colunas de 8,6 cm de largura e espaçamento entre colunas de 0,8 cm.

Na Introdução expõe-se o tema tratado, sua delimitação e foco de abordagem, contextualizando-o na literatura consultada. Apresentam-se o objetivo geral e, os específicos, conceituações, justificativa e motivação do estudo, um breve relato sobre o plano de desenvolvimento, enfim, os pressupostos necessários à sua compreensão. No último parágrafo da Introdução deve constar uma descrição sintética, ou seja, a sinopse do conteúdo abordado nas seções subsequentes do artigo.

O Desenvolvimento é o elemento textual central, a parte principal do artigo. É ele que dá a visão pormenorizada do tema estudado. Pode ser exposto em várias seções tais como: a revisão bibliográfica, o marco teórico que fundamenta a metodologia utilizada, o conjunto de técnicas e processos da pesquisa, a coleta de dados e sua quantificação, se for o caso, além da apresentação e discussão dos resultados.

Apresenta-se na última seção, a Conclusão, a síntese do que foi estudado, onde se devem evidenciar os aspectos essenciais da pesquisa, relacionar os resultados obtidos com os objetivos propostos, expor as dificuldades encontradas, recomendar, se conveniente, novas abordagens para o tema e sua extensão em estudos futuros.

Quanto à formatação, os títulos das seções e subseções, com alinhamento à esquerda, são destacados do texto por uma linha em branco, anterior. Devem ser numerados com algarismos arábicos e com apenas um espaço entre o algarismo e o título, conforme a norma ABNT NBR 6024 (2003). Todos os títulos possuem fonte 12, com efeito Versalete e em negrito. Para facilitar, cada vez que se abrir uma nova seção, copie e cole o título da anterior para depois editá-lo.

As seções podem ter subseções e estas ainda comportam mais três níveis de subdivisões. Como exemplo: **4.2.3 METODOLOGIA** designa a terceira subdivisão da segunda subseção da seção 4.

O autor deve estar atento ao uso de siglas. Na primeira utilização de uma sigla, deve-se informar o seu significado. Na primeira seção deste documento foi mencionada a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – e, posteriormente foi usada simplesmente a sigla ABNT, já que era conhecido o seu significado. Outra observação importante é que palavras em outros idiomas devem vir em itálico.

Em relação à formatação do artigo, deve-se cuidar para que o título de uma seção ou subseção não ocupe a última linha de uma coluna. Neste caso, linhas em branco são providenciais para que o mesmo ocupe a primeira linha da coluna seguinte.

2.3 ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

Os Elementos Pós-Textuais não são numerados e se compõem de: Agradecimentos (opcional), Referências, Apêndices (opcional) e Anexos (opcional).

As referências são obrigatórias em um texto científico. A seção 5 deste modelo contém informações mais detalhadas sobre as referências.

Os apêndices e anexos, conforme consta na ABNT NBR 6022 (2003), são textos ou documentos que ilustram, comprovam, fundamentam ou completam a argumentação do trabalho desenvolvido. A diferença entre eles é que os apêndices são de autoria do próprio autor do artigo e, os anexos, de autoria de terceiros. Para identificá-los, utilizam-se letras maiúsculas consecutivas, seguidas de travessão e do título. Somente as palavras Apêndice e Anexo em caixa alta. As letras de identificação e os títulos devem estar em fonte tamanho 12, em negrito e efeito Versalete, como nos exemplos: **APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO** ou **ANEXO D – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE.**

3 COMO TRATAR AS ILUSTRAÇÕES

As ilustrações (desenhos, esquemas, figuras, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas arquitetônicas, quadros, entre outras), as equações, as fórmulas, as tabelas e os algoritmos são utilizados com o objetivo de explicar e facilitar o entendimento do texto.

Tais elementos devem ser referenciados no texto e, conforme ensinam França e Vasconcellos (2011), eles devem estar tão próximos quanto possível da primeira vez que forem mencionados. Devem ter numeração sequencial, em separado para cada categoria, seguidos do título e espaçamento simples entre linhas. Devem-se evitar dividir tabelas, algoritmos, quadros, etc. Caso tenham sido extraídos de um documento, já publicado, é obrigatória a indicação do mesmo, logo abaixo do título, deve-se inserir: Fonte –

SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. número-da-página. Antes e após a ilustração deve-se deixar uma linha em branco para destacá-la do texto.

3.1 FIGURAS

As figuras devem ser incluídas e referenciadas como a FIG. 1.



Figura 1 – Logo da **Revista e-xacta** do Centro Universitário de Belo Horizonte
Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.3.

Observe-se que o título da figura e, se for o caso, a fonte bibliográfica de onde foi extraída são centralizados e estão inseridos posteriormente à mesma.

3.2 ALGORITMOS

Devem ser formatados como o Algoritmo 1, dado a seguir, com título e espaçamento simples entre linhas.

Algoritmo 1 – Determina e imprime o menor entre dois números distintos.

Algoritmo

declare A,B, Menor numérico

leia A,B

se A < B

então Menor ← A

senão Menor ← B

fim se

imprima Menor

fim algoritmo.

3.3 EQUAÇÕES E FÓRMULAS

Equações e fórmulas devem ser numeradas e citadas no texto conforme a Eq. 1:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

onde: f = frequência [Hz], c = velocidade da luz no vácuo = 3.10^8 [m/s], λ = comprimento de onda [m].

3.4 TABELAS

As tabelas são formatadas segundo a TAB. 1. Observe-se que a numeração e os títulos das tabelas são centralizados e colocados antes das mesmas.

Tabela 1

Parâmetros montagem das Medições

Medição	f	h_r
1	200MHz	75 cm
2	400MHz	33,33 cm
3	900MHz	16,67 cm
4	1800MHz	8,33 cm

Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.2.

4 A IMPRESCINDIBILIDADE DAS CITAÇÕES

Como esclarecem França e Vasconcellos (2011): “A fonte de onde foi extraída a informação deve ser citada obrigatoriamente, respeitando desta forma os direitos autorais.” É, portanto, imprescindível que o autor cite as fontes bibliográficas que nortearam suas ideias no desenvolvimento do trabalho. São elas que dão credibilidade à argumentação, ao emprego da metodologia utilizada para a obtenção dos resultados da pesquisa.

As citações podem ser diretas ou indiretas, como determina a norma ABNT NBR 10520 (2002). As citações diretas são transcritas como aparecem no texto original. Se possuírem até três linhas são editadas no corpo do texto, entre aspas. Observe-se a citação apresentada na parte inicial desta seção.

Aquelas que excedem este valor são destacadas como a que se encontra a seguir.

As citações longas, com mais de três linhas, devem constituir um parágrafo independente, com recuo de 1,25, fonte de tamanho 9 e espaçamento simples entre linhas. As aspas são desnecessárias, já que a formatação diferenciada induz tratar-se de uma citação direta. Ao final deve-se colocar entre parênteses o sobrenome do autor em caixa alta, seguido de vírgula, o ano de publicação e, se possível, o número da página. (SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. X).

As citações indiretas são livres, isto é, reproduzem as ideias do autor consultado com outras palavras, como consta em (MICHEL, 2005, p.127).

As normas da ABNT estabelecem formas diferentes para a indicação dos autores nas citações, como podem ser vistas em França e Vasconcellos (2011) ou (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

Observe-se que as duas citações do parágrafo anterior são apresentadas de maneiras diferentes. A primeira com apenas o ano entre parênteses e, nesse caso, os sobrenomes dos autores, com as letras iniciais maiúsculas, são separados por vírgulas e a conjunção aditiva “e”. Na segunda, todos os sobrenomes dos autores são editados em caixa alta, separados por ponto-e-vírgula, sendo o último seguido de vírgula e o ano de publicação. Pode-se inserir após o ano, a página de onde foi extraída a informação citada. Caso o documento possua mais de três autores, deve-se indicar na citação, como também em seu registro nas Referências, o sobrenome do primeiro autor acompanhado da expressão latina *et al.*, em itálico, seguida de vírgula e o ano de publicação. Como o exemplo a seguir: Sobrenome-do-primeiro-autor *et al.* (ano) ou (SOBRENOME-DO-PRIMEIRO-AUTOR *et al.*, ano).

5 NORMAS PARA AS REFERÊNCIAS

As referências, separadas por um traço das seções anteriores, são apresentadas ao final do artigo. Elas são obrigatórias em um artigo científico e devem ser

composta pelas fontes efetivamente consultadas. Além disso, todo documento pertencente às referências deve ser citado no texto e vice-versa, toda citação deve ter seu documento fonte presente nas referências.

A lista dos títulos bibliográficos deve estar em ordem alfabética usando o sobrenome dos autores como primeiro parâmetro e, como segundo, o título da publicação. A transcrição dos elementos que compõem as referências deve estar de acordo com as normas da ABNT, especificadas em (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

A norma ABNT NBR 6023 (2002) define que as referências devem ser alinhadas à margem esquerda do texto, editadas com espaçamento simples entre linhas, sem afastamento anterior e posterior entre parágrafos. Para destacá-las, elas são separadas por uma linha em branco.

O formato das referências depende do tipo de documento consultado, sendo os principais apresentados nas subseções dadas a seguir, cujas informações, em sua maioria, foram extraídas de (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011). Alguns códigos devem ser observados. Quando estiver escrito:

- **AUTOR** – Deve-se escrever o Sobrenome do primeiro autor em caixa alta, seguido de vírgula, e demais nomes deste autor, apenas com as primeiras letras em caixa alta ou as iniciais seguidas de ponto e um espaço entre elas. Caso haja de dois a três autores, coloca-se entre eles um ponto e vírgula e repete-se a formatação apresentada para cada um deles. Se houver mais de três autores coloca-se apenas as informações sobre o primeiro e em seguida, em itálico, a expressão latina *et al.*
- **Informação** – deve-se colocar a informação em itálico.
- **Informação** – Deve-se colocar a informação com a fonte em estilo normal.

- (Informação) – Deve-se colocar a informação entre parênteses.
- <Informação> - Deve-se apresentar a informação entre os símbolos <>.
- Informação. – Deve-se colocar após a informação um ponto final.
- Cidade: Editora, Ano. – Deve-se colocar a cidade na qual o documento foi publicado, seguida de dois pontos, a editora, seguida de vírgula e o ano de publicação, seguido de ponto final.
- Edição – Deve-se indicar o número da edição do livro, seguida de ponto e depois de um espaço coloca-se ed., a abreviatura de edição.
- Acesso em: 25 dez. 2000. Indica a data em que um documento *online* foi acessado. A expressão Acesso em, seguida de dois pontos, um espaço. o dia da consulta, mais um espaço, seguido da abreviatura do mês e depois de um espaço o ano, seguido de ponto. As abreviaturas dos meses são: jan., fev., mar., abr., maio, jun., jul., ago., set., out., nov. e dez.

5.1 LIVROS

Impresso

AUTOR. **Título:** subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. Número de páginas p. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR. **Título:** subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Impresso

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título:** subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. Capítulo n.º do capítulo. página inicial – página final do capítulo. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título:** subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.3 ARTIGO DE PERIÓDICO

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do periódico**, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do periódico**, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

5.4 ARTIGO DE JORNAL

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do jornal**, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Número ou Título do caderno, seção ou suplemento, página inicial – página final.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do jornal**, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.5 TRABALHOS ACADÊMICOS – MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES

Impresso

AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa.

Eletrônico

AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico

(Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa. (CD-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.6 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Impresso

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização.
Título da publicação: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho.

Eletrônico

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização.
Título da publicação: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho. (CR-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.7 SITES

NOME DO SITE. **Título do serviço ou produto.** Cidade: Entidade, Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.8 LEIS E RESOLUÇÕES

NOME DO PAÍS, ESTADO MUNICÍPIO OU NOME DA ENTIDADE. Órgão. **Título.** Tipo de documento, Numeração. Dia de mês de ano. Elementos Complementares que identificam o documento. Dados de publicação do documento. Cidade, data.

6 PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO ARTIGO

Após a submissão do artigo, inicia-se o processo de avaliação, que utiliza o sistema de revisão anônima por pelo menos dois pareceristas ou *double blind review*. É criada uma versão do arquivo em formato PDF (*Portable Document Format*), do qual se extraem as informações que identificam sua autoria. Em seguida o artigo é enviado a dois pareceristas. Caso os pareceres sejam conflitantes, um terceiro revisor é

acionado para que a Comissão Editorial tenha o aval duplo de aceitação ou rejeição. Os pareceres quando recebidos são, também, formatados em PDF e enviados aos autores, sem a identificação de quem emitiu o parecer.

Sendo o artigo aceito para a publicação com restrição, os autores devem acatar as recomendações dos pareceristas e providenciarem o envio da nova versão do artigo.

Após a correção, a Comissão Editorial insere o nome do autor, enumera as páginas e demais dados pertinentes ao periódico, contendo informações sobre a edição da revista (volume, número, páginas etc.).

Deve-se ressaltar que o artigo (originalidade, autoria, conteúdo abordado etc.) é de inteira responsabilidade do autor, assim como a apresentação do texto no padrão culto da língua. A Comissão Editorial se dá o direito de alterar a formatação e a linguagem do texto para ajustá-las ao padrão da revista.

7 PUBLICAÇÃO

A última etapa do processo editorial é a publicação da revista. A nova edição é disponibilizada com o Sumário, que elenca os títulos dos artigos, os respectivos autores e o link para o Resumo. Ao acessar o Resumo, o usuário pode baixar o artigo completo no formato PDF.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Diretor, aos Coordenadores e Professores dos cursos do Instituto de Engenharia e Tecnologia e à Administração Superior do UniBH pela confiança e apoio.

Agradece, especialmente, ao Prof. Cayley Guimarães, editor pioneiro da e-xacta, e aos editores das demais revistas eletrônicas do UniBH: Ana Sofia Sauma

(e-civitas), Luciene dos Santos (e-com), Ana Cristina Pereira Lage (e-hum) e Thiago Teixeira Mendes (e-scientia), companheiros de objetivo e trabalho.

REFERÊNCIAS

ABNT - NBR 6022: **Informação e documentação – Artigo em publicação periódica científica impressa - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 5 p.

ABNT - NBR 6023: **Informação e documentação - Referências – Elaboração.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 24 p.

ABNT - NBR 6024: **Informação e documentação - Numeração progressiva das seções de um documento escrito - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 3p.

ABNT - NBR 6028: **Informação e documentação - Resumo - Apresentação.** Rio de Janeiro, nov. 2003. 2 p.

ABNT - NBR 10520: **Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 7 p.

ABNT - NBR 14724: **Informação e documentação - Trabalhos Acadêmicos - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2005. 9 p.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C.; **Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas.** 8.^a ed. rev. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2011. 358 p. ISBN: 978-85-7041-560-8.

GUIMARÃES, C. ModeloexactaWord. **Revista e-xacta.** Belo Horizonte, Uni-BH, 2008. 3 p.

IBICT – Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Centro Brasileiro do ISSN. **Sobre o ISSN.** Brasília,DF: IBICT, 2012. Disponível em <http://www.ibict.br/informacao-para-ciencia-tecnologia-e-inovacao%20centro-brasileiro-do-issn>. Acesso em: 11 abr. 2012.

MICHEL, M. H. **Metodologia de Pesquisa Científica em Ciências Sociais.** São Paulo: Editora Atlas S.A., 2005. 141 p. ISBN: 85-224-4053-0.