



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**Alexandre D'Lamare Maia de Medeiros**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR AMOSTRAS  
DE *ASPERGILLUS spp.* ISOLADAS DA CAATINGA  
DE PERNAMBUCO UTILIZANDO MEIOS  
FORMULADOS COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS  
REGIONAIS**

**Recife  
2020**

**Alexandre D’Lamare Maia de Medeiros**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR AMOSTRAS  
DE *ASPERGILLUS spp.* ISOLADAS DA CAATINGA  
DE PERNAMBUCO UTILIZANDO MEIOS  
FORMULADOS COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS  
REGIONAIS**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: Prof Dr Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientador: Prof Dr Raphael Fonseca do Nascimento

**Recife  
2020**

D'Lamare, Alexandre M. M.

Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais, 2020, 84.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2020.

1. Ácido Cítrico. 2. Fungos Filamentosos. 3. Resíduos Agroindustriais. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR AMOSTRAS  
DE *ASPERGILLUS spp.* ISOLADAS DA CAATINGA  
DE PERNAMBUCO UTILIZANDO MEIOS  
FORMULADOS COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS  
REGIONAIS**

ALEXANDRE D'LAMARE MAIA DE MEDEIROS

**Examinadores:**



---

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



---

Profa Dra Rosileide Fontenele da Silva Andrade  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



---

Profa Dra Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

## **AGRADECIMENTOS**

Dentre todos que merecem o meu mais sincero agradecimento, priorizo o ser que é a causa primeira de todas as coisas, que me deu o dom da vida, que possibilitou a realização deste trabalho e, que cuja sabedoria excede todo o entendimento: Deus.

A minha família, pelo incentivo, e sem a qual eu nunca teria sequer começado um curso de pós-graduação.

Aos colegas de turma e de laboratório que estavam constantemente dividindo os momentos de acertos e erros, e apoiando uns aos outros nos momentos difíceis durante toda a jornada.

Aos professores da universidade, por compartilhar os seus amplos conhecimentos e disponibilizar-se de maneira irrestrita para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
SUMÁRIO .....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I .....	9
1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Revisão da Literatura .....	13
3.1. Biotecnologia e a Produção de Compostos Bioativos .....	13
3.2. Produção de Ácidos Orgânicos .....	15
3.3. Ácido Cítrico .....	17
3.4. Micro-organismos Produtores de Ácido Cítrico .....	22
3.5. Gênero <i>Aspergillus</i> .....	23
3.6. Processos Fermentativos .....	25
3.7. Resíduos Agroindustriais .....	27
3.8. Frutas Cítricas .....	29
3.8.1. Abacaxi .....	30
3.8.2. Acerola .....	32
3.8.3. Laranja .....	33
3.8.4. Limão .....	35
4. Referências Bibliográficas.....	36
CAPÍTULO II – Artigo científico.....	50
CAPÍTULO III – Artigo científico.....	57
CAPÍTULO IV .....	66
Conclusões Gerais .....	67
ANEXOS.....	68

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Diagrama demonstrando a diversidade de áreas de estudo abrangidas pela Biotecnologia.....	14
Figura 2. Forma estrutural do ácido cítrico.....	18
Figura 3. Ciclo de Krebs ou ciclo do Ácido cítrico.....	18
Figura 4. Ácido cítrico anidro comercial.....	20
Figura 5. Biorreator na linha de produção da fabricação industrial de ácido cítrico.....	23
Figura 6. Microscopia de <i>Aspergillus niger</i> .....	24
Figura 7. Meios de produção de AC em estado sólido.....	25
Figura 8. Meios de produção de AC em estado líquido.....	26
Figura 9. Resíduos Agroindustriais mal descartados.....	28
Figura 10. Frutas cítricas produzidas no Nordeste brasileiro (abacaxi, acerola, kiwi, laranja, limão e morango).....	30
Figura 11. Plantação de Abacaxis do estado da Paraíba.....	31
Figura 12. Aceroleira apresentando acerolas maduras ( <i>Malpighia glabra</i> ) de coloração vermelho intenso.....	32
Figura 13. Laranjal situado na cidade de Bom Conselho em Pernambuco.....	34
Figura 14. Plantação de Limões em Monte Alegre Paraná.....	35

### CAPÍTULO II

Figura 1. Estrutura química do ácido cítrico.....	52
Figura 2. Microscopia <i>Aspergillus niger</i> .....	52
Figura 3. Amostras de <i>Aspergillus spp</i> UCP 1099, 1356, 1357 e 1463.....	53
Figura 4. Placa com meio Foster-David.....	54
Figura 5. Placa UCP 1357, pH 8,5 e mantida à temperatura de 37°C.....	54

### CAPÍTULO III

Figura 1. Produção de ácido cítrico com diferentes amostras de <i>Aspergillus</i> .....	61
Figura 2. Variação de pH das amostra UCP1357 durante 144 h de fermentação.....	61
Figura 3. Consumo de açúcar das alíquotas dos ensaios da UCP1357 ( $\Phi$ ).....	61
Figura 4. Produção de AC da UCP1357 nos meios alternativos ( $\Phi$ ).....	62
Figura 5. Diagrama de Pareto das interações entre os resíduos agroindustriais utilizados.....	62
Figura 6. Superfície de resposta 3d das interações entre os resíduos de laranja e limão.....	62

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO I**

Tabela 1. Produtos gerados a partir de fermentação e seus respectivos micro-organismos produtores.....	13
Tabela 2. Aplicações industriais dos ácidos orgânicos.....	15
Tabela 3. Ácidos orgânicos presentes em nosso dia-a-dia e suas respectivas fórmulas moleculares.....	16
Tabela 4. Ano de descoberta e/ou isolamento de alguns ácidos orgânicos e seus respectivos “descobridores”.....	17
Tabela 5. Aplicações do ácido cítrico.....	19
Tabela 6. Fatores químicos que afetam diretamente a produção de ácido cítrico.....	21

### **CAPÍTULO II**

Tabela 1. Seleção de amostras para produção de ácido cítrico em diferentes temperaturas e pH, Ensaios com 96 horas, halos expressos em centímetros (cm).....	54
--	----

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Matriz codificada com a quantidade em gramas por litro de cada resíduo agroindustrial.....	60
Tabela 2: Concentração de ácido cítrico nos ensaios da UCP1357 a cada 24 horas ( $\Phi$ ).....	61
Tabela 3: Resultados dos ensaios propostos na matriz decodificada.....	62

## RESUMO

A biodiversidade microbiana tem apresentado uma grande evolução nas últimas décadas, devido ao isolamento e identificação da microbiota de ambientes ainda pouco estudados, como a Caatinga, e também, devido a sua participação direta na produção de diversos metabólitos biotecnológicos. O gênero *Aspergillus* é considerado um produtor de metabólitos secundários, estudado em diferentes processos biotecnológicos. Os resíduos agroindustriais apresentam uma grande quantidade de micro e macronutrientes que podem ser utilizados na formulação de meios de fermentação, pois podem reduzir os custos dos processos de produção. O ácido cítrico é um composto orgânico produzido por micro-organismos e utilizado em diversos processos industriais. Os estudos de seleção de amostras de *Aspergillus* isoladas da Caatinga de Pernambuco em meio sólido para determinação da melhor amostra produtora de ácido cítrico, variando os valores de pH e temperatura, durante 144 horas, em triplicata, com acompanhamento diário durante 24 h. Em seguida, a melhor amostra foi submetida ao processo de fermentação submersa, durante 144 h, 180 rpm e 37° C. Após os ensaios de produção em fermentação submersa, foram testados resíduos agroindustriais através da formulação de meios e da utilização de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> realizados com as mesmas condições do meio controle. As amostras coletadas a cada 24 h foram submetidas a determinação da curva de crescimento, variação do pH e determinação da concentração de ácido cítrico por método químico e por potenciometria produzidos nos meios controle e alternativos. Os resultados obtidos evidenciam que a amostra denominada de UCP1357 apresentou os maiores halos característicos de ácido cítrico, 8,0 cm, pH 8,5 e temperatura de 37°C. A produção de ácido cítrico através de fermentação submersa demonstrou que o meio denominado “meio 2” que apresentou maior quantificação de ácido cítrico produzido, no período de 144 horas uma quantidade de 7,22g/L. Após a identificação do melhor micro-organismo e meio, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> utilizando resíduos de abacaxi, acerola, laranja e limão para produção de ácido cítrico nas mesmas condições pré estabelecidas anteriormente. Os resultados obtidos detectaram uma grande interação entre os resíduos de laranja e limão, apresentando uma atividade de ácido cítrico de 15,29 g/L. A viabilidade em reaproveitar resíduos agroindustriais na formulação de meios de produção de metabólitos biotecnológicos de alto valor agregado, tem surgido como uma alternativa viável nas últimas décadas. Diversos meios alternativos têm sido elaborados e descritos em trabalhos científicos, e os resultados obtidos têm sido bastante satisfatórios.

**Palavras-Chave:** Ácido Orgânico; Caatinga; Potencial Biotecnológico, Fungos Filamentosos.

## ABSTRACT

Microbial biodiversity has shown a great evolution in the last decades, due to the isolation and identification of the microbiota from environments that have not yet been studied, such as the Caatinga, and also, due to its direct participation in the production of several biotechnological metabolites. The *Aspergillus* genus is considered a producer of secondary metabolites, studied in different biotechnological processes. Agro-industrial residues have a large amount of micro and macronutrients that can be used in the formulation of fermentation media, as they can reduce the costs of production processes. Citric acid is an organic compound produced by microorganisms and used in several industrial processes. The selection studies of *Aspergillus* samples isolated from the Caatinga of Pernambuco in solid medium to determine the best citric acid producing sample, varying the pH and temperature values, for 144 hours, in triplicate, with daily monitoring for 24 h. Then, the best sample was submitted to the submerged fermentation process, for 144 h, 180 rpm and 37 ° C. After the production tests in submerged fermentation, agro-industrial residues were tested through the formulation of means and the use of a factorial design 2<sup>3</sup> carried out under the same conditions as the control medium. The samples collected every 24 h were subjected to determination of the growth curve, pH variation and determination of the citric acid concentration by chemical method and potentiometry produced in the control and alternative media. The results obtained show that the sample called UCP1357 showed the largest characteristic halos of citric acid, 8.0 cm, pH 8.5 and temperature of 37 ° C. The production of citric acid through submerged fermentation showed that the medium called "medium 2" which presented the highest quantification of citric acid produced, in the period of 144 hours, an amount of 7.22g / L. After identifying the best microorganism and medium, a factorial design 2<sup>3</sup> was carried out using pineapple, acerola, orange and lemon residues for the production of citric acid under the same conditions previously established. The results obtained detected a great interaction between the orange and lemon residues, presenting a citric acid activity of 15.29 g / L. The feasibility of reusing agro-industrial residues in the formulation of means of production of biotechnological metabolites of high added value, has emerged as a viable alternative in recent decades. Several alternative means have been developed and described in scientific works, and the results obtained have been quite satisfactory

**Key words:** Organic Acid; Caatinga; Biotechnological Potencial, *Aspergillus*.

# **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A Caatinga nordestina é uma região que ocupa uma área de cerca de 850 mil km<sup>2</sup> (aproximadamente 12% do território nacional), compreendendo todos os Estados do Nordeste brasileiro e uma parte do Estado de Minas Gerais, apresentando um vasto bioma com inúmeras espécies da flora, da fauna e de diversos micro-organismos com um elevado potencial biotecnológico ainda pouco estudado ou mesmo desconhecido (COSTA et al, 2014, BARBOSA, 2019; SILVA SOBRINHO et al., 2019).

A biodiversidade microbiana existente em amostras de solo coletados nesse ambiente, considerado heterogêneo e de vasta população microbiana, não apresenta muitos estudos ainda realizados, principalmente enfatizando o potencial biotecnológico da microbiota existente, necessitando assim de estudos mais completos dessas comunidades microbianas, que apresentam uma impressionante diversidade genética, através da presença de espécies com elevado potencial biotecnológico, muitas vezes desconhecidas e descritas na literatura através de estudos taxonômicos (COSTA; RIBEIRO, 2019).

A utilização de diferentes gêneros de micro-organismos em processos biotecnológicos industriais e ambientais, têm sido uma das alternativas mais viáveis empregadas nos últimos anos, devido as inúmeras vantagens apresentadas, que vão de sua elevada capacidade fisiológica de reprodução, produção de diversas substâncias de elevado potencial biotecnológico em diferentes temperaturas, pH e meios de cultivo (RIORDON et al., 2019).

Para a produção de ácido cítrico são utilizados com frequência resíduos do processamento de frutas cítricas como substrato, tornando o processo mais rentável (ANGUMEENAL, VENKAPPAYYA, 2012), levando em conta que tais resíduos seriam descartados por terem perdido a utilidade para a indústria de polpas e sucos, mas ainda são ricos em diversos nutrientes essenciais (SILVA et al, 2012).

Resíduos de frutas cítricas, são considerados importantes economicamente, pois apresentam fontes nutritivas para os micro-organismos nos meios fermentativos, tais como o abacaxi, a acerola, a laranja e o limão, que são ricas em sólidos solúveis, como açúcares e vitaminas (B1, B2, B3 e C), possuem alto aproveitamento das polpas, sendo comercializadas como sucos, sorvetes, geleias, pedaços cristalizados, (no caso do abacaxi e da acerola), etc (SILVA et al., 2019).

Diversos tipos de substratos podem ser utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de ácido cítrico, tais como melaço de cana-de-açúcar, resíduos de frutas, manipueira, soro de queijo e de leite, soro de soja, etc (SUN et al., 2018).

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.

O ácido cítrico é um dos produtos obtidos por processos fermentativos mais produzidos no mundo (SAWANT, 2018), principalmente através da fermentação submersa, utilizando meios de produção convencionais, e também utilizando na sua formulação resíduos agroindustriais (MAGALHÃES et al., 2019). A utilização de substratos alternativos regionais e de baixo custo na formulação de meios de produção de diversos bioprodutos tem se tornado uma alternativa considerada viável e econômica (MARENDIA et al., 2019), pois os substratos agroindustriais na maioria das vezes apresentam grandes quantidades de nutrientes que poderiam ser reaproveitados, mas na maioria das vezes são descartados em ambientes pouco propícios ao seu descarte, e podem apresentar um custo relativamente baixo quando utilizados na formulação de meios de produção de diversos bioprodutos tecnológicos (SILVA et al., 2019).

No presente trabalho, foi realizada a produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas na Caatinga do Estado de Pernambuco, fazendo inicialmente uma seleção de amostras em meio sólido, em seguida foram utilizados substratos alternativos que atuaram como nutrientes nos processos de fermentação submersa através de planejamento fatorial.

## 2 . OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Realizar a produção e a caracterização de ácido cítrico utilizando amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco, através da formulação de meios de produção alternativos contendo substratos agroindustriais regionais.

### Objetivos Específicos

- Realizar um screening enzimático em meio sólido de produção de ácido cítrico com diferentes amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga pernambucana, variando o pH e a temperatura;
- Avaliar a produção do ácido cítrico em diferentes meios convencionais determinando à cinética de crescimento microbiano através de fermentação submersa;
- Investigar a utilização de diferentes substratos agroindustriais regionais provenientes de indústrias alimentícias na produção do ácido cítrico, através da formulação de meios alternativos utilizando planejamento fatorial  $2^3$ ;
- Investigar a influência do(s) substrato(s) selecionado(s), da temperatura, do pH e da velocidade de agitação na produção do ácido cítrico nos meios convencionais e alternativos;
- Produzir ácido cítrico a partir das melhor(es) condição(ões) obtidas nos experimentos realizados.

### 3 . REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Biotecnologia e a Produção de Compostos Bioativos

A Biotecnologia pode ser definida como o conjunto de técnicas que utilizam organismos como animais e plantas para auxiliar no desenvolvimento de processos ou produtos de interesse econômico ou social (FALEIRO, et al, 2011; GARCIA, 2013). Dentre as inúmeras técnicas que são aplicadas, estão a utilização de micro-organismos como biodegradadores de resíduos sólidos e líquidos, processos industriais como a produção de cachaças, vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres, desenvolvimento de plantas e animais a partir de melhoramentos genéticos e a produção de fármacos e biofungicidas (RIORDON et al., 2019).

A variedade e a quantidade de compostos de interesse industrial que podem ser excretadas pelos micro-organismos são consideradas inúmeras, e essas substâncias possuem um elevado potencial biotecnológico para os diversos setores industriais e/ou ambientais como pode ser observado na Tabela 1. Diversos estudos vem sendo realizados com a utilização de novos micro-organismos isolados para a produção de compostos biotecnológicos de alto valor agregado (ANGUMEENAL ,VENKAPPAYYA, 2013).

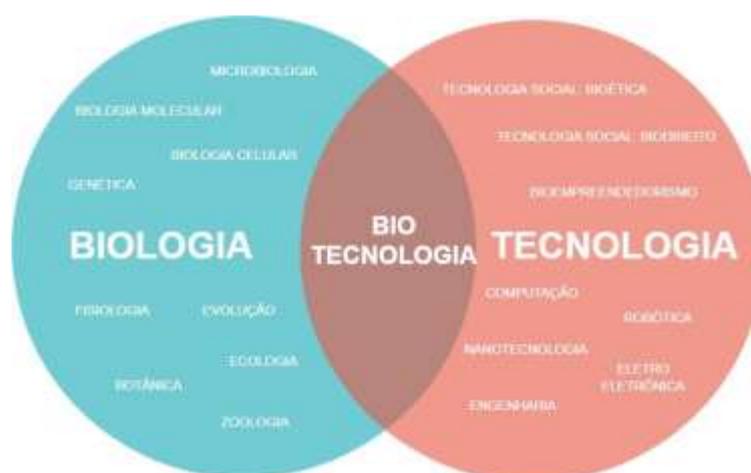
Tabela 1. Produtos gerados a partir de fermentação e seus respectivos micro-organismos produtores.

Produtos	Micro-organismos
Fermentação alcoólica	<i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>S. uvarum</i> ; <i>Acetobacter. aceti</i> ; <i>A. xyliinoide</i> ; <i>A. orleanense</i> ; <i>A. pasteurianus</i> .
Produção de logurtes	<i>Lactobacillus casei</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L.reuteri</i> ; <i>L.fermentum</i>
Síntese de $\beta$ -Caroteno	<i>Dunaliella bardawil</i>
Fungo Entomopatogênico	<i>Beauveria bassiana</i>
Degradação de Moléculas Químicas contidas em defensivos agrícolas	<i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Nocardia sp.</i> ; <i>Bacillus sp.</i> ; <i>Pseudomonas sp.</i>
Ácidos Orgânicos	<i>Aspergillus sp.</i> ; <i>Mucor piriformis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Biofertilizantes	<i>Bacillus thuringiense</i>

Fonte: Adaptado de RIORDON et al., 2019

A biotecnologia é considerada prioridade estratégica no Brasil desde 2003, e em 2007 foi criado o decreto N° 6.041 que estabeleceu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia e tem sido tratada como um dos dispositivos mais importantes para os processos fermentativos, visto que além de gerar novos produtos biotecnológicos, também pode ser utilizada para o tratamento de resíduos industriais e de locais contaminados, propiciando dessa forma, inúmeros benefícios para diferentes setores da sociedade, por se tratar de uma ciência multidisciplinar como pode ser observado na Figura 1 (RIORDON et al., 2019).

Figura 1. Diagrama demonstrando a diversidade de áreas de estudo abrangidas pela Biotecnologia.



Fonte: Wikipédia, 2016

Devido ao seu metabolismo secundário, e sua capacidade de excretar diversas substâncias bioativas de interesse tecnológico, a utilização das diversas classes de microorganismos, tem se destacado em inúmeras aplicações tecnológicas, principalmente em indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos, onde podemos destacar a produção de antibióticos, anticancerígenos, imunossupressores e agentes redutores de colesterol sanguíneo (CONTI et al, 2012); endotoxinas produzidas por bactérias que são utilizadas como inseticidas biológicos (MELO et al, 2013), além de diversas bebidas alcoólicas, biosurfactantes, bioemulsificantes, produtos cosméticos (RIORDON et al., 2019).

No Brasil, o incentivo a pesquisas envolvidas com a biotecnologia começou por volta da década de 1980, com a criação do Fundo Setorial de Biotecnologia que, de acordo com o Ministério da Ciência e Tecnologia, tem como foco “promover a formação e capacitação de recursos humanos, fortalecer a infraestrutura nacional de pesquisas e serviços de suporte, expandir a base de conhecimento da área, estimular a formação de empresas de base

biotecnológica e a transferência de tecnologias para empresas consolidadas, realizar estudos de prospecção e monitoramento do avanço do conhecimento no setor” (SILVA et al., 2019).

### 3.2. Produção de Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos, são caracterizados como compostos que resultam da atividade sintética de plantas e animais, porém distintos dos ácidos de decomposição como o ácido úrico. Considera-se quimicamente como ácido orgânico, todo ácido encontrado naturalmente em frutas e vegetais e que são usados pelas plantas em seus processos sintéticos, formando etéres e carboidratos. (SWAIN, RAY, PATRA, 2012; TAUKE, 2018)

Os ácidos orgânicos apresentam diversas aplicações industriais (Tabela 2), que vão desde indicadores de controles antissépticos e de temperatura, em processos de produção, aumentando o tempo de vida útil de prateleira em diversos produtos ou até mesmo proporcionando características sensoriais a variados tipos de alimentos (SERAFIM et al, 2011).

Tabela 2. Aplicações industriais dos ácidos orgânicos

<b>Indústrias</b>	<b>Aplicações</b>
Alimentícia	Acidulantes e antioxidantes (refrigerantes, sobremesas, conservas de frutas, geleias, doces e vinhos) e saborização artificial (refrescos em pó e alimentos gelatinosos)
Farmacêutica	Anticoagulante (transfusão sanguínea) e produtos efervescentes
Cosmética	Ajuste de pH (loções adstringentes) e como quelante em cremes de lavagem e fixadores de cabelo ou maquiagem
Química	Agente quelante em galvanoplastia, em curtumes e na reativação de poços de petróleo

Fonte: Autor (2019)

Dentre os ácidos orgânicos que são obtidos em maior escala a partir de processos fermentativos, podemos citar o ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido maléico, ácido succínico (Tabela 3) (BAUER et al., 2019).

Tabela 3. Ácidos orgânicos produzidos e suas respectivas fórmulas moleculares

Ácido	Fórmula Molecular
Lático	$C_3H_6O_3$
Fórmico	$CH_2O_2$
Acético	$C_2H_4O_2$
Oxálico	$C_2H_2O_4$
Maléico	$C_4H_4O_4$
Succínico	$C_4H_6O_4$
Benzóico	$C_7H_6O_2$
Gálico	$C_7H_6O_5$

Fonte: Autor (2019)

Na classificação estabelecida para os ácidos orgânicos, o grupo mais significativo são o que possuem um grupo carboxila (COOH) na extremidade da cadeia orgânica, ligado ao carbono da cadeia principal, este grupo funcional é formado por um carbono ligado a uma hidroxila (OH) por ligação simples e a um átomo de oxigênio (O) por dupla ligação, sendo por isso denominados de ácidos carboxílicos (BAUER et al., 2019). Estes ácidos apresentam diversas propriedades organolépticas, onde o cheiro e o sabor são as principais características e essas para realizar a sua classificação (LEONG; MAHMUD, 2018).

Os ácidos acético e fórmico, possuem um aroma intenso e extremamente desagradável, esta característica está associada aos ácidos que apresentam de quatro a oito átomos de carbono em sua cadeia carbônica principal (LEONG; MAHMUD, 2018). Contudo, quando utilizados em pequenas concentrações, os ácidos orgânicos podem exalar fragrâncias agradáveis, como aqueles presentes em alguns óleos essenciais voláteis (FIORUCCI et al, 2002, BAUER et al., 2019).

A descoberta da presença dos ácidos carboxílicos ocorreu a partir dos estudos do químico sueco Carl Wilhelm Scheele (1742-1786), um notável químico experimental sueco, desempenhou um papel primordial no desenvolvimento de experimentos químicos com compostos orgânicos de natureza ácida como pode ser observado na Tabela 4 (FIORUCCI et al, 2002, BAUER et al., 2019).

Tabela 4. Histórico de descoberta e/ou isolamento de alguns ácidos, pesquisadores responsáveis e fontes de isolamento

Ácido	Data da Descoberta	Pesquisador	Fonte de Isolamento
Fórmico	1500	H. Brunschwigg	Destilação por arraste de vapor de soluções contendo formigas
Benzóico	1556	M. Nostredame	Sublimação da goma de Benjoim
Succínico	1600	Oswald Croll	Sublimação do Âmbar
Tartárico	1770	C. W. Scheele	Do resíduo da fermentação do vinho
Pítrico	1771	Peter Woulfe	Do tratamento do índigo com ácido nítrico
Oxálico	1776	C. W. Scheele	Oxidação do açúcar com ácido nítrico
Lático	1780	C. W. Scheele	Fermentação do leite azedo
Úrico	1780	C. W. Scheele	Dos resíduos de urina
Málico	1785	C. W. Scheele	Extraído do suco de maçã
Gálico	1786	C. W. Scheele	Das nozes de Gala

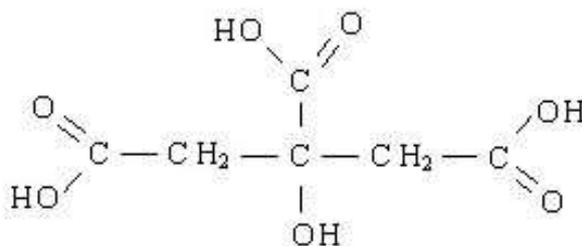
Fonte: Adaptado de <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=conceito.14>

### 3.3. Ácido Cítrico

O citrato de hidrogênio ou como é mais conhecido convencionalmente de ácido cítrico (AC), é um ácido orgânico tricarboxílico fraco, de fórmula molecular 2-hidroxi1,2,3,-propanotricarboxílico ou  $C_6H_8O_6$ , (Figura 2).

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

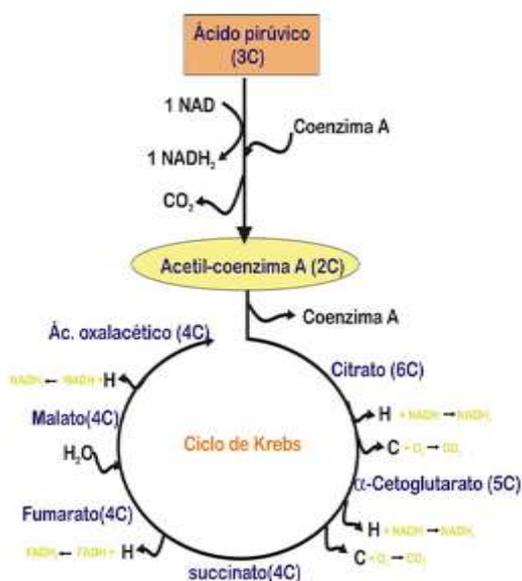
Figura 2. Forma estrutural do ácido cítrico



Fonte: Infoescola, 2010

Bioquimicamente, o ácido cítrico atua no ciclo de Krebs (também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou dos ácidos tricarboxílicos), sendo essencial para as reações químicas que ocorrem na vida celular e no seu metabolismo geral (SAWANT, 2018) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de Krebs ou ciclo do Ácido Cítrico



Fonte: Só Biologia, 2012

O ciclo de Krebs ocorre nos seres eucariontes, a nível mitocondrial, já nos seres procariontes, a nível citoplasmático (TONG et al., 2019). A oxidação da coenzima A ( $C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S$ ), é o principal propósito da realização desse ciclo, pois o tiol existente reage com as moléculas de ácidos carboxílicos, formando tioésteres, que irão atuar como

transportadores dos grupos acila, sendo responsáveis pelas reações de síntese e oxidação de ácidos graxos, através da descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico antes do ciclo de Krebs, gerando assim o acetil-CoA, CO<sub>2</sub> e Hidrogênio; ou seja, é uma rota que apresenta características catabólicas e anabólicas. Onde cada molécula de glicose metabolizada, originam-se duas moléculas de ATP, seis moléculas de NADH, duas de FADH<sub>2</sub> e quatro de CO<sub>2</sub>, a partir do ciclo de Krebs (RODRIGES, 2014).

O ácido cítrico apresenta diversas aplicações em inúmeras áreas industriais, como bebidas, fármacos, cosméticos e alimentos (Tabela 5) (MAGALHÃES et al., 2019)

Tabela 5. Aplicações do ácido cítrico

<b>Aplicações</b>	<b>Indústria</b>	<b>Função</b>
<b>Bebidas</b>	Vinhos e cidras	Previne escurecimento, previne turvação, usado no ajuste do pH.
	Refrigerantes e xaropes	Previne acidificação excessiva, estimula <i>flavour</i> natural de fruta, acidulante.
	Bebidas alcoólicas mistas	Agrega um sabor mais ácido, ajuda na clarificação e concede um maior tempo de prateleira.
<b>Alimentos</b>	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, agente acidificante e antioxidante.
	Frutas congeladas	Protege ácido ascórbico por inativação de metais pesados. Abaixa pH, inativa enzimas oxidativas.
	Óleos e gorduras	Sinérgico de outros antioxidantes, como sequestrante. Ação estabilizante.
	Alimento animal	Complemento alimentar.
<b>Agricultura</b>	Agroindústria	Avaliação de micronutrientes em fertilizantes. Aumenta disponibilidade de fósforo em plantas.
<b>Farmacêutica</b>	Produtos farmacêuticos	Efervescente, anticoagulante, promove rápida dissolução e acidulante
<b>Outros</b>	Cosméticos	Agente tamponante. Antioxidante como um quelante de íons metálicos.
	Aplicações industriais	Atua como agente tamponante e sequestrante de íons metálicos. Neutraliza bases. Utilizado em processos biodegradáveis não tóxicos e não corrosivos.

Fonte: Adaptado de Soccol et al, 2006; Sá, 2011; Sá Muniz, 2014.

Anualmente, mais de dois milhões de toneladas de ácido cítrico são produzidos a partir do processo de fermentação submersa, visto que a sua produção química, é considerada muito mais cara que a produção por via microbiológica, principalmente através da utilização de fungos filamentosos (OZDAL; KURBANOGLU, 2018).

O ácido cítrico foi o primeiro ácido isolado em 1784, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele, que o cristalizou a partir do suco do limão, contudo, somente em 1893, cientistas descobriram que uma espécie fúngica de *Citromyces* (atualmente denominada *Penicillium*) acumulava ácido cítrico em meios, contendo açúcar e sais orgânicos, porém, esse processo industrial não teve êxito em virtude do longo tempo de fermentação e dos grandes problemas de contaminação enfrentados durante a realização do processo (OZDAL; KURBANOGLU, 2018).

Em 1916, constatou-se que algumas amostras de *Aspergillus niger* excretavam grandes quantidades de ácido cítrico, quando eram isoladas em meios contendo alta concentração de açúcares, sais minerais, trabalhando numa escala de pH com valores de 2,5 a 3,5. Esse estudo, foi pioneiro para o sucesso da produção industrial desse ácido (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014) (Figura 4).

Figura 4. Ácido cítrico anidro comercial.



Fonte: Cozinha técnica, 2019

Uma das maiores aplicações industriais do ácido cítrico é na indústria alimentícia, sendo bastante empregado como acidulante, devido a sua baixa toxicidade e elevada solubilidade (RODRIGUES et al, 2013).

O ácido cítrico é um dos produtos obtidos através de processos fermentativos mais largamente utilizados mundialmente (MAX et al., 2010; DHILLON et al., 2011; ALI, HAQ, 2014; CIRIMINNA et al., 2017). Atualmente, o AC é produzido praticamente a partir da fermentação do fungo filamentoso *Aspergillus niger* (STEIGER et al., 2018). O ácido cítrico pode ser obtido de

duas maneiras: fermentação em estado sólido (superficial) ou por meio de fermentação submersa (PASTORE et al, 2011; SILVA, et al, 2012).

O processo realizado em uma escala industrial, ocorre em várias etapas, que vai desde a preparação do substrato de melaço, seguido pela fermentação aeróbia da sacarose pela ação do *A. niger*. A separação do AC do substrato, é realizado pela adição de hidróxido de cálcio ou cal apagada, gerando uma precipitação, e formando o citrato de cálcio. Após o aparecimento desses processos, é adicionado ácido sulfúrico para decompor o citrato de cálcio, eliminando assim as impurezas com carvão ativado ou resinas de troca iônica, até o processo de cristalização, secagem, desidratação e empacotamento do produto em colunas cromatográficas (SOCCOL et al, 2006, CARSANBA et al., 2019).

Existem diversos fatores químicos que influenciam diretamente na produção do ácido cítrico: as fontes de carbono, fósforo e nitrogênio, sais, presença de íons metálicos, pH, tempo e quantidade de inoculação, etc. (Tabela 6) (TONG et al., 2019).

Tabela 6. Fatores químicos que afetam diretamente a produção de ácido cítrico

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

Fonte: Adaptado de Soccol et al, 2006; Sá Muniz, 2014.

### 3.4. Micro-organismos Produtores de Ácido Cítrico

Ao longo dos anos um grande número de micro-organismos foi usado para a produção de ácido cítrico. A excreção de ácido cítrico é um fenômeno que pode ocorrer tanto em bactérias (*Bacillus licheniformis*, *Artrobacter paraffinens* e *Corynebacterium ssp.*), leveduras (*Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* e *Hansenula anomala*) e fungos (PEARCE, 2019).

Entretanto, mesmo com todos os tipos de micro-organismos sendo capazes de produzir o ácido cítrico, os fungos são os principais organismos empregados para a produção industrial em escala. As principais vantagens de sua utilização são a facilidade do controle de variáveis de processo, a habilidade de fermentar uma larga variedade de materiais de baixo custo e seus altos rendimentos (MAGALHÃES et al., 2019).

De acordo com Alexopoulos et al (1996), fungos são descritos como micro-organismos eucarióticos, produtores de esporos, aclorofilados, com nutrição por absorção, reprodução tanto de forma sexuada como assexuada, e cuja estrutura somática pode ramificar-se em filamentos denominados hifas (fungos filamentosos), e possuem parede celular.

Dentre os micro-organismos descritos na literatura como bons produtores de ácido cítrico, o gênero *Aspergillus* se destaca, principalmente a espécie *niger* é o mais utilizada, por conseguir uma maior conversão dos substratos do meio de produção em produto final, gerando também uma quantidade menor de produtos secundários durante a fermentação (MAGALHÃES et al., 2019).

Contudo, existem outras diversas espécies e gêneros com a capacidade de excretar ácidos orgânicos como o ácido cítrico. Os exemplos mais comuns são: *Aspergillus (clavatus, awamori, fonsecaeus, luchensis, urentti,saitoi, usami, fumaricus e phoenicius)* *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium (citrinum, luteum, janthinellum e restrictum)*, *Trichodema viride*, *Ustilina vulgaris*, *Botrytis sp.*, *Ascochyta sp.*, *Absidia sp.* e *Talaromyces sp.* (MALAGONI, 2010, STEIGER et al., 2018).

As espécies que possuem a capacidade de expelir mais AC (com maior rendimento) são as que provocam um maior interesse na indústria, por reduzir o custo de produção em larga escala (Figura 5) destes bioativos, e, ao longo dos anos, o gênero *Aspergillus* tem-se mostrado como o maior produtor (PASTORE, et al, 2011, MAGALHÃES et al., 2019).

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

Figura 5. Biorreator na linha de produção da fabricação industrial de ácido cítrico



Fonte: Silver Double Inc., 2017

O *Aspergillus niger* possui uma grande vantagem em relação aos demais, já que possui a capacidade de crescer com facilidade e produzir em maior quantidade 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 (BEROVIC , LEGISA, 2007).

### 3.5. Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* se destaca a partir de estudos como o principal gênero produtor de ácido cítrico conhecido. Este gênero está enquadrado no filo *Ascomycota*, na ordem dos *Eurotiales* e família *Trichocomaceae* (PEARCE, 2019).

O filo *Ascomycota* é caracterizado por possuir um micélio septado, uma fase dicariótica no seu ciclo de vida, produção de ascósporos, conídios e, algumas vezes, com um complexo sistema de dispersão (MAGALHÃES et al., 2019). Este filo também apresenta dois tipos díspares de reprodução: assexuada, com esporos produzidos em diferentes períodos no mesmo micélio e sexuada, envolvendo a formação de ascos (células dicarióticas) e ascósporos (ALEXOPOULOS et al, 1996).

Raper e Fennel (1965) categorizaram o gênero *Aspergillus* em grupos baseados na cor dos conidiosporos. Aqueles *Aspergilli* que possuíam esporos com colorações entre o marrom e o preto passaram a constituir a sessão *nigra*. Embora os membros deste grupo variem de diversas formas, apenas alguns possuem características tão únicas e singulares que podem ser

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

facilmente classificados em diversas espécies, como por exemplo o *A. carbonarius*, *A. ficuum*, *A. phoenicis*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* e *A. aculeatus*.

Na prática, este grupo de espécies é frequentemente chamado de *A. niger*, contudo, as pequenas diferenças entre os membros deste grupo, foram a principal razão para que Al-Musallam classificasse as diversas variedades de *A. niger* em 1980 (SCHUSTER et al., 2002).

A partir do surgimento do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) nos estudos taxonômicos do gênero *Aspergillus*, Kusters-van Someren et al. (1991) analisaram os padrões na distribuição ribossômica de cepas no grupo *A. niger* e propuseram uma nova classificação para o grupo, reduzindo o número de espécies de 13 (Raper e Fennel 1965) a 6: *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* e *A. tubingensis* (SCHUSTER et al., 2002).

O esquema mais utilizado para a classificação do gênero *Aspergillus* foi sugerido por Gams et al. (1985), em que todas as espécies que possuem conídios de marrom escuro para preto foram adicionados à sessão *nigra*. Sua proposta foi aceita e publicada na Comissão Internacional sobre *Penicillium* e *Aspergillus* (Samson 1992).

Os fungos do gênero *Aspergillus*, em especial o *Aspergillus* da sessão *nigra* (Figura 6), fazem parte de um grupo extremamente importante para a micologia de alimentos, micologia médica e biotecnologia (PERRONE et al, 2013), estes fungos podem se associar com facilidade a leveduras e bactérias, em fermentações mistas na indústria de alimentos e bebidas em todo o mundo, particularmente na Ásia (MOSS, 2002).

Figura 6. Microscopia de *Aspergillus niger*



Fonte: Autor, 2019

O *Aspergillus niger* é objeto de pesquisa e uso industrial há várias décadas. Adquiriu maior importância e maior utilização a partir de 1919, quando sua capacidade de produzir ácido cítrico foi explorada industrialmente (PERRONE et al, 2013).

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

Além do ácido cítrico, o *A. niger* é um excelente produtor de enzimas. As primeiras produções enzimáticas da espécie foram de pectinase, protease e amiloglucosidase, trabalho desenvolvido por Frost e Moss em 1987 originalmente produzido em cultura de superfície. Após 1950, a tecnologia de produção de bioativos passou a mudar gradualmente da cultura de superfície para processos de tanque agitado (MAGALHÃES et al., 2019).

### 3.6. Processos Fermentativos

Os processos fermentativos possuem uma importância fundamental para as indústrias tecnológicas, principalmente a química e a farmacêutica, sendo indispensáveis para o desenvolvimento de produtos, como etanol, ácidos orgânicos (cítrico, láctico, acético, etc.), solventes (acetona, butanol, etc.), enzimas (lipases, amilases, proteases, etc.), vitaminas e antibióticos, sendo produzidos a partir de processos fermentativos tanto submerso (FSm) quanto fermentação em meio sólido (FMS) (JABIÓŃSKA-RYŚ et al., 2019).

Para a produção de qualquer um destes bioativos, são selecionados os micro-organismos e os meios de cultura, sendo estes indispensáveis para o sucesso de qualquer fermentação (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Nos dias atuais, a produção industrial do AC é quase que em sua totalidade realizada a partir da fermentação submersa por fungos filamentosos amorfos (PEARCE, 2019). Para produção do AC através de Fermentação em Estado Sólido (Figura 7), é adicionado ao meio de produção, um agente solidificante (normalmente o ágar gel), fazendo com que os micro-organismos cresçam em um meio com praticamente nenhuma quantidade de água livre (RIORDON et al., 2019).

Figura 7. Meios de produção sólidos de AC



Fonte: Autor, 2018

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

Já nos processos envolvendo a fermentação submersa, os nutrientes presentes nos meios de produção, são disponibilizados para que o micro-organismo possa crescer e produzir o metabólito desejado em um meio líquido (Figura 8), que é acrescido de nutrientes (peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons)), com agitação constante para existir uma aeração e conseqüente disponibilidade de nutrientes (FERNANDES et al., 2007; FARINAS et al., 2011).

Figura 8. Meios de produção líquidos de AC



Fonte: Autor, 2019

Para a elaboração de um meio de cultura, se faz necessário o cálculo exato das fontes de Carbono e Nitrogênio, para que o meio contenha as condições ideais para o crescimento microbiano e produção dos metabólitos bioativos desejados (MAGALHÃES et al., 2019).

São consideradas excelentes fontes de Nitrogênio nos meios de produção, aquelas que influenciam o crescimento do *A. niger* e uma boa produção do AC, a mais utilizadas são o sulfato de amônio (que prolonga o crescimento vegetativo dos fungos) e  $\text{KNO}_3$  e o  $\text{NaNO}_3$  que estimulam o crescimento de *A. niger* (PASTORE et al, 2011; MALAGONI, 2010). Outro aspecto que contribui para um aumento na produção de ácido cítrico, é a incorporação de outros nutrientes, como fósforo, enxofre e outros elementos (STEIGER et al., 2018).

Com relação a utilização de fontes de Carbono, pode-se observar que em concentrações baixas, durante o processo fermentativo a quantidade de ácido oxálico formado aumenta consideravelmente, enquanto em altas concentrações, apresenta dificuldade na extração do AC, tornando assim economicamente inviável o processo de extração (MALAGONI, 2010).

### 3.7. Resíduos Agroindustriais

A agroindústria consiste em uma série de atividades que estão relacionadas com a transformação de matérias-primas oriundas de setores como a agricultura, pecuária, aquicultura ou silvicultura, as quais visam ao fornecimento de insumos para o consumidor (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.

O reaproveitamento dessas partes, que seriam descartadas, em processos, de produção de compostos bioativos em larga escala, poderiam apresentar bons aspectos ambiental quanto econômico, do lado ambiental não haveria descarte inadequado, e do lado econômico, esses resíduos poderiam ser reaproveitados na formulação de meios de produção, uma vez que apresentam ainda elevadas quantidades de nutrientes, que poderiam ser biotransformadas pela ação microbiana em metabólitos de alto valor agregado (MARENDA et al., 2019).

Estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) indicam que 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são perdidos no planeta a cada ano, representando cerca de 30% do total produzido (SILVA et al., 2019). Grande parte da população mundial ainda não apresenta a preocupação em tentar utilizar todas as partes que compõem os alimentos (folhas, talos, cascas e sementes), utilizando apenas a parte nobre dos mesmos, mesmo sabendo que a maior parcela nutricional destes alimentos, está concentrada nas partes que são rejeitadas (ROCHA et al, 2008; SUN et al., 2018).

Em diversas frutas utilizadas para consumo, ocorre um grande desperdício, pois ao desprezar as cascas, causam uma perda de uma grande porcentagem útil dos alimentos. Frutas como o abacate (31%), abacaxi (24%), banana (40%), laranja (22%), manga (27%) e morango (39%) (STORCK, et al, 2013).

Todos os resíduos são descartados na maioria das vezes, sem qualquer preocupação de dano ambiental que possa ser causado (Figura 9). Dessa maneira, o material descartado se transforma em algo que precisa ser disposto ou destruído, sem causar grandes impactos ao meio ambiente. Dentre as alternativas propostas, faz-se necessário sempre definir que são rejeitos e resíduos (SUN et al., 2018).

Figura 9. Descarte de Resíduos Agroindustriais.



Fonte: G1, 2012

O rejeito consiste na parte inaproveitável dos resíduos, restando apenas a sua disposição final a qual compreende sua inativação, neutralização, descontaminação ou desintoxicação. Já resíduo, se apresenta um composto que fez parte de um processo produtivo ou não, e que eventualmente não está sendo aproveitado, mas que apresenta ainda uma utilização em potencial, devido a grande quantidade de nutrientes que acumula. Por outro lado, é considerado como um produto de pouca serventia, que necessita apenas ser disposto de uma maneira atóxica, não poluente e, se possível, que não seja notado pelas atuais e futuras gerações, já os rejeitos, consistem na parte inaproveitável dos resíduos, restando apenas a sua disposição final (GONÇALVES; SARTORI; LEÃO, 2009).

Os resíduos resultantes das atividades agroindustriais são gerados através do processamento de couro, fibras, alimentos, madeira, produção de açúcar e álcool, etc. Sua produção é geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (MATOS, 2005). O tipo e quantidade desses resíduos agroindustriais produzidos são variáveis com o tempo (MATOS, 2014).

O Estado de Pernambuco vem se firmando como um grande núcleo produtor de alimentos, bebidas e confecções industriais. Nos últimos anos, um grande número empresas se instalaram e estão em fase de implantação, proporcionando assim um grande movimento de interiorização com a implantação de diversos setores industriais no interior do Estado. Devido a este fato, a quantidade de resíduos e rejeitos agroindustriais do estado aumenta a cada dia (MEDEIROS; SILVA, 2003; G1, 2012; MARENDA et al., 2019).

Resíduos de naturezas diversas têm sido utilizados como substratos para a produção do ácido cítrico, tais como melaço de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, resíduos de frutas, como manipueira (LEONEL, CEREDA, 1995, ARAÚJO, 2019), 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, dependendo do tipo de fermentação utilizada.

A produção de ácido cítrico são utilizados resíduos do processamento de frutas cítricas como substrato, tornando o processo mais rentável (ANGUMEENAL, VENKAPPAYYA, 2012), uma vez 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 formulação de meio fermentativo, as cascas de acerola e o abacaxi, são ricas em sólidos solúveis, como açúcares e vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e C), possuem alto aproveitamento da polpa, e são comercializadas sob diversas formas, tais como sucos, sorvetes, assim como em pedaços cristalizados, etc (LEONEL, CEREDA, 1995, ARAÚJO, 2019).

### 3.8. Frutas Cítricas

Segundo a EMBRAPA em 2018, o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor mundial de frutas e hortaliças e possuindo 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.

Algumas das plantações destas frutas estão localizadas na Região Nordeste, como a acerola (*Malpighia glabra* e *Malpighia emarginata*) e o abacaxi (*Ananas comosus*). Outros exemplos, localizados na Região Sudeste, são a laranja (*Citrus aurantium*) e o limão (*Citrus limonum*) (MACIEL et al, 2009; FERREIRA et al, 2012; NUNES et al, 2012; PEREIRA et al, 2013; OLIVEIRA-JUNIOR et al, 2014).

O plantio de frutas cítricas teve seu início no Brasil durante a época do Brasil Colônia (no período de 1530 e 1540), e desde então passou a ser parte dos hábitos alimentares dos brasileiros. Contudo, o país só assumiu uma posição de destaque no mercado mundial a partir de 1980 (USP, 2004; COUTO, CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

As frutas cítricas (Figura 10) apresentam em sua composição diversas substâncias que trazem vários benefícios para a saúde humana. Dentre estas vantagens: atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, e a capacidade de reduzir os radicais livres. Essas substâncias são o ácido ascórbico (vitamina C), os flavonóides, 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).

Figura 10. Frutas cítricas produzidas no Nordeste brasileiro (abacaxi, acerola, kiwi, laranja, limão e morango).



Fonte: <https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/editorias/verso/conheca-os-beneficios-e-o-poder-de-cinco-frutas-citricas-1.2096873>

A capacidade antioxidante e o valor nutricional (características ligadas principalmente a quantidade de ácido ascórbico e de compostos fenólicos), variam de acordo com a composição dessas substâncias encontradas nas frutas (CHEN et al., 2019).

O conhecimento a respeito das propriedades físico-químicas, estruturais, orgânicas e composição nutricional das frutas nativas é de grande importância, visto que somente desta maneira é possível se determinar as melhores aplicações para as mesmas (MELO, SELEGUINI, VELOSO, 2013).

### 3.8.1. Abacaxi

O Abacaxi (*Ananas comosus*) é uma fruta exótica típica de países tropicais e subtropicais, não se adaptando a regiões de clima frio; pertence à família *Bromeliaceae* (SILVA et al., 2019). É um dos mais importantes exemplos do setor internacional de frutas, com uma crescente

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

produção de 4 milhões de toneladas em 1960 para 16 milhões de toneladas em 2005 (LUN, WAI, LING, 2014, GOMES et al., 2018).

Quando maduro, o abacaxi possui um sabor muito ácido e adocicado além de ser extremamente rica nas vitaminas B1, B6, C, ferro, fibras e magnésio. Além da polpa, as cascas e o miolo do abacaxi podem ser utilizados para a produção de sucos, cremes, geleias, etc (CASTRO et al, 2014).

O abacaxi (Figura 11) 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).

Figura 11. Plantação de Abacaxis do estado da Paraíba



Fonte: EMBRAPA, 2013

O melhor período de colheita compreende os meses de dezembro a janeiro. O abacaxizeiro é uma planta que atinge um metro de altura, já era cultivada pelos indígenas antes mesmo do descobrimento do país (EMBRAPA, 2013).

No Brasil, diversas espécies desta fruta são cultivadas, porém, a variedade “pérola” é a que possui maiores colheitas. Esta espécie possui uma polpa amarelo-pálida, sabor bastante doce, casca esverdeada, mesmo quando maduro e pouca acidez (ASSUMPÇÃO et al, 2013; CASTRO et al, 2014). Os principais países produtores de abacaxi são os Estados Unidos, o Brasil, a Malásia, Formosa, México e as Filipinas (GOMES et al., 2018).

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.

### 3.8.2. Acerola

Os frutos da acerola (*Malpighia glabra* ou *Malpighia emarginata*) possuem superfície lisa ou dividida em três gomos, com tamanhos variados de 3 a 6 cm de diâmetro (figura 12). A acerola pertence à família *Malpighaceae*, que possui por volta de 63 gêneros e 850 espécies, das quais cerca de 30 espécies pertencem ao gênero *Malpighia* (PEREIRA et al, 2013). A coloração destes frutos pode variar do alaranjado ao vermelho intenso e quando maduros e apresentam polpa carnosa e suculenta (ARAÚJO et al, 2013).

Figura 12. Aceroleira apresentando acerolas maduras (*Malpighia glabra*) de coloração vermelho intenso.



Fonte: EMBRAPA, 2014

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, por volta da década de 1950, a partir de sementes trazidas de Porto Rico, vindo a adquirir, posteriormente, importância mundial (ARAÚJO

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

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).

Essa fruta é considerada uma fonte natural de vitamina C e possui, além de compostos antioxidantes, carotenoides e fitoquímicos, como flavonoides (antocianinas), 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. O Brasil, foi instituído que a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina C para adultos é de 60mg (BRASIL, 1998; ARAÚJO et al, 2013).

De modo geral, as frutas tropicais, como acerola e pitanga, são bastante frágeis em termos de conservabilidade, chegando ao apodrecimento 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* (ARAÚJO et al, 2013)..

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 (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2019)

### **3.8.3. Laranja**

O fruto da laranja (*Citrus maxima*, *Citrus reticulata* e *Citrus aurantium*) (figura 13), origina-se de uma árvore pertencente a família *Rutaceae*, sendo um fruto híbrido, através da mistura dos genes da tangerina com a cimboa, que pesquisadores acreditam ter tido origem na Idade Antiga.

Figura 13. Laranjal situado na cidade de Bom Conselho em Pernambuco



Fonte: <http://agazetadigital.blogspot.com/2019/02/o-vento-no-laranjal-brasileiro.html>

Estes frutos possuem características como uma casca rígida, porém maleável, de coloração alaranjada, quando madura ou, em algumas espécies, de cor verde e possui um sabor que pode variar do doce para o levemente azedo. Este fruto possui aproximadamente 40 calorias a cada 100 gramas e é um fruto extremamente rico em sais minerais como ferro, cálcio e fósforo, mas acima de tudo, possui uma alta concentração de vitaminas, principalmente a vitamina C (GRIEBELER; CALGARO JUNIOR; KLEIN, 2019).

Nos dias atuais o Brasil é considerado o maior produtor de laranjas do mundo, representando um total de 81,5% do comércio mundial de produção do suco da fruta (COELHO et al., 2019). Na safra 2018/2019, os embarques representaram um total de 1,23 milhões de toneladas de suco de laranja concentrado, de acordo com a Citrus Brasil o desempenho foi cerca de 33% superior a safra 2017/2018. (GRIEBELER; CALGARO JUNIOR; KLEIN, 2019).

Em março de 2018, ocorreu na cidade de São Paulo o 1º Simpósio Internacional de Compostos Bioativos de Citrus e Benefícios à Saúde, debatendo a utilização, consumo e exportação de cada uma das frutas cítricas produzidas em nosso país, demonstrando com diversos estudos que a laranja é responsável por um terço do consumo total de frutas cítricas do Brasil (COELHO et al., 2019).

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 as mais ricas em vitamina C e em antioxidantes do que as tangerinas.

### 3.8.4. Limão

O limão (*Citrus limonum*) é fruto de uma árvore originária da região sudeste da Ásia, da família das rutáceas. Ao contrário de outras variedades cítricas, o limoeiro (Figura 14) produz frutos de forma contínua, o fruto é caracterizado com uma casca geralmente fina, com superfície lisa, composta de duas frações distintas: o flavedo ou epicarpo e o albedo ou mesocarpo, facilmente separáveis da polpa, que corresponde à fração comestível do fruto. Possui também a peculiaridade de ser consumida verde e o seu gosto pode variar entre o levemente doce para o extremamente azedo de acordo com o tipo de limão (SEBRAE, 2017).

Figura 14. Plantação de Limões em Monte Alegre Paraná



Fonte: <https://g1.globo.com/pa/santarem-regiao/noticia/2019/07/19/apoio-tecnico-melhora-producao-do-limao-taiti-em-monte-alegre-no-pa.ghtml>

Este fruto possui aproximadamente 30 calorias a cada 100 gramas e é um fruto extremamente rico em sais minerais como ferro, cálcio e fósforo, mas acima de tudo, possui uma alta concentração de vitaminas, principalmente a vitamina C (KLEIN, 2019).

O peso médio do fruto do limão é de 170 g. O suco das vesículas representa cerca de 45% a 50% do peso do fruto. Apresenta teor de ácido ascórbico (vitamina C) entre 20 e 40 mg/100 ml (SILVA; BERNARDI; LIMA, 2019).

As espécies de limão mais consumidas no Brasil são a *Citrus latifolia* (limão-taiti), *Citrus aurantiifolia* (limão-galego) e a *Citrus limonia* (limão-cravo) (SEBRAE, 2017). O Brasil é considerado um dos maiores produtores de limão do mundo, na safra 2017/2018, os embarques representaram um total de 1.292.798 toneladas de limões, de acordo com a Citrus Brasil o desempenho foi cerca de 22% superior a safra 2016/2017).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYE, A.O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E.B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 568-574, 2015.

ADRIO, J. L., DEMAÏN, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, n.4, v.1, p. 117-139, 2014.

AKRAM, M.. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. **Cell Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.475-478, 26 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>.

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

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.

ANDRADE, V., et al. **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.

ARAÚJO, R. C. C. **PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA REGIÃO DE CARAJÁS- PA**. 2019. 33 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Carajás, 2019.

ASHOUR, A.; et al 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.; et al 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.

BARBOSA, T. M. **Sarcophagidae (Diptera) No Bioma Caatinga: Revisão Taxonômica Do Subgênero Titanogrypa (Cucullomyia) E Avaliação Do Potencial De Espécies Como Bioindicadoras De Conservação Ambiental**. 2019. 166 f. Tese (Doutorado) -

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Várzea, 2019.

BAUER, A. E. et al. A preparative method for the isolation and fractionation of dissolved organic acids from bitumen-influenced waters. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 671, p.587-597, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.244>.

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.

BINOD, P, et al., Industrial enzymes - present status and future perspectives for India, **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.72, p.271-286, 2013. 4

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](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3922ed804aaa75899e68de4600696f00/Portaria_SVS_MS_33_de_janeiro_de_1998.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 20 mai. 2018.

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. 2018.

BRAZ, M. R. S.; et al 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.

BUNGE, J., WILLIS, A., WALSH, F. Estimating the number of species in microbial diversity studies. **Annual Review of statistics and its application**, v.1, p. 427-445, 2014.

BROWN, S. H. et al. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 20, p.8903-8912, 8 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5132-2>.

CAATINGA BIOLOGIA. **Tudo Sobre a Caatinga**. São Paulo: Caatinga Biologia, 2012. Disponível em: <<http://caatingabiologia.blogspot.com/p/solo.html>>. Acesso em: 14 maio 2018.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

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.

CARSANBA, E. et al. Screening various *Yarrowia lipolytica* strains for citric acid production. **Yeast**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.319-327, maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3389>.

CARVALHO, S. A.; LIMA, et al. Coeficiente de distribuição do inseticida Tiametoxam na fração mineral de solos sob efeito de ácidos orgânicos mono, di e tricarbóxicos. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1323-1331, 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, 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.; et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa – Parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n.18, p. 70-76, 2005.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, 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.

CHEN, J. et al. Inhibition of Key Citrus Postharvest Fungal Strains by Plant Extracts In Vitro and In Vivo: A Review. **Plants**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.1-19, 22 jan. 2019.

CIRIMINNA, R; et al. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v.11, n. 22, p. 2-9, 2017.

COELHO, B. E. S. et al. Atributos físico-químicos de frutos de laranja 'Pêra' produzidos sob sistemas de cultivo orgânico e convencional. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.128-137, 25 abr. 2019.

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

COSTA, P. A.; et al. 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.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

COSTA, A. P. T. P. B.; RIBEIRO, A. M. V. B. Importância do Estudo da caatinga nas Escolas Públicas situadas em regiões de predomínio desse Bioma. **Id On Line: Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, Cariri, v. 13, n. 45, p.1043-1058, 2019.

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.; et al. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 562943, 2009.

DHILLON, G.S. et al., 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.

DEAN, S. N. et al. Machine Learning Techniques for Chemical Identification Using Cyclic Square Wave Voltammetry. **Sensors**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.2392-2407, 25 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s19102392>.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Abacaxis da Embrapa chegam ao mercado: BRS Imperial, BRS Ajubá e BRS Vitória. 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: 12 out. 2019.

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: 12 out. 2019.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Interesse por pesquisa com biomassa atrai grupo alemão a São Carlos. **Embrapa**, São Paulo. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1724562/interesse-por-pesquisa-com-biomassa-atrai-grupo-alemao-a-sao-carlos>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

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.; et al. 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.; et al. 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.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

FERREIRA, A. E.; et al. 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.

FILIZOLA, B. C.; SAMPAIO, M. B. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas. **Brasília: Instituto; Sociedade, População e Natureza**; 2015. ISBN 978-85-63288-17-2

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Aplicações do Ácido Cítrico na Indústria de Alimentos. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, v. , n. 30, p.96-103, jun. 2014. Disponível em: <<http://revista-fi.com.br/revista/64/#p=1>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

FOGAÇA, J. R. V. Eletroquímica. Goiânia: **Mundo Educação**, 2017. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/eletroquimica.htm>>. Acesso em: 23 maio 2017.

FOSTER, J. W. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York, 1949; FINN, D. et al., Microbial energy and matter transformation in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 111, p.176-192, 2017.

GARCIA, A. C. **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.

GOMES, J. S. et al. Caracterização físico-química de blends composto por abacaxi, cenoura e couve, adoçado com mel. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 1, p.7-12, jul. 2018.

GONÇALVES, J. E.; SARTORI, M. M. P.; LEÃO, A. L. Energia de briquetes produzidos com rejeitos de resíduos sólidos urbanos e madeira de *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande Pb, v. 5, n. 13, p.657-661, 13 jan. 2009.

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.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

GRIEBELER, I. R.; CALGARO JUNIOR, R. V.; KLEIN, C. Processamento Mínimo De Laranjas Em Diferentes Cortes. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc São Miguel do Oeste**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.1-8, jul. 2019.

GUILHERMINO, M. M. et al. Defeso da Caatinga: Proposta de Política Pública Para O Desenvolvimento Sustentável Da Agricultura Familiar Em Bioma Caatinga. **Revista Brasileira de Educação Ambiental**, [s.i.], v. 2, n. 14, p.372-387, set. 2019.

GUPTA, R. et al., Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p.15-20, 2014.

HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MADDOX, I. S.. The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus nig.* **Springer-verlag**, Palmerston North, p.1-5, 1984.

HUANG, X. et al. Cyclic Voltammetry in Lithium–Sulfur Batteries—Challenges and Opportunities. **Energy Technology**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.1-13, 10 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ente.201801001>.

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

JABŁOŃSKA-RYŚ, E. et al. Lactic Acid Fermentation of Edible Mushrooms: Tradition, Technology, Current State of Research. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.i.], v. 18, n. 3, p.655-669, 10 mar. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12425>.

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.

LEAL, I.R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 139-146, 2005.

LEHMANN, J. et al., Biochar effects on soil biota – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, n.9, p.1812-1836, 2011.

LEITÃO, V.F. et al., Biomass residues in Brazil: availability and potential uses, **Waste Biomass Valor**, v.1, p.65-76, 2010.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

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.

LEONG, V. H.; MAHMUD, H. B. A preliminary screening and characterization of suitable acids for sandstone matrix acidizing technique: a comprehensive review. **Journal Of Petroleum Exploration And Production Technology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.753-778, 11 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13202-018-0496-6>.

LI, A.; PFELZER, N.; et al. 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.

LIMA, N. D. et al. Powdered beverage mix with acerola pulp, whey and maltodextrin. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.578-583, set. 2019. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20190068>.

LIU, X. Y.; et al. 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.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L.. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. **Advances In Fungal Biotechnology For Industry, Agriculture, And Medicine**, [s.l.], p.307-340, 2004. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1_12).

MACIEL, M. I. S.; et al. Características sensoriais e físico-químicas de geleias mistas de manga e acerola. **B. Ceppa**, v. 27, n. 2, p. 247-256, 2009.

MAGALHÃES, N. et al. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.101-107, 25 abr. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522019167153>.

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.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

MARCELLINI, P. S.; et al. 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.

et

MARENDA, F. R. B. et al. Advances in Studies Using Vegetable Wastes to Obtain Pectic Substances: A Review. **Journal Of Polymers And The Environment**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.549-560, 17 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1355-8>.

MATOS, A. T. Curso Sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais. Viçosa: FEAM/UFV, 2005.

MATOS, A. T. Tratamento e Aproveitamento Agrícola de Resíduos Sólidos. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2014

MAX, B, et al., Biotechnological production of citric acid, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.862-875, 2010.

ME SALVA. **Ácido Cítrico**. São Paulo: Me Salva, 2018. Disponível em: <<https://www.mesalva.com/forum/t/acido-citrico-xd/3886>> Acesso em: 14 maio 2018.

MEDEIROS, D. D.; SILVA, G. C. S.. Análise do Gerenciamento Ambiental em Empresas do Estado de Pernambuco. In: ENCONTRO NAC. DE ENG. DE PRODUÇÃO, Não use números Romanos ou letras, use somente números Arábicos., 2003, Ouro Preto. **ENEGEP**. Ouro Preto: Enegep, 2003. p. 1 - 8.

MELO, A. L. A; et al. 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.

MESQUITA, M.; PINTO, T.; MOREIRA, R.. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.216-230, maio 2017. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20170028>.

MICRO WIKI. ***Aspergillus niger***. Rio de Janeiro: Micro Wiki, 2016. Disponível em: <[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus\\_niger](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_niger)> Acesso em: 14 maio 2018.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Caatinga**. São Paulo: Ministério Do Meio Ambiente, 2016. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/index.php/comunicacao/agencia-informma?view=blog&id=2096>>. Acesso em: 14 maio 2018.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.9-23, jun. 2009.

MORAIS, F. A.; et al. 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.

MOSS, M. O. Mycotoxin review - 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, [s.i.], v. 16, n. 03, p.116-119, ago. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s0269915x02003014>.

NANNIPIERI, P et al., Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, n.68, v.1, p.12-26, 2017.

NASCIMENTO, R. F. et al. Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt(II)–phthalocyanine modified carbon paste electrode. **Talanta**, [s.i.], v. 105, p.354-359, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.055>.

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-JUNIOR, R. G.; et al. Utilização de flavonoides no setor industrial farmacêutico: um estudo de prospecção tecnológica. **Revista Geintec**, v. 4, n. 2, p. 859-866, 2014.

OLIVEIRA, T. A.; et al. 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.

OSAKI, F. **Distribuição espacial de micro-organismos 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.

OZDAL, M. ; KURBANOGLU, E. B. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. **Waste And Biomass Valorization**, [s.i.], p.1-10, 15 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, [s.i.], v. 25, n. 3, p.244-263, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

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**, Toledo, v. 13, n. 3, p.149-159, dez. 2011.

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.

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.

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.

PEARCE, C. J. Review of New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and Applications New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.1051-1051, abr. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00211>.

PELEG, Y. et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.76-79, mar. 1988. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00250502>.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização De Resíduos Agro-Industriais Em Processos Biotecnológicos Como Perspectiva De Redução Do Impacto Ambiental. **Journal Of Technology Management & Innovation**, Franca, v. 2, n. 1, p.118-127, mar. 2007.

PEREIRA, C. T. M.; SILVA, et al. 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.; et al. *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.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Embrapa**, Fortaleza, p.1-5, ago. 2005.

Raper, K. B., and Fennell, D. I., 1965, **The Genus *Aspergillus***, Williams and Wilkins, Baltimore. 1-686.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

RIORDON, J. et al. Deep Learning with Microfluidics for Biotechnology. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.310-324, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.005>.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 92, p.394-404, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>.

ROCHA, S. A.; et al. 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, J. F. M. **Hipoglicémia – da bioquímica à clínica**. 2014. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2014.

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.; et al. 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, 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: 101007/s10658-013-0233-4.

RODRÍGUEZ-KESSLER, M.; GONZÁLEZ, M. L. L. G.; JIMENEZ, J. F.. Dimorphism and Pathogenicity of the Opportunistic Ascomycota *Candida albicans*. **Dimorphic Fungi: Their Importance As Models For Differentiation And Fungal Pathogenesis**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.35-45, 29 maio 2012. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <http://dx.doi.org/10.2174/978160805364311201010035>.

RÓZ, A. L. et al. **Grandes áreas da nanociência e suas aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=B9esCQAAQBAJ&pg=SA6-PA1&lpg=SA6PA1&dq=subdivisões+da+eletroquímica&source=bl&ots=gTYEDMWUGk&sig=FQNiW\\_kEimb5Bj0ifqSeM9BsnLU&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwj2urNoa3UAhXDUZAKH WQTBZAQ6AEIMjAC#v=onepag e&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=B9esCQAAQBAJ&pg=SA6-PA1&lpg=SA6PA1&dq=subdivisões+da+eletroquímica&source=bl&ots=gTYEDMWUGk&sig=FQNiW_kEimb5Bj0ifqSeM9BsnLU&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwj2urNoa3UAhXDUZAKH WQTBZAQ6AEIMjAC#v=onepag e&q&f=false)>. Acesso em: 25 maio 2019

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

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.; et al. Caracterização de briquetes obtidos com resíduos da agroindústria. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 3, p. 289-294, 2012.

SAWANT, O. Fungal Citric Acid Production Using Waste Materials: A Mini-Review. **Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.821-828, 1 out. 2018. Slovak University of Agriculture in Nitra. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.821-828>.

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.; et al. Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.

SCHUSTER, E., et al. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.59, p.426-435, 2002.

SHOW, P. L. et al. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers In Life Science**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.271-283, 20 abr. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>.

SILVA, C. M.; BERNARDI, J. H.; LIMA, J. C. X. **Produção de suco concentrado de limão**. 2019. 133 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal da Integração Latino-americana - Unila, Foz do Iguaçu, 2019.

SILVA, C. A. et al. Soil evaluation for pineapple cultivation (*ananás comosus*) in the municipality of Teotônio Vilela, Alagoas. **Brazilian Journal Of Development**, Teotônio Vilela, v. 5, n. 11, p.22826-22834, nov. 2019.

SILVA, G. K. C.; et al. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para a produção de ácido cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**. v. 8, n. 5, p. 1-6, 2012.

SILVA, J. F. et al. Reuse of polluting agroindustrial waste for ethanol production by *Kluveromyces marxianus*. **Journal Of Environmental Analysis And Progress**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.195-199, 17 jul. 2019. Journal of Environmental Analysis and Progress - JEAP. <http://dx.doi.org/10.24221/jeap.4.3.2019.2539.195-199>.

SILVA, M. B. et al. Produção E Qualidade De Acerola Com Biofertilizantes Líquidos Sob Cultivo Biodinâmico. **Revista Ouricuri**, Ouricuri, v. 2, n. 2, p.125-137, dez. 2012.

SILVA SOBRINHO, M. et al. Modelagem da Distribuição Potencial de *Mangifera indica* L. sob Cenários Climáticos Futuros no Bioma Caatinga. **Revista Brasileira de**

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

**Meteorologia**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.351-358, set. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-7786343052>.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.

SOCOL, C.R.; et al. **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.

STEIGER, M. G. et al. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. **Metabolic Engineering**, Vienna, v. 8, n. 8, p.1-29, 11 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>

STORCK, C. R.; et al. 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.

SUN, X. et al. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], p.1-10, 2 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1932-1>.

SWAIN, M. R., RAY, R. C., PATRA, J. K. Citric acid : microbial production and applications in food and pharmaceutical industries, **Nova Science Publishers, Inc.**, Chapter 4, pp 1-22, 2012.

TAUK, S. M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociências**, n.20, v.1-4, p.299-301, 2018.

TONG, Z. et al. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-15, 4 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1064-6>.

TORSVIK, V., OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v.5, n.1, p.240-245, 2002;

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

WANG, B. et al. Pellet-dispersion strategy to simplify the seed cultivation of *Aspergillus niger* and optimize citric acid production. **Springer-verlag**, Berlin, p.1-9, 29 ago. 2016.

YANG, L. et al. Enhanced succinic acid production in *Aspergillus saccharolyticus* by heterologous expression of fumarate reductase from *Trypanosoma brucei*. **Applied**

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

**Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.1799-1809, 31 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7086-z>.

YANG, L. ; LÜBECK, M. ; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.33-49, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>

YU, D. et al. Application of methanol and sweet potato vine hydrolysate as enhancers of citric acid production by *Aspergillus niger*. **Bioresources And Bioprocessing**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-13, 27 jul. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-017-0166-4>.

# CAPÍTULO II

## DETECÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM MEIO SÓLIDO COM AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS niger* ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

# Capítulo 11

## *Detecção de ácido cítrico em meio sólido com amostras de Aspergillus Niger isoladas da Caatinga de Pernambuco*

*Alexandre D'Lamare Maia de Medeiros*

*Cláudio José Galdino da Silva Júnior*

*Nathália Sá Alencar do Amaral Marques*

*Daylin Rubio-Ribeaux*

*Carlos Alberto Alves da Silva*

**Resumo:** A utilização dos micro-organismos em processos biotecnológicos industriais e ambientais têm sido uma das alternativas mais viáveis empregadas nos últimos anos, devido as inúmeras vantagens apresentadas, sua elevada capacidade fisiológica de reprodução e produção de diversas substâncias de elevado potencial biotecnológico em diferentes temperaturas, pH e meios de cultivo. A imensa diversidade de micro-organismos existentes em regiões pouco estudadas como a Caatinga do Estado de Pernambuco, justifica a intensificação de estudos biotecnológicos por novos produtores insumos biotecnológicos. O ácido cítrico é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, principalmente através da fermentação submersa, utilizando meios de produção a base de sacarose ou amido e também utilizando resíduos agroindustriais. Neste sentido, no presente trabalho foi realizado o screening da produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus niger*, isolados da Caatinga do Estado de Pernambuco. Foram utilizadas 4 amostras denominadas de UCP 1099, 1356, 1357 e 1463 utilizando como variáveis valores diferentes de temperatura (28, 37 e 42°C) e pH (5,5; 7,0 e 8,5). Os ensaios ocorreram durante 96 horas nas condições, com amostras em triplicata. Os resultados revelaram que todas as amostras testadas produziram o ácido cítrico nas condições testadas, porém o melhor resultado obtido foi o da amostra UCP 1357, no pH de 8,5 à 37°C, cujo halo obtido foi de 8,0 cm. Esses resultados evidenciam que a biodiversidade microbiana da Caatinga apresenta uma grande quantidade de micro-organismos ainda pouco estudados para produção de compostos bioativos.

**Palavras chave:** detecção ácidos orgânicos; potencial biotecnológico, fungos filamentosos

## INTRODUÇÃO

A Caatinga nordestina, ocupa uma área de aproximadamente 850 mil km<sup>2</sup> (por volta de 12% do território nacional). (FILIZOLA, SAMPAIO, 2015; MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017).

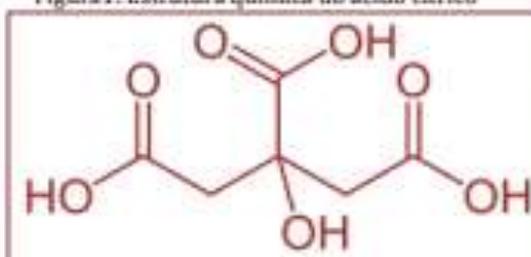
Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2016), a vegetação da Caatinga está entre os biomas brasileiros mais degradados pelo homem, o desmatamento já chega a 46% da área do bioma.

Esta biota, por ser a única que é exclusivamente brasileira, deve ser preservada e protegida. (EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2007; MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017). Este bioma apresenta uma imensa variedade de espécies da flora, da fauna e principalmente, diversos micro-organismos (MO's) pouco estudados e que podem conter um elevado potencial biotecnológico, porém ainda pouco estudados ou até mesmo desconhecidos (LEAL et al., 2005; NANNIPIERI et al., 2017).

A utilização desses MO's em processos biotecnológicos industriais e/ou ambientais, têm sido uma das alternativas mais viáveis empregadas nos últimos anos, devido as inúmeras vantagens apresentadas, sua elevada capacidade fisiológica de reprodução e produção de diversas substâncias de elevado potencial biotecnológico em diferentes temperaturas, pH e meios de cultivo (BINOD et al., 2013; ADRIO, DEMAIN, 2014).

O ácido cítrico (AC) (Figura 1), é um produto orgânico produzido por vias fermentativas ou sintéticas, também conhecido como Cítrato de Hidrogênio, é um ácido orgânico tricarbocílico fraco que possui a fórmula química  $C_6H_8O_7$  e é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, uma vez que apresenta propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes, sequestrantes e reguladoras de acidez. (MAX et al., 2010; DHILLON et al., 2011; ALI, HAQ, 2014; CHRIMINNA et al., 2017).

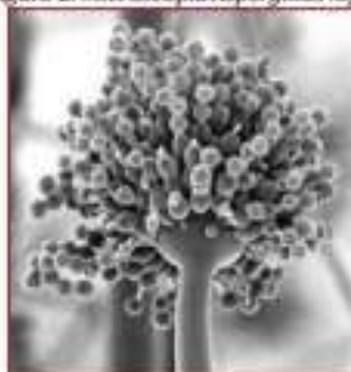
Figura 1: Estrutura química do ácido cítrico



Fonte: Me Salva (2018)

Em 1916, constatou-se que algumas linhagens de *Aspergillus niger* (Figura 2) excretavam grandes quantidades de ácido cítrico quando eram isoladas em meios com alta concentração de açúcar, sais minerais e pH de 2,5 a 3,5. Esse estudo foi a base para o sucesso da produção industrial desse ácido (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

Figura 2. Microscopia *Aspergillus niger*



Fonte: MicrobeWiki (2010)

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são de grande importância para a bioprodução de ácidos orgânicos, devido a sua grande habilidade de secretar grandes quantidades dos ácidos orgânicos desejados (YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017).

A habilidade deste gênero de naturalmente acumular grandes quantidades de ácidos orgânicos e utilizar uma grande variedade de fontes de carbono tem sido amplamente utilizada nos dias atuais (PELEG et al., 1988a; MAGNUSON AND LASURE, 2004; PAPAGIANNI, 2007; BROWN et al., 2013; YANG et al., 2016a,b; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017).

## 2.OBJETIVOS

Com o apoio das informações supracitadas, o presente trabalho tem como principal objetivo fazer uma seleção do melhor produtor de AC dentre quatro cepas isoladas da Caatinga Pernambucana, cedidas pelo Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco

## 3.MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados estudos de seleção de amostras de *A. niger* isoladas da Caatinga nordestina denominadas de UCP 1099, UCP 1356, UCP 1357 e UCP 1463 (figura 3), todas retiradas do Banco de Culturas da UNICAP para a detecção de ácido cítrico em meio sólido, utilizando diferentes valores de temperatura (28, 37 e 42°C) e pH (5,5; 7,0 e 8,5) durante 96 h.

Figura 3. Amostras de *Aspergillus niger* UCP 1099, 1356, 1357 e 1463



Fonte: Autor (2018)

Para a determinação em meio sólida, foi utilizado o meio de Foster-David (FOSTER, 1949) cuja composição é: 5g/L de glicose; 1g/L de peptona; 1g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g/L de MgSO<sub>4</sub>; 15g/L de Ágar e 65mL/L de solução de Verde de Bromocresol (indicador de acidez e basicidade) (0,5g Verde de Bromocresol em 7mL de NaOH 0,1 N). O pH final foi ajustado para 5,5; 7,0 e 8,5. O aparecimento de um halo amarelo brilhante evidencia a produção de ácido cítrico no meio testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os meios com diferentes valores de pH foram colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, onde após a solidificação do meio, foram feitos pequenos poços com diâmetros de 6 mm no centro de cada placa.

As suspensões esporícas foram preparadas com 10<sup>7</sup> esporos por mL e inoculadas nos poços de cada placa previamente preparada (Figura 3). As placas foram transferidas para diferentes temperaturas em estufas e observadas a cada 24 horas.

Figura 3: Placa com meio Foster-David



Fonte: Autor (2018)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de detecção do ácido cítrico nas amostras testadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Seleção de amostras para produção de ácido cítrico em diferentes valores de temperaturas e pH, Ensaios com 96 horas, halos expressos em centímetros (cm)

Amostras	pH	20°C	37°C	42°C
UCP 1099	5,5	3,9	6,5	1,2
	7,0	5,9	6,5	1,1
	8,5	4,7	6,5	1,0
UCP 1356	5,5	4,0	6,0	2,0
	7,0	2,0	5,5	1,5
	8,5	4,5	4,0	1,5
UCP 1357	5,5	4,5	6,0	1,5
	7,0	5,8	7,5	1,2
	8,5	4,5	8,0	1,3
UCP 1463	5,5	4,5	5,0	1,5
	7,0	5,0	5,0	1,5
	8,5	3,0	3,0	2,0

Fonte: Autor (2018)

Todas as amostras testadas em diferentes valores de pH demonstraram atividade, contudo, a melhor produção de ácido cítrico detectada foi na temperatura de 37°C, que revelou uma elevada produção de ácido cítrico nas diferentes condições testadas de pH e temperatura.

A amostra que apresentou o maior halo característico de todo o ensaio realizado foi a UCP 1357, com um halo de 8,0 cm no pH de 8,5 (Figura 4).

Figura 4: Placa UCP 1357, pH 8,5 e mantida à temperatura de 37°C



Fonte: Autor (2018)

Os valores obtidos estão de acordo com os valores descritos na literatura para produção de ácido cítrico em amostras testadas em meio sólido.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, verifica-se que a imensa biodiversidade do bioma Caatinga ainda pouco conhecida, revela possuir uma microbiota vasta e com elevado potencial biotecnológico para produção de substâncias bioativas de interesse industrial e/ou ambiental, levando a crer que a utilização destes micro-organismos pode ser tão eficaz quanto a de micro-organismos industrializados.

## AGRADECIMENTOS

FACEPE, CAPES e CNPq

## REFERÊNCIAS

- [1] Ali, S.; Haq, LU Process Optimization of citric acid production from *Aspergillus niger* using fuzzy logic design. Pak. J. Bot, v. 46, n. 3, p.1055-1059, 2014.
- [2] Adrio, J. L., Demain, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. Biomolecules, n.4, v.1, p. 117-139, 2014.
- [3] Binoš, P, et al, Industrial enzymes - present status and future perspectives for India, Journal of Scientific & Industrial Research, v.72, p.271-286, 2013. 4
- [4] Brown, S. H. et al. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. Applied Microbiology And Biotechnology, [s.l.], v. 97, n. 20, p.8903-8912, 8 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5132-2>.
- [5] Ciriminna, R; Meneguzzo, F; Delisi, R, Pagliaro, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. Chemistry Central Journal, v.11, n. 22, p. 2-9, 2017.
- [6] Dhillon, G.S. et al., 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.
- [7] Embrapa. Interesse por pesquisa com biomassa atrai grupo alemão a São Carlos. Embrapa, São Paulo. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1724562/interesse-por-pesquisa-com-biomassa-atrai-grupo-alemao-a-sao-carlos>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- [8] Filizola, B. C.; Sampaio, M. R. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascaes. Brasília: Instituto; Sociedade, População e Natureza; 2015. ISBN 978-85-63288-17-2
- [9] Foster, J. W. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York, 1949;
- [10] Food Ingredients Brasil. Aplicações do Ácido Cítrico na Indústria de Alimentos. Food Ingredients Brasil, São Paulo, v. , n. 30, p.96-103, jun. 2014. Disponível em: <<http://revista-5.com.br/revista/64/#p=1>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- [11] Leal, I.R. et al Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. Megadiversidade, v.1, n.1, p. 139-146, 2005.
- [12] Magnuson, J. K.; Lasuro, L. L. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. Advances In Fungal Biotechnology For Industry, Agriculture, And Medicine, [s.l.], p.307-340, 2004. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1_12).
- [13] Max, B, et al., Biotechnological production of citric acid, Brazilian Journal of Microbiology, v.41, p.862-875, 2010.
- [14] Me Salva. Ácido Cítrico. São Paulo: Me Salva, 2018. Disponível em: < <https://www.mesalva.com/forum/t/acido-citrico-od/3886>> Acesso em: 14 maio 2018.
- [15] Mesquita, M.; Pinto, T.; Moreira, R. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. Revista Fitos, [s.l.], v. 11, n. 2, p.216-230, maio 2017. GNI Genesis Network.
- [16] Micro Wiki. *Aspergillus niger*. Rio de Janeiro: Micro Wiki, 2016. Disponível em: <[https://microbiowiki.konyon.edu/index.php/Aspergillus\\_niger](https://microbiowiki.konyon.edu/index.php/Aspergillus_niger)> Acesso em: 14 maio 2018.
- [17] Ministério do Meio Ambiente. Caatinga. São Paulo: Ministério Do Meio Ambiente, 2016. Disponível em: < [http://www.mma.gov.br/index.php/comunicacao/agencia-informma?view=blog&id=20\\_96](http://www.mma.gov.br/index.php/comunicacao/agencia-informma?view=blog&id=20_96)>. Acesso em: 14 maio 2018.

- [18] Nannipieri, P et al. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, n.6 B, v.1, p.12-26, 2017.
- [19] Papagianni, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 25, n. 3, p.244-263, maio 2007, Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>.
- [20] Peleg, Y. et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 28, n. 1, p.76-79, mar. 1988. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00250502>.
- [21] Yang, L. et al. Enhanced succinic acid production in *Aspergillus saccharolyticus* by heterologous expression of fumarate reductase from *Trypanosoma brucei*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 100, n. 4, p.1799-1809, 31 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7086-z>.
- [22] Yang, L.; Lübeck, M.; Lübeck, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews*, [s.l.], v. 31, n. 1, p.33-49, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>

# CAPÍTULO III

## **PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *ASPERGILLUS spp.* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE PRODUÇÃO CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

## Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus spp.* Através de Fermentação Submersa Utilizando Diferentes Meios de Produção Contendo Resíduos Agroindustriais

Alexandre D’Lamare Maia de Medeiros<sup>a</sup>, Cláudio José Galdino da Silva Junior<sup>a</sup>, Carlos Alberto Alves da Silva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil. e-mail: alexandredlamare@gmail.com; claudiocjg@gmail.com.

<sup>b</sup> Núcleo de Pesquisas e Ciências Ambientais e Biotecnologia NPCIAMB - Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil., e-mail: carlos.alves@unicap.br.

### ARTICLE INFO

Received  
Accepted  
Published

### ABSTRACT

The production of secondary metabolites of high added value by micro-organisms has been extensively studied, mainly in the formulation of media containing agro-industrial residues. Citric acid is a tricarboxylic organic acid, obtained through submerged fermentation processes. The *Aspergillus* genus is considered an excellent producer of bioactive substances of industrial interest. Assays were carried out with four samples of *Aspergillus* isolated from Caatinga in three conventional media, for 144h, 37 °C, and 180rpm. The pH variation, sugar consumption and citric acid production were analyzed. The results showed that the medium-called two e and the sample UCP1357, presented a production of citric acid of 7.22g / L. Following the selection of the medium and the best producer microorganisms, production tests were carried out with media formulated with citrus fruit residues: pineapple, acerola, orange and lemon peels from food industries in the state of Pernambuco. The results revealed that all the residues produced citric acid, with the lemon peel being the best of the residues tested (6.91g / L). It appears that there is a possibility of using residues in the formulation of means of production, thus contributing to the reuse of the present nutrients and the reduction of the environmental impact.

**Keywords:** formulation of alternative media; biotechnological potential, filamentous fungi.

### RESUMO

A produção de metabólitos secundários de alto valor agregado por micro-organismos tendo sido bastante estudada, principalmente na formulação de meios contendo resíduos agroindustriais. O ácido cítrico é um ácido orgânico tricarboxílico, obtido através processos fermentativos submersos. O gênero *Aspergillus* é considerado um excelente produtor de substâncias bioativas de interesse industrial. Foram realizados ensaios com 4 amostras de *Aspergillus* isoladas da Caatinga em 3 meios convencionais, durante 144h, 37°C, 180rpm. Foram analisados a variação de pH, o consumo de açúcar e a produção de ácido cítrico a cada 24h. Os resultados evidenciaram que o meio denominado de 2 e e a amostra UCP1357, apresentaram uma produção de ácido cítrico de 7,22g/L. Em seguida a seleção do meio e do melhor micro-organismos produtor, foram realizados ensaios de produção com meios formulados com resíduos de frutas cítricas: cascas de abacaxi, acerola, laranja e limão de indústrias de alimentos do estado de Pernambuco. Os resultados revelaram que todos os resíduos produziram ácido cítrico, sendo a casca de limão o melhor dos resíduos testados (6,91g/L). Verifica-se que existe a possibilidade da utilização de resíduos na formulação de meios de produção, contribuindo assim para o reaproveitamento dos nutrientes presentes e a redução do impacto ambiental.

**Palavras-chave:** formulação meios alternativos; potencial biotecnológico, fungos filamentosos.

## Introdução

O citrato de hidrogênio ou ácido cítrico (AC), é um ácido orgânico tricarboxílico considerado fraco, que apresenta fórmula molecular  $C_6H_8O_6$  (SAWANT, 2018; CARSANBA et al., 2019), e possui diversas aplicações em diversas áreas industriais: bebidas, fármacos, cosméticos e alimentos (ALI, HAQ, 2014; CIRIMINNA et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2019).

Anualmente, mais de dois milhões de toneladas de ácido cítrico são produzidos a partir da fermentação submersa, visto que sua obtenção por via química é muito mais cara que a produção através de processos fermentativos (OZDAL; KURBANOGLU, 2018; TONG et al., 2019).

O gênero *Aspergillus* é descrito como um excelente produtor de metabólitos biotecnológicos, sendo responsável pela produção de 92% de todo o ácido cítrico mundial (PERRONE et al., 2013; STEIGER et al., 2018). Este gênero está descrito no filo Ascomycota, na ordem dos Eurotiales e família Trichocomaceae (RIORDON et al., 2019; PEARCE, 2019).

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção de alimentos, sendo o terceiro maior produtor mundial de frutas e hortaliças (EMBRAPA, 2018), gerando assim uma grande quantidade de resíduos, que normalmente não sofrem tratamentos adequados (SILVA et al., 2019; MARENDA et al., 2019).

A formulação de meios de produção em biotecnologia, na área de processos fermentativos, principalmente utilizando resíduos para produção de metabólitos possui um alto valor agregado. (MARCELINO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2019; ROMO-BUCHELLY, RODRÍGUEZ-TORRES, OROZCO-SÁNCHEZ, 2019; MERINO, et al., 2019; FONSECA et al., 2018; DAS, KUMAR, 2019)

Diversos estudos têm descrito técnicas de reaproveitamento desses resíduos em processos de produção industriais, pois além de reduzirem danos ambientais, apresentam uma economia para as empresas, devido as grandes quantidades de macro e micronutrientes presentes em sua composição (SANT'ANNA et al., 2012; ASHOUR et al., 2014; SUN et al., 2018).

Neste trabalho foram realizados ensaios de produção do ácido cítrico utilizando amostras de *Aspergillus* spp, em meios convencionais e meios elaborados utilizando resíduos da indústria de sucos frutas cítricas do Estado de Pernambuco.

## Material e Métodos

## Amostras Testadas

Foram utilizadas quatro amostras de *Aspergillus* spp (UCP 1099, 1356, 1357 e 1463). isoladas da Caatinga pernambucana e mantidas no banco de cultura do Núcleo de Pesquisas e Ciências Ambientais e Biotecnologia, situado na Universidade Católica de Pernambuco.

## Preparação de Meios

### Manutenção

As amostras selecionadas foram inoculadas e mantidas em tubos de ensaio com meio Sabouraud contendo 1g/L de ácido cítrico para manutenção. Em seguida, foi feita uma suspensão esporica de  $10^7$  esporos/mL. A contagem dos esporos foi feita em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

### Produção

**Meio 1 (M<sub>1</sub>)-** NaNO<sub>3</sub>, 6,0g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1,5g/L; KCl, 0,5g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5g/L; FeSO<sub>4</sub>, 0,01g/L; ZnSO<sub>4</sub>, 0,01g/L; glicose, 10g/L; peptona, 2,0g/L; extrato de levedura, 2,0g/L; tiamina, 0,3g; Ácido cítrico, 1g/mL.

**Meio 2 (M<sub>2</sub>)-** MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,23g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1,0g/L; sacarose, 50g/L; uréia, ,5g/L; peptona, 2,5g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5g/L; Ácido cítrico, 1g/mL.

**Meio 3 (M<sub>3</sub>)-** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,0g/L; citrato trissódico, 5,0g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 2,0g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,0g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2g/L; peptona, 1,0g/L; glicose, 0,2g/L; extrato de levedura, 2,0g/L; Ácido cítrico, 1g/mL.

### Processamento dos resíduos

Para a formulação dos meios com resíduos agroindustriais, foram coletadas cascas de frutas cítricas (abacaxi, acerola, laranja e limão).

As cascas foram mantidas durante 24 horas ao ar livre para secagem inicial, e posteriormente colocadas em uma estufa de secagem e esterilização modelo 315-SE da FANEM<sup>®</sup> durante 12 horas a temperatura de 60°C.

Após a retirada da estufa, as cascas foram trituradas em um liquidificador industrial e peneiradas até a padronização de 32 mesh.

### Meios de Produção Alternativos

Após a seleção do melhor meio de produção e amostra, a composição do ácido cítrico presente no meio controle, foi substituída por diferentes concentrações dos resíduos selecionados.

## Produção de Ácido Cítrico em Meios convencionais

A fermentação submersa foi iniciada utilizando os três meios de produção com composições quimicamente definidas.

Os meios foram distribuídos em Erlenmeyer's de 250mL, em triplicata. Foram inoculados 3% da suspensão esporíca nos frascos contendo diferentes concentrações dos resíduos selecionados. A fermentação submersa foi realizada em agitador orbital à 37°C, 180 rpm, durante 144 horas.

Foram coletadas alíquotas de 15 mL a cada 24h, e armazenadas em freezer para posteriores análises de produção de ácido cítrico.

## Produção de Ácido Cítrico por Meios Alternativos

Nessa primeira etapa de fermentação, a quantidade de ácido cítrico presente no meio controle selecionado, foi mantida na formulação dos meios alternativos.

Foram inoculados 3% da suspensão esporíca nos frascos de Erlenmeyer. As condições de produção foram as mesmas utilizadas nos meios controles.

## Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>

Após a seleção dos melhores resíduos para produção de ácido cítrico, foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, para obtenção das melhores condições de produção do ácido cítrico e também verificar se houve ou não interação entre os resíduos testados.

A matriz codificada utilizada está descrita na Tabela 1, onde as variáveis foram os resíduos de frutas cítricas utilizadas.

Tabela 1: Matriz decodificada do peso das cascas de cada resíduo agroindustrial utilizado em gramas por litro

	-1	0	+1
abacaxi	3g/L	4g/L	5g/L
laranja	2g/L	3g/L	4g/L
limão	1g/L	2g/L	3g/L

A matriz gerou um total de 12 experimentos, tendo 4 pontos centrais.

## Resultados e Discussão

Durante o período de produção do ácido cítrico por diferentes amostras de *Aspergillus*, pode-se observar que nenhuma das amostras testadas obteve resultados significativos de produção no “meio 1”.

## Determinação do pH

O pH final das alíquotas foi medido utilizando um leitor de pH perpHecT modelo 310 da marca LogRmeter®

## Consumo de Açúcares

As determinações das concentrações de açúcares foram feitas a partir da metodologia proposta por Ewing em 1969, as leituras foram feitas a partir da utilização de um refratômetro portátil produzido pela empresa Berthold technologies.

## Determinação do Ácido Cítrico Produzido

Para a determinação do ácido cítrico, foi utilizada a metodologia descrita por Saffran e Denstedt (1948), no qual a quantidade de ácido cítrico é identificado através da formação da cor amarela na reação do ácido tricloroacético (TCA) com piridina e anidrido acético.

A preparação para a leitura consiste na introdução de 1,0mL das amostras em um recipiente contendo 8,0mL de anidrido acético; em seguida, os frascos são aquecidos durante 10 minutos em banho-maria; após o aquecimento, são adicionados 1,0 mL de piridina; por conseguinte, os tubos são agitados em vórtex durante 30 segundos, retornados ao banho-maria por mais 40 minutos e então levadas para um banho de gelo de 5 minutos;

A curva padrão foi construída utilizando-se 1,0mL de solução de ácido cítrico, dissolvendo 4g de ácido cítrico em 100mL de TCA a 15%, com concentrações variando de 0,04 – 0,4g/L.

Para o branco, é adicionado 1,0mL de TCA (15%), a um recipiente com 8,0mL de anidrido acético, seguido de banho-maria por 10 minutos à 60°C. Em seguida, é adicionado 1,0mL de piridina, para que então o material seja retornado ao banho-maria por mais 40 minutos, seguido de banho de gelo de 35 minutos.

As leituras das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 400 nm.

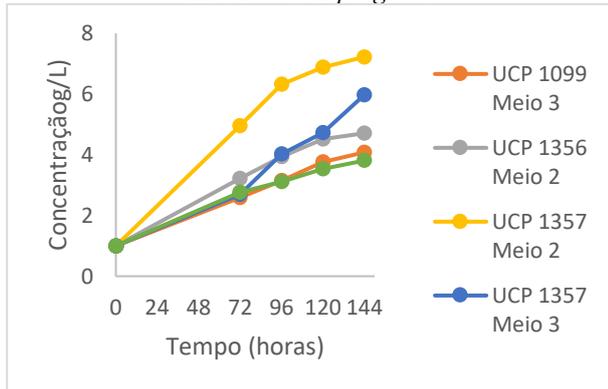
## Análises Estatísticas

Foram realizadas utilizando o software Statistica da StatSoft®

Duas das quatro amostras testadas (UCP 1099 e 1463) obtiveram uma maior produção no meio 3: 4,08 e 3,81g/L respectivamente, enquanto as outras duas, (UCP 1356 e 1357) obtiveram melhor resposta no meio 2, obtendo um valor

máximo de produção de 4,71 e 7,22g/L como demonstrado na figura 1.

Figura 1: Produção de ácido cítrico com diferentes amostras de *Aspergillus*



Das quatro amostras utilizadas, nos três meios testados, a associação que logrou a maior concentração de AC no período final da fermentação foi a do micro-organismo denominado UCP1357 no “meio 2”, apresentando uma produção média de 7,22g/L de AC após as 144 horas de fermentação (tabela 2).

Tabela 2: Concentração de ácido cítrico nos ensaios da UCP1357 a cada 24 horas (Φ)

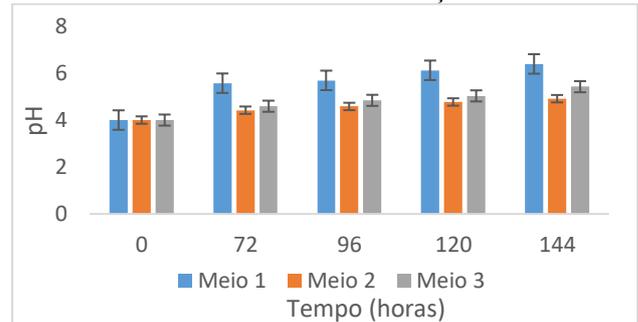
UCP 1357	0h	72h	96h	120h	144h
Meio 1	1g/L	1,22g/L	1,53g/L	1,67g/L	1,78 g/L
Meio 2	1g/L	4,96g/L	6,32g/L	6,88g/L	7,22g/L
Meio 3	1g/L	2,70g/L	4,02g/L	4,73g/L	5,97 g/L

A fermentação com a amostra UCP1357 apresentou resultados similares aos encontrados na literatura, Pastore (2011), utilizando o meio de Prescott & Dunn, ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,23g/L;  $KH_2PO_4$ , 1,0g/L;  $NH_4NO_3$ , 2,23g/L; sacarose, 140g/L; pH ajustado entre 1,6 e 2,2) alcançou sua maior produtividade a 144h de fermentação com valor de 12,9g/L, utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Segundo o autor, nem sempre é fácil apontar exatamente quais fatores influenciaram na produção, pois não se deve considerar a influência de fatores individuais sem que haja a influência sobre outros fatores. É de suma importância, no entanto, introduzir-se ao meio fermentativo fontes de nitrogênio, uma vez que não há indícios de nenhum fungo filamentosos conhecido que consiga fixar o nitrogênio presente na atmosfera.

Quanto ao pH, pode-se observar que quanto maior a produção de AC, mais estável o potencial

se mantém, como pode ser observado na figura 2, que demonstra as leituras da amostra UCP1357.

Figura 2: Variação de pH das amostra UCP1357 durante 144 h de fermentação

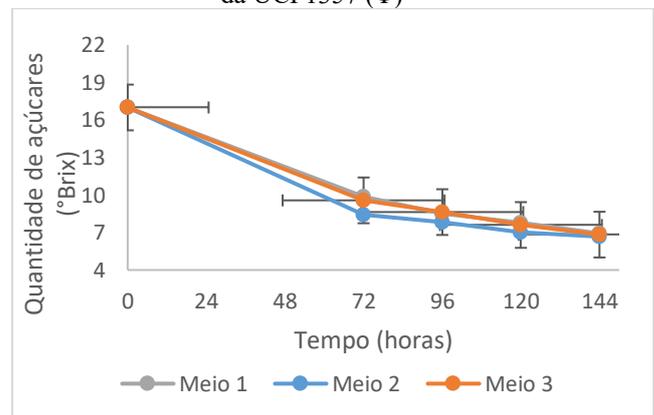


Observa-se que o meio 2 da UCP1357 é também o meio que possui a maior estabilidade das leituras de pH chegando a um potencial máximo de 4,91.

Pode-se perceber que estes resultados, corroboram os estudos de Ali (2014) e Steiger (2018), demonstrando que o pH do líquido metabólico durante a fermentação se mantém proporcional à quantidade de AC produzida, ou seja, quanto mais o pH se mantém em uma região ácida, maior o aproveitamento do micro-organismo para a produção do bioativo.

Após as leituras de pH, foram realizados os ensaios de determinação da quantidade de açúcares presentes no meio para demonstrar o consumo de glicose dos microrganismos (Figura 3).

Figura 3: Consumo de açúcar das alíquotas dos ensaios da UCP1357 (Φ)



Através da observação do consumo de açúcar, podemos também perceber que o meio 2, além de possuir a maior estabilidade do pH, foi também o meio em que houve o maior consumo de açúcares durante as primeiras 72 horas.

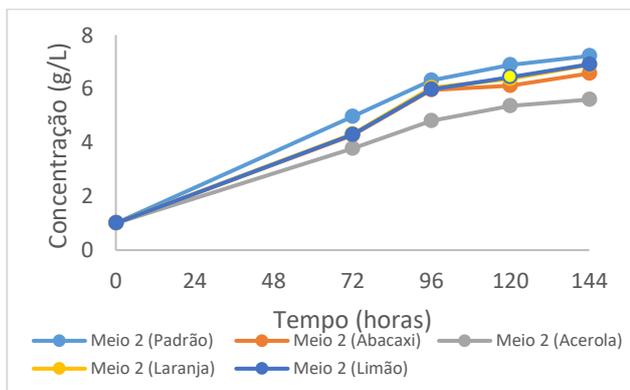
Segundo Bier, et al (2007) e Moraes et al. (2012), a taxa de proporção do consumo do substrato pelo micro-organismo, demonstra um melhor fornecimento de nutrientes gerando assim

um melhor aproveitamento de conversão no bioproduto desejado.

Após todos estes ensaios, foi comprovado que o meio 2 possui as melhores condições de cultivo para que os micro-organismos pudessem consumir os extratos e produzir ácido cítrico. Com isso, foi então dado início a seleção dos resíduos.

Após a formulação dos novos meios, foi realizada um novo cultivo submerso. Os resultados das fermentações podem ser observados na figura 4.

Figura 4: Produção de ácido cítrico da UCP1357 nos meios alternativos ( $\Phi$ )



Nestes resultados, pode-se observar que todos os meios formulados com os resíduos das cascas frutas cítricas obtiveram resultados sólidos e próximos a concentração de AC obtida no meio padrão, contudo, o meio com cascas de limão foi o que obteve melhor quantitativo de produção, chegando a obter uma média de 6,91g/L, sendo apenas 0,31g/L a menos que o meio convencional.

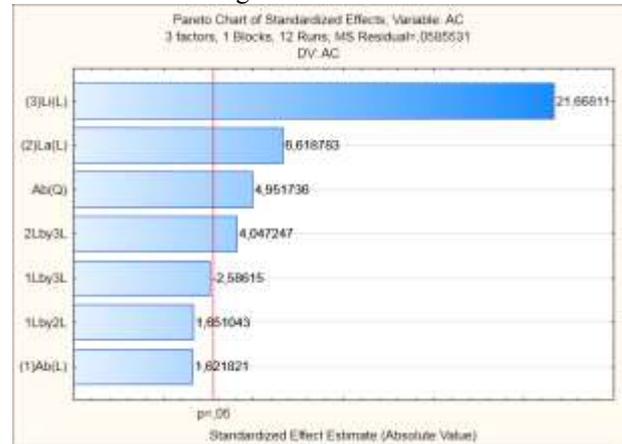
Após a determinação de quantidade de cada tipo de resíduo através da matriz decodificada e da fermentação dos 12 ensaios, foi realizada uma nova determinação química, e estes resultados obtidos foram levados para o software (tabela 3) para análise dos resultados através do gráfico de Pareto e superfície de resposta.

Tabela 3: Resultados dos ensaios propostos na matriz decodificada

Ensaios	Abacaxi g/L	Laranja g/L	Limão g/L	AC g/L
1	3	2	1	9,86
2	3	2	3	13,63
3	3	4	1	10,33
4	3	4	3	14,86
5	5	2	1	10,61
6	5	2	3	12,87
7	5	4	1	11,02
8	5	4	3	15,29
9	4	3	2	11,72
10	4	3	2	11,47
11	4	3	2	11,50
12	4	3	2	11,61

Antes de levar os resultados ao software para a obtenção do gráfico de Pareto (figura 5), é possível perceber que a quantidade de AC produzida no ensaio 8, foi superior ao dobro da quantidade produzida pelo meio padrão de produção de AC com apenas substratos químicos.

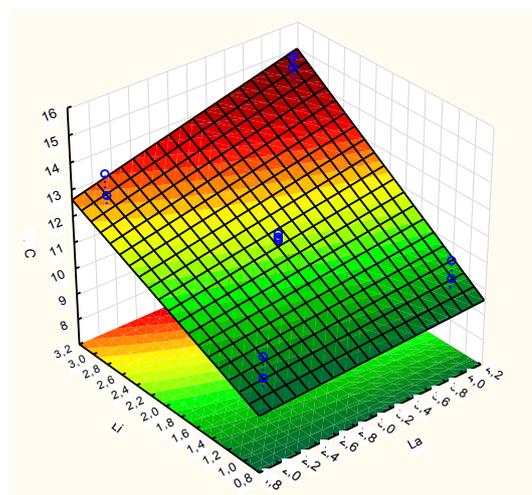
Figura 5: Diagrama de Pareto das interações entre os resíduos agroindustriais utilizados



A partir destes resultados, é possível perceber que a variância é significativa nos resíduos de uma forma independente, porém uma boa interação entre os resíduos ocorre somente entre as cascas de limão e laranja (resíduos que melhor produziram individualmente).

Neste mesmo gráfico, pode-se também notar que o resíduo das cascas de limão é o que mais acentua a produção de AC no meio, e que somente houve interação significativa com a mistura dos resíduos de limão e laranja (Figura 6), embora o gráfico também demonstre que a utilização dos resíduos de abacaxi e de limão obteve um resultado bem próxima à margem de significância do estudo.

Figura 6: Superfície de resposta 3d das interações entre os resíduos de laranja e limão



Neste gráfico podemos identificar que a margem com coloração mais esverdeada das interações se posiciona no ponto entre as duas variáveis analisadas (laranja e limão), evidenciando assim a grande interação entre os dois resíduos.

Com isto, pode-se observar que todas as fontes alternativas forneceram significativas concentrações de ácido cítrico para os micro-organismos e substituíram a fonte química com primor tanto de maneira individual quanto em conjunto.

Também é possível determinar que a interação entre os resíduos, mesmo não sendo considerada significativa no estudo estatístico, obteve resultados de produção de AC substancialmente maiores (superiores ao dobro) que o meio com o ácido cítrico P.A. e, contabilizando 2,39g/L a mais que o trabalho realizado por Pastore, et al (2011) utilizando o meio industrial formulado exclusivamente com substratos químicos, demonstrando assim que os resíduos agroindustriais são uma escolha excelente para a diminuição do custo de produção de AC industrial.

### Conclusões

Observou-se neste trabalho que o meio convencional 2, foi o que proveu a melhor condição para a adaptação e o crescimento inicial do micro-organismo, visto que o consumo inicial dos açúcares do meio foi proeminente neste meio.

Nos estudos dos resíduos agroindustriais, pode-se constatar que todas as fontes de ácido cítrico alternativas substituíram bem a fonte química de AC, contudo, a casca de limão obteve a melhor média de resultados, produzindo apenas 0,31 g/L a menos que o meio padrão.

Nos estudos das interações entre as fontes de ácido cítrico, pode-se constatar que todas as combinações entre os resíduos geraram concentrações de AC acima do obtido com a utilização do produto químico P.A., todavia, a combinação que apresentou uma maior interação foi a das cascas de limão e laranja, obtendo resultados significativamente superiores aos apresentados na literatura para meios formulados com compostos químicos.

Outros estudos relacionados às concentrações de nitrogênio e carbono (glicose) introduzidas ao meio fermentativo, bem como de sais, precisam ser analisados em trabalhos posteriores como resposta à produtividade de ácido cítrico.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CNPq e CAPES 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 todo o trabalho experimental.

### Referências

- 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.
- ARAÚJO, R. C. C. Parâmetros físico-químicos da compostagem de resíduos agroindustriais na região de Carajás-PA. 2019. 33 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Carajás, 2019.
- ASHOUR, A.; et al. 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.
- BIER, M. C. J. et al. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* por fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 2, p.119-130, dez. 2007.
- CARSANBA, E. et al. Screening various *Yarrowia lipolytica* strains for citric acid production. Yeast, [s.l.], v. 36, n. 5, p.319-327, maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3389>.
- CHEN, J. et al. Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and in vivo: A Review. Plants, [s.i.], v. 26, n. 8, p.1-19, 22 jan. 2019.
- CIRIMINNA, R; et al. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. Chemistry Central Journal, v.11, n. 22, p. 2-9, 2017.
- DAS, A. J., KUMAR, R. Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. Bioresource Technology, n.260, p. 233-240, 2018.

- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Interesse por pesquisa com biomassa atrai grupo alemão a São Carlos. Embrapa, São Paulo. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1724562/interesse-por-pesquisa-com-biomassa-atrui-grupo-alemao-a-sao-carlos>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- EWING, Galen Wood. Instrumental Methods of Chemical Analysis. 1. ed. New Jersey: McGraw-Hill Book Company, 1969. 297 p. Capítulo 10.
- FONSECA, T. C. S.; et al. Amylase production by *Aspergillus tamarii* (UCP 1261) through submerged fermentation using alternative media containing agro-industrial residues. Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology, p. 120-125, 2018.
- MAGALHÃES, N. et al. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. Engenharia Sanitaria e Ambiental, [s.l.], v. 24, n. 1, p.101-107, 25 abr. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522019167153>.
- MARCELINO, P. R. F., et al. Sustainable production of Biosurfactants and Their Applications. Lignocellulosic Biorefining Technologies, 159-183, 2020.
- MARENDA, F. R. B. et al. Advances in studies using vegetable wastes to obtain pectic substances: A Review. Journal Of Polymers And The Environment, [s.l.], v. 27, n. 3, p.549-560, 17 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1355-8>.
- 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.
- MERINO, C. O.; et al. Biotransformation of fruit-Horticultural Agro-Industrial Residues Using Efficient Microorganisms (EM) in Riobamba (Ecuador). Journal of Engineering and Applied Sciences, n.14, v.8, p.2504-2512, 2019.
- MORAES, D. C. et al. Avaliação da fermentação aeróbia para produção de etanol a partir de xilose por linhagens de leveduras isoladas da casca de uva (*Vitis spp*). Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 15, n. 2, p.117-122, mar. 2012.
- OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; et al. Utilização de flavonoides no setor industrial farmacêutico: um estudo de prospecção tecnológica. Revista Geintec, v. 4, n. 2, p. 859-866, 2014.
- OZDAL, M. ; KURBANOGU, E. B. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. Waste And Biomass Valorization, [s.l.], p.1-10, 15 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>.
- 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, Toledo, v. 13, n. 3, p.149-159, dez. 2011.
- PEARCE, C. J. Review of new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: aspergillus system properties and applications. Journal Of Natural Products, [s.l.], v. 82, n. 4, p.1051-1051, abr. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00211>.
- PEREIRA, C. T. M.; et al. 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.; et al. *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.
- RIORDON, J. et al. Deep learning with microfluid-

dics for biotechnology. Trends In Biotechnology, [s.l.], v. 37, n. 3, p.310-324, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.005>.

RODRIGUES, T. V. D.; et al. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts. Food Technology and Biotechnology, n.57, v.3, p.388 - 398, 2019.

ROMO-BUCHELLY, J.; RODRIGUES-TORRES M.; OROZCO-SÁNCHEZ, F. Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production. Revista Colombiana de Biotecnología, n 21, v.1, p.113-127, 2019.

SAFFRAN, M.; DENSTEDT, O. F. A rapid method for the determination of citric acid. Department of Biochemistry, McGill, Montreal, Canada, 1948.

SANT'ANNA, M. C. S.; et al. Caracterização de briquetes obtidos com resíduos da agroindústria. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 14, n. 3, p. 289-294, 2012.

SAWANT, O. Fungal citric acid production using waste materials: A Mini-Review. Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences, [s.l.], v. 8, n. 2, p.821-828, 1 out. 2018. Slovak University of Agriculture in Nitra. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.821-828>.

SILVA, C. A. et al. Soil evaluation for pineapple cultivation (ananás comosus) in the municipality of Teotônio Vilela, Alagoas. Brazilian Journal Of Development, Teotônio Vilela, v. 5, n. 11, p.22826-22834, nov. 2019.

STEIGER, M. G. et al. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. Metabolic Engineering, Vienna, v. 8, n. 8, p.1-29, 11 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>

STORCK, C. R.; et al. Folhas, talos, cascas e se-

mentes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. Ciência Rural, v. 43, n. 3, p. 537-543, 2013.

SUN, X. et al. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. Bioprocess And Biosystems Engineering, [s.l.], p.1-10, 2 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1932-1>.

TONG, Z. et al. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. Microbial Cell Factories, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-15, 4 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1064-6>.

D'Lamare, A. M. M. Produção de ácido cítrico por amostras de *Aspergillus spp.* isoladas da Caatinga de Pernambuco utilizando meios formulados com resíduos agroindustriais regionais.

# **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 produtores de ácido cítrico, o micro-organismo UCP1357 apresentou os melhores resultados diante das outras amostras testadas.

Nos ensaios referentes a seleção dos meios de produção do ácido cítrico, dentre os três meios selecionados o que apresentou os melhores resultados foi o meio denominado “meio 2”.

Na seleção de resíduos agroindustriais, pode-se observar que todos os resíduos (abacaxi, acerola, laranja e limão) apresentaram resultados significativos de produção de AC, contudo, o meio produzido utilizando as cascas de limão foi o que obteve melhores resultados, apresentando uma concentração de apenas 0,31g/L a menos que o meio padrão industrial.

Nos ensaios utilizando o planejamento fatorial  $2^3$  para a produção de ácido cítrico, tendo como variáveis independentes os resíduos agroindustriais, formulados a partir do “meio 2”, o ensaio 8 (dentre os 12 ensaios realizados), foi o que demonstrou os melhores resultados de produção, obtendo resultados de produção de AC substancialmente maiores (superiores ao dobro) que o meio com o ácido cítrico P.A..

A interação entre os resíduos agroindustriais no meio de produção de ácido cítrico, foi verificada a partir dos ensaios propostos no planejamento fatorial, onde foi constatado, que a única interação significativa aconteceu entre os resíduos de laranja e limão.

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

# **ANEXOS**

# MODELO DE SUBMISSÃO DO JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYSIS AND PROGRESS



ISSN: 2525-815X

## Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: [www.jeap.ufrpe.br/](http://www.jeap.ufrpe.br/)



Título (em português)

Nome completo do Autor sem abreviaturas<sup>a</sup>, Autor<sup>b</sup>, Autor<sup>c</sup>, Autor<sup>d</sup>, Autor<sup>e</sup>, Autor<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Endereço completo da filiação do Autor (onde o trabalho foi realmente realizado), com endereço postal completo de cada filiação, incluindo o nome do país e, se possível, o e-mail de cada Autor. O endereço atual do trabalho pode ser adicionado aqui, caso seja diferente do endereço onde o trabalho foi realizado. Neste caso, por favor, informe o endereço atual na sequência.

<sup>b</sup> Endereço completo da filiação do Autor.

<sup>c</sup> Endereço completo da filiação do Autor.

<sup>d</sup> Endereço completo da filiação do Autor.

<sup>e</sup> Endereço completo da filiação do Autor.

<sup>f</sup> Endereço completo da filiação do Autor.

### ARTICLE INFO

Recebido Dia Mês Ano

Aceito Dia Mês Ano

Publicado Dia Mês Ano

### ABSTRACT

Abstract of 250 words, following this structure: Introduction to the theme: relevance of this study; Objectives: actions intended to obtain goals; Methods: short description of used methodology; Results: main results obtained; Conclusion: major information linked to the objectives. No references.

**Keywords:** Minimum of three and maximum of six words different of the title.

### RESUMO

Resumo de até 250 palavras, seguindo a estrutura: Introdução ao tema: relevância deste estudo; Objetivos: ações destinadas a atingir propósitos; Métodos: breve descrição da metodologia usada; Resultados: principais resultados obtidos; Conclusão: principal informação ligada aos objetivos. Sem Referências.

**Palavras-Chave:** Mínimo de três e máximo de seis palavras, diferentes das usadas no título.

## Introdução

A Introdução deve informar claramente sobre o assunto e sua relação com outros trabalhos na mesma área. No último parágrafo, estabelecer os objetivos do trabalho. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências de publicações mais recentes. Abaixo estão alguns exemplos de formas de citação no Texto. Este formato deve ser seguido nas seções de Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão.

Texto ... (Autor, Ano).

Texto ... (Autor et al., Ano; Autor & Autor, Ano).

Autor & Autor (Ano), Autor, Autor & Autor (Ano) e Autor et al. (Ano) afirmaram que ...

Texto ..., seguindo Autor & Autor (Ano), Autor, Autor & Autor (Ano), and Autor et al., (Ano).

Texto ... (Autor et al., Ano; Autor, Ano; Autor et al., Ano; Autor, Ano).

## Material e Métodos

*A descrição dos materiais e métodos utilizados deve ser breve e suficientemente clara para a compreensão e reprodutibilidade da obra. Processos e técnicas publicados, a não ser extensivamente modificado, deve ser referenciado. nomes de plantas devem estar completos, incluindo o nome do autor e da família, de acordo com <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>, <http://www.tropicos.org> ou <http://www.theplantlist.org/>. É recomendável*

Tabela 1. Texto... . Fonte: Autor sobrenome et al. (Ano).

Inserir figura do arquivo aqui. Submeta a imagem, isolada, em um formato original (png, bmp, tif, jpg).

Inserir figura do arquivo aqui. Submeta esta imagem, isolada, em seu formato original (bmp, tif, png, jpg) na página do JEAP.

Figura 1. Título da figura... .

Fonte: Autor (sobrenome) et al. (Ano).

## Referências

O Journal of Environmental Analysis and Progress-JEAP está aguardando uma solução do conflito entre o Office 365 e o plugin do Mendeley para Citações e Referências.

Por este motivo, indicamos que os Autores sigam os modelos nos últimos artigos publicados no site do JEA

*informar o nome vulgar da planta / animal para facilitar o seu reconhecimento.*

É opcional a apresentação dos **Resultados** e **Discussão** de modo separado ou em conjunto. Devem ser observados os critérios para a apresentação dos resultados obtidos e sua discussão com dados publicados por outras publicações, caracterizando uma discussão dos resultados obtidos pelos Autores.

## Resultados e Discussão

Os resultados devem ser apresentados sem discussão pessoal ou interpretação, e se for relevante, ser acompanhada de Tabelas e Figuras, seguindo os exemplos que podem ser encontrados aqui. Os dados, se pertinentes, devem informar as análises estatísticas.

## Conclusão

As conclusões devem ser tiradas de seus resultados, de forma clara e firmemente apoiada pelos dados mostraram em seus resultados, sem quaisquer referências, e respondendo aos objetivos propostos na Introdução.

## Agradecimentos

É recomendável informar aqui as instituições e/ou nomes de pessoas que deram uma contribuição substancial para o artigo.







+ Escrever

📧 Caixa de entrada 281

★ Com estrela

🕒 Adiados

▼ Enviados

📄 Rascunhos 1

> Mais



De: **Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel** <[jeap@ufape.br](mailto:jeap@ufape.br)>

Date: sex., 7 de fev. de 2020 às 19:10

Subject: [JIEAP] Agradecimento pela submissão

To: Doutor Carlos Alberto Alves da Silva Carlos Alberto Alves da Silva <[carlos.alves@unicap.br](mailto:carlos.alves@unicap.br)>

Doutor Carlos Alberto Alves da Silva Carlos Alberto Alves da Silva,

Agradecemos a submissão do trabalho "Produção de Ácido Cítrico por amostras de *Aspergillus* através de Fermentação Submersa utilizando diferentes meios de produção contendo Resíduos Agroindustriais" para a revista *Journal of Environmental Analysis and Progress*.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão:

<http://www.journals.ufape.br/index.php/JEAP/author/submission/3131>

Login: calves

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel

Journal of Environmental Analysis and Progress

Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel

Journal of Environmental Analysis and Progress

<http://www.jeap.ufape.br/>

### SUBMISSÃO DO CAPÍTULO 3

Alexandre ▾

+

Nenhum bate-papo recente

Iniciar um novo



**TRABALHO PREMIADO NO I CONBASE – UNICAP 2018.**  
DETECÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM MEIO SÓLIDO COM AMOSTRAS DE  
*ASPERGILLUS niger* ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

ALEXANDRE D’LAMARE MAIA DE MEDEIROS<sup>1</sup>

DAIANA CAMILA BARROS LUNA<sup>2</sup>

CARLOS ALBERTO ALVES DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais Ambientais (MDPA), e-mail:  
alexandre\_dlamare@outlook.com

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica, Curso Engenharia Química, e-mail: daiana.bxx@gmail.com

<sup>3</sup> Núcleo de Pesquisas e Ciências Ambientais e Biotecnologia NPCIAMB, e-mail: calves@unicap.br  
Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife,  
Pernambuco, Brasil.

## RESUMO

A produção de substâncias bioativas de interesse biotecnológico vem gerando interesse através de estudos para isolar e identificar micro-organismos com elevado potencial biotecnológico de áreas com elevada biodiversidade, porém pouco conhecidas, A Caatinga nordestina é uma região que ocupa uma área de cerca de 12% do território nacional. Foram realizados estudos para seleção de amostras fúngicas isoladas da Caatinga para detecção de ácido cítrico em meio sólido. Foram utilizadas 4 amostras denominadas de UCP 1094, 1097, 1356 e 1463 utilizando como variáveis valores diferentes de temperatura (28, 37 e 42°C) e pH (5,5; 7,0 e 8,5). Os ensaios ocorreram durante 7 dias nas condições, com amostras em triplicata. Os resultados revelaram que todas as amostras testadas produziram o ácido cítrico nas condições testadas, porém o melhor resultado foi obtido com a amostra UCP 1097, no pH de 5,5 à 37°C, cujo halo obtido foi de 6,0 cm. Esses resultados evidenciam que a biodiversidade microbiana da Caatinga apresenta uma grande quantidade de micro-organismos ainda pouco estudados para produção de compostos bioativos.

**Palavras chave:** detecção ácidos orgânicos; potencial biotecnológico, fungos filamentosos.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (AC), é um produto orgânico produzido através de vias fermentativas ou sintéticas, também conhecido como Citrato de Hidrogênio, é um ácido orgânico tricarboxílico fraco apresentado fórmula química  $C_6H_8O_7$ . Atualmente é um dos produtos obtidos por fermentação mais produzidos no mundo, devido apresentar

propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes, sequestrantes e reguladoras de acidez. [7; 3; 1; 2]

A Caatinga nordestina, ocupa uma área de aproximadamente 850 mil km<sup>2</sup> (cerca de 12% do território nacional [4; 8]. Este bioma apresenta uma imensa variedade de espécies da flora, da fauna e principalmente, diversos micro-organismos ainda pouco estudados [6; 9].

O gênero *Aspergillus* se destaca por ser considerado um bom produtor de substâncias bioativas de interesse biotecnológico, muito utilizadas nas áreas industrial e/ou ambiental [10].

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismos**

Foram utilizadas amostras do gênero *Aspergillus niger* denominadas UCP 1094, UCP 1097; UCP 1356 e UCP 1463. Todas isoladas de amostras do solo da Caatinga de Pernambuco, depositadas no Banco de Culturas da UNICAP,

### **2.2. Meio de Detecção**

Foi utilizado o meio de Foster [5] cuja composição: 5g/L de glicose; 1g/L de peptona; 1g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g/L de MgSO<sub>4</sub>; 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 final foi ajustado para 5,5; 7,0 e 8,5. O aparecimento de um halo amarelo brilhante evidencia a produção de ácido cítrico no meio testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.3. Preparação do Inóculo**

Foram utilizadas suspensões de esporos na ordem de 10<sup>7</sup> esporos por mL Os meios com diferentes valores de pH foram distribuídos em placas de Petri, onde após a solidificação do meio foram feitos poços com diâmetros de 6 mm no centro de cada placa.

Foram inoculados nos poços o volume de 65µL em cada placa utilizando diferentes valores de pH (5,5; 7,0 e 8,5) e de temperatura (28, 37 e 42°C)., durante 168 h. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

## **3. RESULTADOS**

Os resultados obtidos nos ensaios de detecção do ácido cítrico nas amostras testadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Seleção de amostras para produção de ácido cítrico em diferentes valores de temperaturas e pH, Ensaios com X horas, halos expressos em centímetros (cm)

Amostras	pH	28°C	37°C	42°C
UCP 1094	5,5	3,5	2,0	-
	7,0	4,0	3,5	1,0
	8,5	4,5	3,0	1,0
UCP 1097	5,5	1,0	4,0	1,5
	7,0	1,5	4,0	1,0
	8,5	4,5	2,0	1,0
UCP 1356	5,5	4,0	6,0	2,0
	7,0	2,0	5,5	1,5
	8,5	4,5	4,0	1,5
UCP 1463	5,5	4,5	5,0	1,5
	7,0	5,0	5,0	1,5
	8,5	3,0	3,0	2,0

(-) Não detectado

Todas as amostras testadas em diferentes valores de pH demonstraram atividade, contudo, a melhor produção de ácido cítrico que foi detectada na temperatura de 28°C foi da UCP 1463, que apresentou o maior halo obtido de 5,0 cm no pH de 7,0.

A temperatura de 37°C revelou também uma elevada produção de ácido cítrico nas diferentes condições testadas de pH e temperatura, porém a amostra UCP 1356 apresentou o maior halo característico de todo o ensaio realizado, um valor de 6,0 cm no pH de 5,5 (Figura 1).

**Figura 1. Melhores produtoras de AC dos ensaios**



**Fonte:** Autor (2018)

Verifica-se que na temperatura mais elevada (42°C) todas as cepas apresentaram uma diminuição na formação do halo, e a UCP 1094, no pH 5,5 não produziu nenhuma mudança de coloração ou halo.

Esses valores obtidos estão de acordo com os valores descritos na literatura para produção de ácido cítrico em amostras testadas em meio sólido.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, verifica-se que a imensa biodiversidade do bioma Caatinga ainda pouco conhecida, revela possuir uma microbiota vasta e com elevado potencial biotecnológico para produção de substâncias bioativas de interesse industrial e/ou ambiental.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] 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.
- [2] CIRIMINNA, R; MENEGUZZO, F; DELISI, R., PAGLIARO, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v.11, n. 22, p. 2-9, 2017.
- [3] DHILLON, G.S. et al., 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.
- [4] FILIZOLA, B. C.; SAMPAIO, M. B. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas. Brasília: **Instituto; Sociedade, População e Natureza**; 2015. ISBN 978-85-63288-17-2
- [5] FOSTER, J. W. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York, 1949;
- [6] LEAL, I.R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 139-146, 2005.
- [7] MAX, B, et al., Biotechnological production of citric acid, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.862-875, 2010.
- [8] MESQUITA, M.; PINTO, T.; MOREIRA, R.. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.216-230, maio 2017. GNI Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20170028..>
- [9] NANNIPIERI, P et al., Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, n.6 8, v.1, p.12-26, 2017.
- [10] YANG, L. ; LÜBECK, M. ; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.33-49, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>

## TRABALHO PUBLICADO NO I CONBASE – UNICAP 2018.

### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA UTILIZANDO ASPERGILLUS SPP. ISOLADOS DA CAATINGA DO ESTADO DE PERNAMBUCO.

Daiana Camila Barros Luna<sup>2</sup>, Alexandre D’Lamare Maia De Medeiros<sup>1</sup>, Carlos Alberto Alves da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais Ambientais (MDPA), e-mail: alexandre\_dlamare@outlook.com

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica, Curso Engenharia Química, e-mail: daiana.bxx@gmail.com

<sup>3</sup> Núcleo de Pesquisas e Ciências Ambientais e Biotecnologia NPCIAMB, e-mail: calves@unicap.br  
Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

#### RESUMO

Os micro-organismos apresentam uma elevada biodiversidade, principalmente o grupo dos fungos filamentosos, onde o gênero *Aspergillus* se destaca por apresentar um elevado potencial biotecnológico na produção de diversos tipos enzimas de origem microbiana. As amilases (E.C. 3.2.1.1.) são enzimas mais utilizadas em diversos processos de biotransformação, uma vez que oferecem uma ampla gama de reações que podem catalisar como as hidrólises, amino-hidrólises, esterificações, etc. Foram realizados ensaios de seleção de amostras *A. ssp* isoladas da Caatinga de Pernambuco em meio sólido para produção de amilase, onde foram estudados o potencial enzimático através da formação do halo característico da enzima em diferentes valores de temperaturas e pH durante 72 h, em triplicata. Por fim, este trabalho tem com objetivo geral estudar a influência da temperatura e do pH nas linhagens selecionadas e verificar se os fungo *Aspergillus spp.* possuem potencial de quebra do amido.

**Palavras chave:** Amilase; Caatinga; Potencial Biotecnológico, *Aspergillus*.

#### 1 INTRODUÇÃO

As enzimas de origem fúngica e bacteriana são amplamente utilizadas nos setores industriais, tendo como vantagem do uso de micro-organismos para a produção de amilases e isso tem grande potencial econômico, capacidade de produção em larga escala, facilidade de manipulação e obtenção de enzimas com características específicas [7]. As amilases estão entre as mais importantes, apresentando grande importância

biotecnológica, representando 25% do mercado mundial de enzimas [4]. As amilases pertencem ao grupo das hidrolases, são definidas quimicamente como E.C. 3.2.1.1. e aplicadas em diversos processos industriais (têxtil, bebidas destiladas, cervejarias, panificação, cereais, alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica, dentre outras) [1],[2]. Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas microbianas, dentre eles, os do gênero *Aspergillus* são os mais estudados para a produção de enzimas, este gênero apresenta uma grande diversidade de espécies com características vantajosas, como o fácil crescimento em meios sólidos e a produção de enzimas extracelulares [3].

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Micro-organismo**

Foram utilizadas cinco amostras de *Aspergillus spp* (UCP 1329, UCP 1275, UCP 1360, UCP 1394, UCP 1391) isoladas de solo da Caatinga do Nordeste de Pernambuco, e cedidas pelo Banco de Culturas da UNICAP.

### **2.2 Meios de cultura**

Foi utilizado o meio Sabourand (SAB) suplementado de amido 0,2% para aclimatar a amostra microbiana; para a detecção enzimática foi utilizado o meio Agar Nutriente (AN) suplementada de amido 0,2%.

### **2.3 Detecção enzimática**

Foram realizados testes para determinação da atividade amilásica em meio sólido de Agar Nutriente (AN), a 0,2% de amido solúvel ao meio [5], preparados em pH 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri, e após a solidificação foi realizado furos no centro das placas de diâmetro de 0,8 cm e inoculados 100 µL da suspensão de esporos fúngicos. As placas inoculadas foram incubadas em diferentes temperaturas (28°; 37° e 45°) durante 72 horas. Após o período de detecção enzimática, foram reveladas com uma solução de iodo a 0,1N, durante 5 minutos. A formação de um halo transparente em torno das colônias crescidas indica que houve a hidrólise do amido assim evidenciando a presença de amilase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para considerar um micro-organismo como bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, é necessário que o índice enzimático seja maior ou igual a 2,0 cm [6]. A Tabela 1 mostra os resultados dos índices enzimáticos (IE) da avaliação de diferentes espécies de *Aspergillus* na produção de amilase em diferentes valores de temperatura (28 e 37 °C) e pH (5, 6, 7 e 8). Verifica-se as amostras UCP 1329, UCP 1360 e UCP 1394 não apresentou a formação do halo característico enzimático da amilase. Já a amostra UCP 1275 apresentou a formação do halo característico em todas as variáveis testados, sendo o maior halo obtido de 5,0 cm com o pH 6,0 à 37 °C.

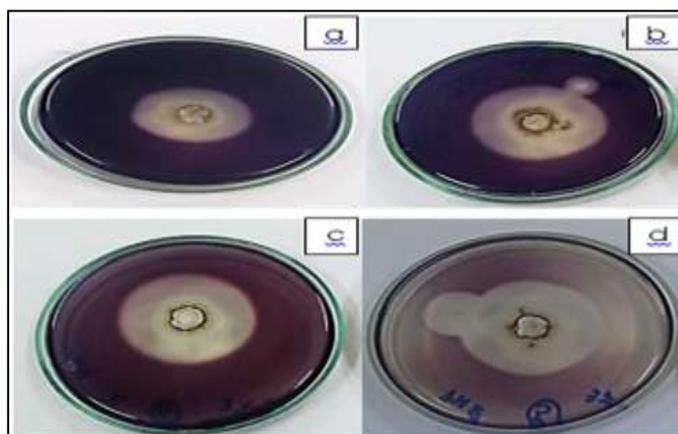
**Tabela 1:** Comparações de médias de Índices Enzimáticos (IE) expressos em centímetros das cinco amostras *Aspergillus* crescidas em diferentes temperaturas e pH.

Fungo	Temperatura (°C)	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
UCP 1329	28° e 37 °	-	-	-	-
UCP 1275	28°	4,5	4,5	4,5	4,5
	37°	4,5	5,0	4,5	4,5
UCP 1360	28° e 37°	-	-	-	-
UCP 1391	28°	3,5	3,5	3,5	2,0
	37°	-	-	-	-
UCP 1394	28° e 37°	-	-	-	-

(-) Não detectado

A formação dos halos característicos da amilase obtidos nos ensaios de seleção em meio sólido, estão descritos na Figura 1, onde observa-se que na amostra UCP 1275, foi detectada à presença da enzima em todos os valores de pH testados.

**Figura 1** - Formação de halo característico na amostra *Aspergillus* UCP 1275 na temperatura de 37° e em diferentes valores de pH pH. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 7 e d) pH8.



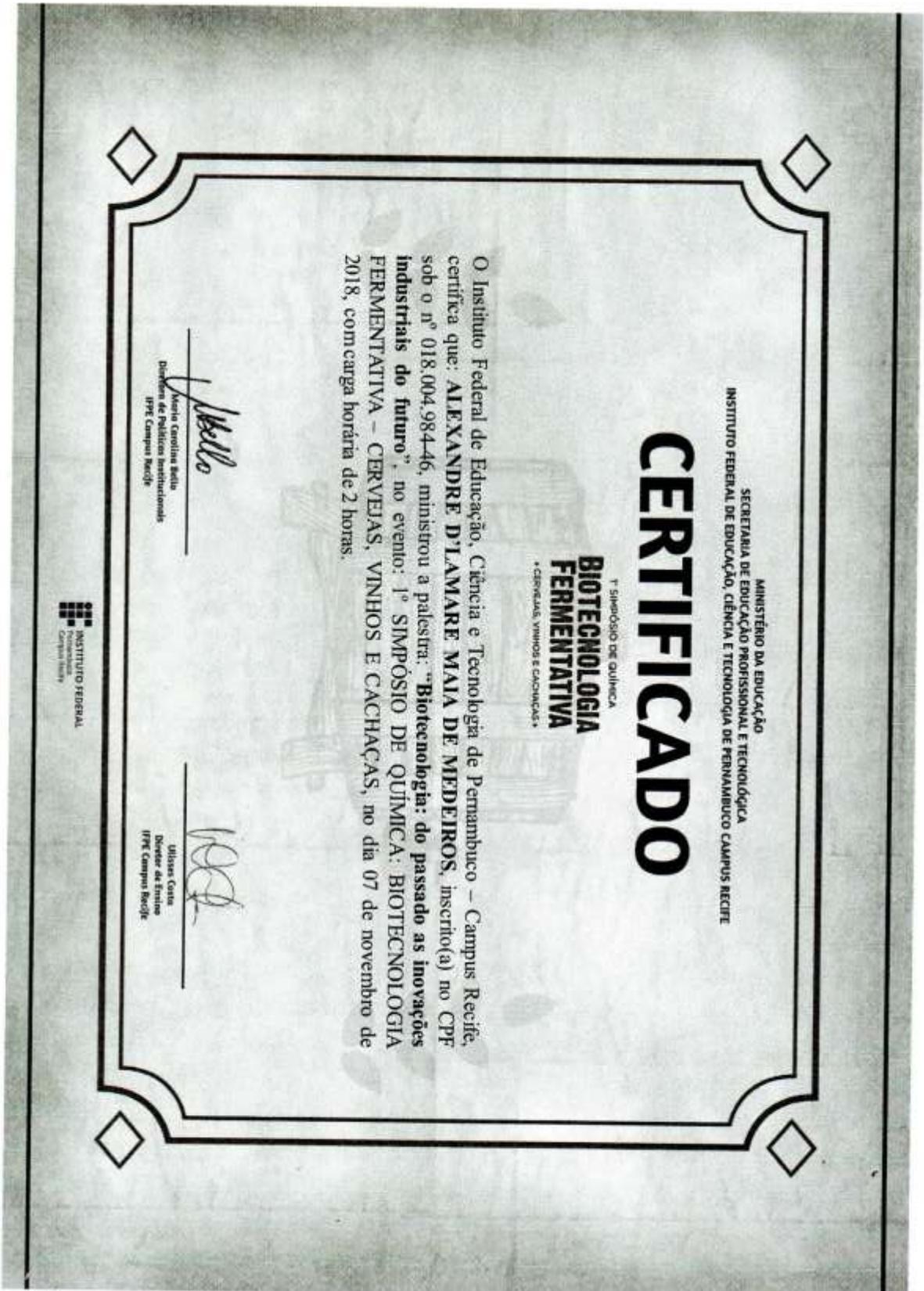
## 4 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos ensaios realizados, demonstra que os *Aspergillus spp.* isolados da Caatinga possuem um grande potencial biotecnológico, portanto, faz-se necessário um estudo mais aprofundado para se obter a confirmação a partir de ensaios fermentativos em meio líquido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BIAZUS, J. P. M. et al. Production and characterization of amylases from Zea mays malt. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 4, p. 991 – 1000, 2009.
- [2] CORREA, Fabiane Fernanda de Barros. Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. 2015,79f. Dissertação (Mestrado em ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro,2015.
- [3] FONSECA, T. C. S. Produção de amilase por amostra de *Aspergillus tamaris* UCP 1261 através da fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, 2017.
- [4] GONÇALVES, L.G. Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. 2016, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade estadual Paulista,Rio Claro,2016.
- [5] HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.
- [6] LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, p. 348-352, 1994.
- [7] SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*, v.8, p. 90-97, 2014.

## PALESTRAS E MINICURSOS MINISTRADOS





**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO E EXTENSÃO**

Certificamos que Alexandre D' Lamare Maia de Medeiros, ministrou o minicurso "Processos Fermentativos e Empreendedorismo, na III Semana de Engenharia Química da Unicap, promovido pela Universidade Católica de Pernambuco, de 09 a 10 de maio de 2019.

**Recife, 07 de maio de 2019**



  
\_\_\_\_\_  
**COORDENADOR (A) DO CURSO**