



MAYSA COSTA ALVES

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DE CAFÉ (*Coffea arabica*
L.) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims.*
f. flavicarpa Deg.) COMO SUBSTRATOS NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
*Aspergillus niger***

**LAVRAS – MG
2015**

MAYSA COSTA ALVES

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims. f.
flavicarpa Deg.) COMO SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
CÍTRICO POR *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, para a obtenção de título de Mestre.

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

**LAVRAS – MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Maysa Costa.

Utilização de resíduos do processamento de café (*Coffea arabica* L.) e de maracujá (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg.*) como substratos na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* / Maysa Costa Alves. – Lavras: UFLA, 2015.

125 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. Café. 2. Maracujá. 3. Ácido cítrico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MAYSA COSTA ALVES

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ
(*Coffea arabica L.*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis Sims. f.*
flavicarpa Deg.) COMO SUBSTRATOS NA BIOSÍNTESE DE
ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, para a obtenção de título de Mestre.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2015

Dr. Carlos José Pimenta

UFLA

Dra. Sara Maria Chaulfoun

EPAMIG - UFLA

Dr. Luiz Roberto Marques Albuquerque

UNILAVRAS

Dr. Carlos José Pimenta

Orientador

LAVRAS-MG

2015

A Deus, por ter sido meu alicerce, permitindo, através de pequenos passos,
que eu alcançasse todos os meus objetivos.

Aos meus pais, por sempre acreditarem no meu potencial.

E a todos que torceram por mim nesta caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao meu orientador pela oportunidade, confiança e por ser um exemplo de profissional.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos meus amigos de laboratório por me receberem tão bem, me ajudando e participando deste trabalho.

Às técnicas Vicentina e Tina pelo apoio técnico.

Aos membros da banca, Sara Maria Chaulfoun e Luiz Roberto Marques Albuquerque pelo apoio e colaboração neste trabalho.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Ciência dos Alimentos pelo companheirismo, respeito e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de Mestrado, à EMBRAPA Café pelo financiamento do projeto, ao INCT – UFLA pela concessão da matéria prima utilizada neste trabalho e á todos os Laboratórios onde foram realizadas as análises.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.”

Aristóteles

RESUMO GERAL

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica no agronegócio brasileiro. Durante o beneficiamento dos grãos, são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. Durante o processamento dos grãos são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. Quando processado por via úmida, o café gera como resíduos a casca melosa e a água de lavagem. A casca do maracujá é composta pelo flavedo (parte com coloração) e albedo (parte branca), sendo este rico em pectina, (vitamina B3), ferro, cálcio, e fósforo. A destinação imprópria dos resíduos do processamento de certas frutas, como por exemplo, o maracujá, visto que é cultivado em larga escala em quase todo o Brasil implica em estudos para o uso desse subproduto, gerando produtos de alto valor agregado. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e otimizar a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em fermentação submersa utilizando na composição do meio de cultura, diferentes proporções de extrato da polpa de café e farinha da casca do maracujá. Os resíduos agroindustriais foram analisados quanto ao teor de açúcares redutores totais, sólidos solúveis e pH, mostrando o aumento que a farinha da casca do maracujá apresentou maior acidez e aumento no teor de açúcares em comparação com o extrato da casca melosa de café. Foi realizado um estudo da fermentação empregando-se diferentes variações de farinha da casca do maracujá e extrato da casca melosa de café. Na etapa de fermentação foi utilizado o isolado de *Aspergillus niger* (A. niger 00114). Durante a fermentação, foram analisados os teores de açúcares consumidos, pH, crescimento fungico (biomassa) e produção de ácido cítrico. Como resultado, verificou-se que a produção máxima de ácido cítrico pelo fungo foi de 10,21 (g.L⁻¹) no 4º dia de incubação em pH 3,44 para o meio contendo 70% de extrato da casca melosa de café e 30% de farinha da casca de maracujá, sendo este substrato considerado o mais eficaz na produção de ácido cítrico em comparação aos demais. Após a otimização do meio contendo 70% de extrato da casca melosa de café e 30% de farinha da casca de maracujá, a produção máxima de ácido cítrico foi de 11,82 (g.L⁻¹) em pH 1,88 e ocorreu no quarto dia de incubação. Assim, houve um aumento de 1,61 (g.L⁻¹) de ácido cítrico quando comparado ao mesmo meio de cultura não otimizado. Dessa forma, a otimização dos parâmetros do meio foi um fator importante para o aumento na produção de ácidos orgânicos e permitiu o estudo detalhado da influência de cada variável otimizada no produto final. Portanto, é possível a utilização desses resíduos agroindustriais para a produção de ácido cítrico.

Palavras-chave: Café. Maracujá. Fermentação. Ácido cítrico. *Aspergillus niger*.

GENERAL ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of major economic importance in the Brazilian agribusiness. During the processing of grain residues are generated, which are arranged inadequate forms on the environment. During the processing of grain residues are generated, which are arranged in shapes unsuitable environment. When processed by wet, coffee generates waste as the mellow peel and wash water. The bark of passion fruit is composed of flavedo (part with color) and albedo (white part), which is rich in pectin, (vitamin B3), iron, calcium, and phosphorus. Improper disposal of waste processing of certain fruits, such as passion fruit, since it is grown on a large scale in most of Brazil implies studies for the use of this by-product, generating high value added products. This study was to evaluate and optimize the production of citric acid by *Aspergillus niger* in submerged fermentation using the composition of the culture medium, different proportions of coffee pulp extract and flour of passion fruit peel. The agro-industrial residues were analyzed for their content of total reducing sugars, soluble solids and pH, showing the increase that the passion fruit peel flour showed higher acidity and increase in sugar content compared to the mellow bark extract of coffee. A fermentation study using different variations of passion fruit peel flour and coffee pulp extract was performed. In the fermentation step used was isolated from *Aspergillus niger* (A. niger 00114). During fermentation, the levels consumed sugars were measured pH, fungal growth (biomass) and citric acid production. As a result, it was found that the maximum production of citric acid by the fungus was 10.21 (gL⁻¹) on the 4th day of incubation at pH 3.44 for medium containing 70% syrupy coffee bark extract and 30 % of passion fruit peel flour, which is considered the most effective substrate in citric acid production compared to the others. After optimization of medium containing 70% of syrupy coffee husk extract and 30% of passion fruit peel flour, the maximum production of citric acid was 11.82 (g L⁻¹) at pH 1.88 and occurred in the fourth day of incubation. Thus, there was an increase of 1.61 (gL⁻¹) of citric acid compared to the same culture medium not optimized. Thus, through the optimization of the parameters is a key factor for the increase in the production of organic acids and enabled the detailed study of the influence of each variable on the optimized final product. Therefore, the use of such organic residues for the production of citric acid is possible.

Keywords: Coffee. Passion fruit. Fermentation. Citric acid. *Aspergillus niger*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do grão de café.....	21
Figura 2	Fórmula estereoquímica da celulose.....	25
Figura 3	Parede celular vegetal.....	26
Figura 4	Fórmula estereoquímica das hemiceluloses.....	27
Figura 5	Estrutura molecular da lignina.....	29
Figura 6	Morfologia do maracujá.....	33
Figura 7	Micrografia de <i>Aspergillus niger</i>	43
Figura 8	Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs.....	46
Figura 9	Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs.....	47
Figura 10	Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível.....	49

ARTIGO 1

Figura 1	Curvas de pH em função do tempo de fermentação para cada tratamento. (1) 100% café, (2) 90%Café 10% maracujá, (3) 80%Café 20% maracujá, (4) 70%Café 30% maracujá, (5) 60%Café 40% maracujá, (6) 50%Café 50% maracujá, (7) 40%Café 60% maracujá, (8) 30%Café 7.....	82
Figura 2	Curvas de Açúcar redutor total (ART) em função do tempo de fermentação para cada tratamento. (1) 100% café, (2) 90%Café 10% maracujá, (3) 80%Café 20% maracujá, (4) 70%Café 30% maracujá, (5) 60%Café 40% maracujá, (6) 50%Café 50% maracujá, (7) 40%Café 60%.....	85
Figura 3	Curvas de crescimento fungico (biomassa) em função do tempo de fermentação para cada amostra. (1) 100% café, (2) 90%Café 10% maracujá, (3) 80%Café 20% maracujá, (4) 70%Café 30% maracujá, (5) 60%Café 40% maracujá, (6) 50%Café 50% maracujá, (7) 40%Café 60.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção estimada do café safra 2012, em mil sacas de 60 kg	19
Tabela 2	Composição da casca melosa (em base seca)	23
Tabela 3	Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área escolhida da lavoura permanente de maracujá no ano de 2011	30
Tabela 4	Composição do maracujá in natura	31
Tabela 5	Composição centesimal da casca do maracujá amarelo	32
Tabela 6	Vantagens e limitações da CLAE	53

ARTIGO 1

Tabela 1	Porcentagens de extrato da casca melosa do café e farinha de maracujá	74
Tabela 2	Teores de ph sólidos solúveis (SST) e açúcares redutores totais (ART) das amostras padrão	78
Tabela 3	Evolução do ácido cítrico, pH e açúcar redutor total ao longo de 10 dias de fermentação para cada amostra usando resíduos do processamento de café e de maracujá	89

ARTIGO 2

Tabela 1	Teores de pH, ART, Ácido cítrico e Biomassa para o tratamento com 70% de extrato da casca melosa do e 30% de farinha da casca de maracujá após a otimização	116
----------	---	-----

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO 1

- Gráfico 1 Cinética de crescimento da cepa *Aspergillus Níger*.....90
- Gráfico 2 Comparação da produção de ácido cítrico para diferentes tratamentos em função do tempo de fermentação.....94

ARTIGO 2

- Gráfico 1 Comportamento do pH em função do tempo de fermentação antes e depois da otimização do meio de cultura.....114
- Gráfico 2 Produção de ácido cítrico durante a fermentação117
- Gráfico 3 Comparação de produção de ácido cítrico antes e depois da otimização do meio de cultura.....118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Café.....	18
2.1.1	Tipo de processamento e resíduos.....	19
2.1.2	Composição do fruto do café	21
2.1.3	Utilizações dos resíduos do café.....	24
2.2	Biomassa lignocelulósica.....	24
2.2.1	Celulose.....	25
2.2.2	Hemiceluloses.....	26
2.2.3	Lignina.....	28
2.2.4	Extrativos e outros compostos	29
2.3	Maracujá.....	29
2.3.1	Maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg.</i>).....	31
2.3.2	Morfologia	32
2.3.3	Características Físico-Químicas e Nutricionais.....	33
2.4	Avaliação físico-químicas da polpa e da farinha da casca do maracujá.....	33
2.4.1	Ácido ascórbico (AA)	34
2.4.2	Acidez titulável (AT)	34
2.4.3	Sólidos solúveis (SS)	35
2.5	Aproveitamento das cascas de maracujá amarelo.....	35
2.6	Resíduos sólidos.....	36
2.7	Ácidos orgânicos.....	37
2.8	Ácido cítrico.....	38
2.8.1	Produção de ácido cítrico	41
2.9	Matérias-primas.....	41
2.10	<i>Aspergillus niger</i>	43
2.10.1	Bioquímica da produção de ácido cítrico.....	44
2.10.2	Citrato sintase	48
2.11	Processos fermentativos	49
2.12	Fermentação Submersa	50
2.13	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	51
	REFERÊNCIAS	54

ARTIGO 1

1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1	Matérias-primas	73

2.2	Obtenção do extrato da casca melosa do café.....	73
2.3	Obtenção da farinha da casca do maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.</i>)	73
2.4	Tratamentos realizados	74
2.5	Microorganismo e método de inoculação	74
2.6	Descrição do experimento	75
2.7	Métodos analíticos	76
2.7.1	Açúcares redutores totais (ART)	76
2.7.2	pH	76
2.7.3	Sólidos solúveis totais (SST)	76
2.7.4	Biomassa	76
2.7.5	Determinação, identificação e quantificação de ácido cítrico	77
2.8	Análise estatística	77
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	Amostras padrão	78
3.2	Análises das amostras sem otimização do meio de cultura	81
3.2.1	pH	81
3.2.2	Efeito da concentração de açúcares	84
3.3	Crescimento fúngico (biomassa)	87
3.4	Produção de ácido cítrico	88
4	CONCLUSÕES	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS.....	98

ARTIGO 2

1	INTRODUÇÃO.....	108
2	MATERIAIS E MÉTODOS	110
2.1	Microorganismo	110
2.2	Meio de cultivo	110
2.3	Otimização do meio de cultura	110
2.4	Descrição do experimento	111
2.5	Métodos analíticos	111
2.5.1	Açúcares redutores totais (ART)	111
2.5.2	pH	112
2.5.3	Biomassa.....	112
2.5.4	Determinação, identificação e quantificação de ácido cítrico	112
2.6	Análise estatística	113
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
3.1	Análise das variáveis otimizadas.....	114
3.2	pH	114

3.3	Influência do nitrogênio, fósforo e metais traço com o aumento da produção de ácido cítrico	116
4	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUÇÃO

O café destaca-se como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais. A cafeicultura dá origem a um volume elevado de resíduos, gerados no processamento, como restos de colheitas dispostos de modo inadequado no meio ambiente, cuja utilização tem sido objeto de vários estudos. Para cada tonelada de grãos de café produzida, uma tonelada de cascas é gerada durante o processamento a seco (SAENGER et al., 2001). A casca melosa do café é o principal resíduo originado no processamento úmido do café maduro, representando aproximadamente 40% do peso seco do grão de café, sendo rico em carboidratos, proteínas, minerais e apreciáveis quantidades de taninos, cafeína e potássio. A casca melosa do café é ricas em nutrientes e compostos orgânicos, além de conter compostos como cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000a). Este resíduo, em geral, apresenta grande potencial, possibilitando a exploração econômica, mas, apesar da grande disponibilidade, existe pouca aplicação tecnológica para ele.

Dois diferentes processos são utilizados para o processamento do café que são a via seca, a qual processa o café na sua forma intacta, produzindo frutos secos, como café em coco ou café natural e a via úmida, no qual se retira a casca antes da secagem, podendo-se retirar ou não a mucilagem. Nos últimos anos, verifica-se uma tendência crescente para a utilização eficiente e adição de valor aos resíduos agroindustriais, como polpa e casca de café, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, bagaço de maçã, sabugo de milho, etc. (PANDEY et al., 2000a) e não apenas o descarte como ocorre na maioria dos casos. As cascas de maracujá são constituídas basicamente por carboidratos,

proteínas e pectinas, essa composição favorece o aproveitamento das mesmas para fabricação de doces, podendo ser uma alternativa viável para resolver problemas da eliminação dos resíduos, além de aumentar seu valor comercial (OLIVEIRA et al., 2002). A casca e as sementes de maracujá são comumente utilizadas na alimentação animal (SEAGRI, 2010). Mas segundo Córdova et al. (2005) estudos têm evidenciado as propriedades funcionais da casca, especialmente àquelas relacionadas ao teor e o tipo de fibra. Essas características e propriedades funcionais fazem com que a casca de maracujá não seja mais considerada um resíduo industrial, uma vez que pode ser utilizada na elaboração de novos produtos (RAMOS et al., 2007).

Diversos processos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais como matérias prima para a produção de produtos químicos a granel e produtos de valor agregado, tais como proteínas unicelulares, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários biologicamente ativos (PANDEY et al., 2000a). Aplicações de resíduos agroindustriais na obtenção de ácidos orgânicos oferecem uma alternativa para a possível falta de substratos e, por outro lado, ajuda a resolver o problema da poluição ambiental. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a viabilidade da utilização dos resíduos do café e maracujá para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* Pierre as que se destacam, economicamente, em todo o mundo. O café arábica (*Coffea arabica*) é o fruto de uma planta tropical de altitude adaptada a clima úmido com temperaturas amenas. As condições térmicas para a cultura encontram-se definidas pelas temperaturas médias anuais entre 18 °C e 23 °C (faixa ideal: 19 °C a 22 °C). O café robusta, *Coffea canephora*, oriundo de regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas, está adaptado a condições de temperatura com médias anuais entre 22 °C e 23 °C (ARGOLLO, 2004). O café destaca-se como um dos produtos agrícolas de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais (SAENGER et al., 2001).

A produção do café arábica representa 74,0% (32,19 milhões de sacas) da produção do país e tem como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 68,0% (21,88 milhões de sacas) de café beneficiado. O conilon participa na produção nacional com 26,0% de café beneficiado. O estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor dessa espécie, com 75,2% (8,49 milhões de sacas) de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012). Os dados das produções dos estados na safra de 2011 podem ser observados na Tabela 1, sendo os maiores produtores os estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo.

Tabela 1 Produção estimada do café safra 2012, em mil sacas de 60 kg

Região	Safr		
	Arábica	Robusta	Total
Minas Gerais	21.882	299	22.181
- Sul e Centro-Oeste	10.442	0	10.442
- Cerrado - Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste.	4.001	0	4.001
- Zona da Mata - Jequitinhonha, Mucuri, Rio Doce,	7.439	299	7.738
- Central e Norte.	0	0	0
Espírito Santo	3079	8494	11.573
São Paulo	3.111,5	0	3.112
Paraná	1.842	0	1.842
Bahia	1.548,9	741,1	2.290
- Cerrado	429	0	429
- Planalto	1.119,9	0	1.119,9
- Atlântico	0	741,1	741,1
Rondônia	0	1.428,3	1.428,3
Mato Grosso	11	126,8	137,8
Pará	0	184	184
Rio de Janeiro	247	13	260
Outros	467,1	9,5	476,6
Brasil	32.188,5	11295,7	43.484,2

Fonte: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2012)

A produção de Minas Gerais está estimada em 22.181.826 sacas de café, na safra 2012, com variação percentual de 3,37% para mais ou para menos. A produtividade média do estado atingiu 22,16 sacas de café por hectare. Em comparação com a safra anterior, a estimativa sinaliza uma redução da produção cafeeira em 11,82% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

2.1.1 Tipo de processamento e resíduos

O café, depois de colhido, pode ser processado por duas vias diferentes, a via úmida e a via seca. Em ambos os casos, o principal objetivo é secar o café o mais rápido possível, retirando água até níveis seguros para o armazenamento e o beneficiamento. Dependendo do método de processamento

do café cereja, ou seja, processo úmido ou seco, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, sendo esta casca melosa ou casca seca, respectivamente (PANDEY et al. 2000^a). O processamento do café gera resíduos que são pouco aproveitados, mesmo sendo ricos em nutrientes. Frutos de café maduros podem ser processados por três métodos distintos. O processo mais simples e rústico é o processamento a seco, que é utilizado para fermentar o café ao sol em plataformas e ou no cimento.

No processo úmido, a casca melosa e ou mucilagem são removidos mecanicamente e os grãos são fermentados em tanques, com um grande volume de água. O processo semiseco é uma variação do processo por via úmida, em que os frutos de café também têm a casca melosa extraída, mas o processo de fermentação ocorre diretamente em uma plataforma (VILELA et al., 2010).

O processo por via seca é a técnica mais simples e comum. Nele, os frutos são secos ao sol em terreiros ou recebem neles a pré-secagem, que é complementada em secadores mecânicos. Depois de secos, os grãos de café são levados a um descascador para a remoção do material que envolve os grãos de café, que são o produto de interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2001). Nesse procedimento, a mistura do cereja com o verde provoca perda de qualidade da bebida, pela diferença de umidade inicial em cada um deles. O processamento por via úmida representa um avanço para a qualidade final do produto obtido. Segundo Borem (2004), o processamento por via úmida pode ocorrer por três diferentes caminhos: primeiro, o descascado, quando apenas a casca e parte da mucilagem são retiradas em descascadores mecânicos; segundo, o desmucilado quando se remove a casca e, posteriormente, o máximo de mucilagem por abrasão (desmucilador mecânico) e, por último, o despoldado, quando se removem a casca mecanicamente e a mucilagem por fermentação biológica. Hoje em dia, há uma pressão política e social grande para reduzir a poluição resultante das atividades industriais. Quase todos os países

desenvolvidos e em desenvolvimento estão tentando se adaptar a esta realidade, modificando seus processos para que seus resíduos possam ser reciclados. Consequentemente, a maioria das grandes empresas já não descarta esses resíduos, mas sim os utiliza como matéria-prima para outros processos (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

2.1.2 Composição do fruto do café

A casca de café é oriunda da limpeza do café em coco, composta de epicarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho) e película prateada. A casca melosa é o resíduo da despolpa úmida do café cereja, composta de epicarpo e parte do mesocarpo (MATIELLO, 1991 apud BARCELOS et al., 2002). As diferenças básicas entre casca seca e a casca melosa de café é que a casca é obtida seca e contém o pergaminho, enquanto a casca melosa é úmida e não tem o pergaminho, pois esse fica envolto no grão de café, como forma de proteção. Na Figura 1 está ilustrado o grão de café.



Figura 1 Estrutura do grão de café

O café cereja, com base na matéria seca, pode ser dividido nas seguintes porções: 29% de polpa, 12% de pergaminho, 5% de filme prateado e 54% de grão (BRESSANI; ESTRADA; JARQUIN, 1972). Segundo os mesmos autores, obtiveram-se, na análise da polpa desidratada (em base seca), valores de 2,5% de extrato etéreo, 21,0% de fibra bruta, 11,2% de proteína bruta, 0,554% de cálcio, 0,116% de fósforo, 1,76% de potássio e 1,5% de cafeína. Resultados semelhantes foram encontrados por Elias (1978), em cujo trabalho a casca melosa de café apresentou 76,7% de umidade, e os teores em base seca, de 10% de proteína, 2,5% de extrato etéreo, 21% de fibras, 50% de carboidratos e 8% de cinzas.

Segundo Elias (1978), a fração de carboidratos é representada em base seca por: 27,65% de celulose, 12,40% de açúcares redutores, como a glicose, 2,02% de açúcares não redutores e um total de 6,52% de substâncias pécicas. O mesmo autor também encontrou na casca melosa de café, 17,5% de lignina e 3% de proteína lignificada, 1,80% a 8,56% de taninos, 2,6% de ácido clorogênico e 1,6% de ácido cafeico. Ulloa et al. (2004) determinaram, para a polpa de café, concentrações de 8% de proteína, 2,9% de extrato etéreo, 8,9% de cinzas, 28,6% de celulose, 2% de compostos fenólicos, 0,74% de taninos e 1,8% de cafeína.

Com relação à concentração da lignina, Barcellos et al. (2001) determinaram 11,70% para a casca melosa de café, ocorrendo diminuição em seus teores durante o armazenamento. Ulloa et al. (2004) encontraram valores de celulose variando entre 16,5% a 32,2%, de emicelulose 1% a 11,6% de lignina 12,2% a 20,5%. Avallone et al. (2000), encontraram as seguintes frações dos carboidratos na mucilagem: 29,6% de arabinose, 12,6% de xilose, 13,6% de galactose, 4,2% de ramanose e 30,5% de glicose, sendo esta mucilagem obtida por desmucilador mecânico, comprovando o alto teor de

açúcares que poderiam ser aproveitados em processos biotecnológicos.

Brum (2007) encontrou, para constituição da casca melosa de café obtida pelo processamento via úmida, os valores contidos na Tabela 2.

Tabela 2 Composição da casca melosa (em base seca)

Composição	Polpa
*Holocelulose (%)	52,50±0,30
Celulose (%)	25,90±0,30
Lignina insolúvel (%)	16,48±0,16
Lignina solúvel (%)	1,07±0,18
Hemicelulose (%)	26,60±0,30
**Extrativos (%)	26±1
Cinza (%)	9,65±0,03
Tanino condensado (%)	3,90±0,08
Nitrogênio (%)	1,85±0,06
P (%)	0,16±0
K (%)	3,65±0,06
Ca (%)	0,3±0
MG (%)	0,07±0
S (%)	0,018±0,010
B (ppm)	33,20±0,4
Cu (ppm)	13,55±0,35
Mn (ppm)	32,95±0,05
Zn (ppm)	9,25±0,25
Fe (ppm)	172,30±5,9

Fonte: Brum (2007) *Holocelulose= celulose + hemicelulose

** Extrativos= frações solúveis em água e em álcoois

Revisando a literatura relacionada ao assunto, verifica-se a existência de divergências entre os dados de diferentes trabalhos, o que é explicado pela grande variedade de cultivares, condições de cultivo e tipo de processamento, entre outros fatores. A polpa do café e a casca obtidas durante a transformação do café cereja pelos processos úmido ou seco, respectivamente, contêm quantidades de cafeína, taninos e materiais orgânicos, o que os torna tóxicos em sua natureza, quando descartados no

meio ambiente. No entanto, sendo rico em matéria orgânica, este substrato torna-se interessante para processos microbianos no intuito de obter produtos de valor agregado (PANDEY et al., 2000^a).

2.1.3 Utilizações dos resíduos do café

Tradicionalmente, a casca melosa do café têm se limitado a apenas aplicações como fertilizantes, alimentação de animais e compostagem, entre outras utilizações mais simples. Nestas aplicações, utiliza-se somente uma pequena fração do resíduo gerado durante o processamento do café e não são tecnicamente muito eficientes. O foco atual é em aplicações desse substrato em bioprocessos. Tentativas têm sido feitas para aprimorar as formas de utilização tradicionais e obter novas formas de utilização da polpa e casca do café, como, por exemplo, a eliminação de compostos tóxicos (compostos fenólicos, taninos, cafeína) e, posteriormente, a utilização na alimentação animal, o uso com eficiência do substrato para a produção de produtos com valor agregado como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, *flavour* e aroma de certos compostos, entre outros.

Estes resíduos, por possuírem quantidade elevada de açúcares fermentescíveis, constituem um substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (PANDEY et al., 2000a). Os avanços na biotecnologia industrial oferecem melhores oportunidades para aproveitamento econômico de resíduos agroindustriais, como a casca melosa do café (PANDEY et al., 2000a).

2.2 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. São constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de

90% da massa seca total. São elas: celulose, hemiceluloses e lignina (PANDEY et al., 2000). Além destes compostos estruturais, os materiais lignocelulósicos contêm outros compostos minoritários, como cinzas, proteínas e compostos fenólicos, entre outros.

2.2.1 Celulose

A celulose (Figura 2), constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glucose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), apresentando um grau de polimerização de até 10.000 unidades de glicose.

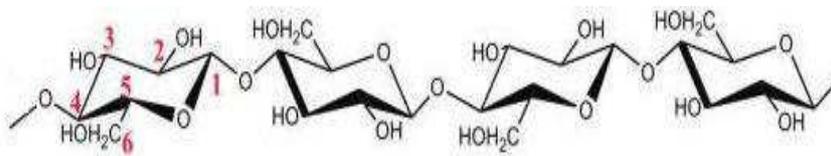


Figura 2 Fórmula estereoquímica da celulose

Fonte: (ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011)

A estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta a agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (DING; HIMMEL, 2006; MATTHEWS et al., 2006; VAN SOEST, 1994). Como pode ser visto na Figura 3, existe uma íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina), de tal modo que impõe

dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes da celulose na forma de monômeros com elevado grau de pureza (SUN; CHENG, 2002).

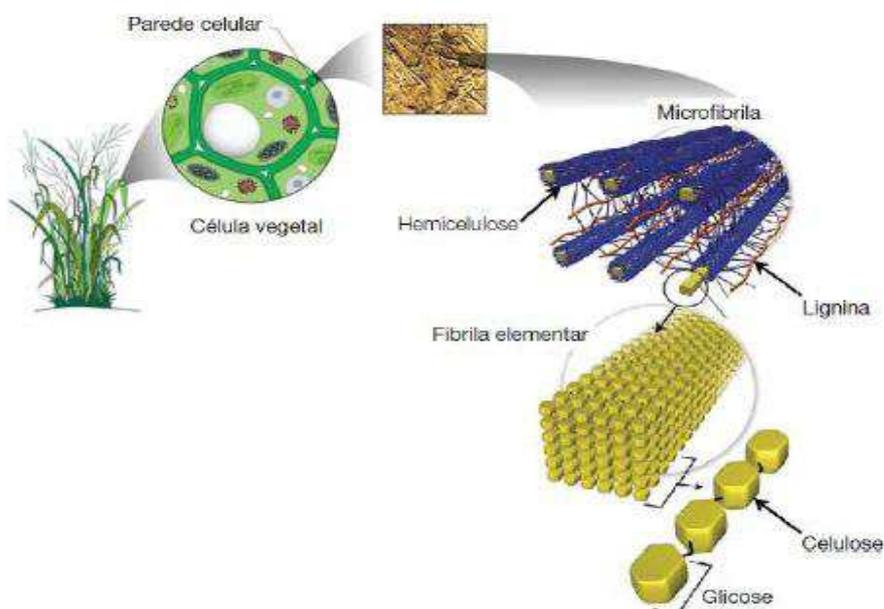


Figura 3 Parede celular vegetal

Fonte: US Department of Energy Genome Programs adaptado por CANILHA et al. (2010)

2.2.2 Hemiceluloses

Outro constituinte das plantas são as polioses ou hemiceluloses (Figura 4), que não constituem uma única substância, mas, sim, uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com celulose e a lignina. As unidades de açúcares que formam as polioses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses e deoxi-hexoses e ácidos hexurônicos (SAHA et al., 2003).

Hemiceluloses são polímeros de açúcares representando, em geral, de 15% a 35% da biomassa da planta e que podem conter pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glicurônico, α -D-4-O- α e metilgalacturonic-D-galacturônico ácidos). Outros açúcares, como a α -L-ramnose e α -L-fucose, também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos de hidroxila destes açúcares podem ser parcialmente substituídos com grupos acetil (GIRIO et al., 2010). Hemicelulose é um grande grupo de polissacarídeos encontrados nas paredes celulares primárias e secundárias das plantas em toda a Terra. Elas são classificadas como material solúvel em solução alcalina após a remoção de substâncias pécicas e têm grau de polimerização muito menor, comparada com a de celulose (XIAO; SUN; SUN, 2001). De acordo com Saha et al. (2003), hemiceluloses em resíduos agrícolas consistem, principalmente, de unidades de xilose e arabinose.

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

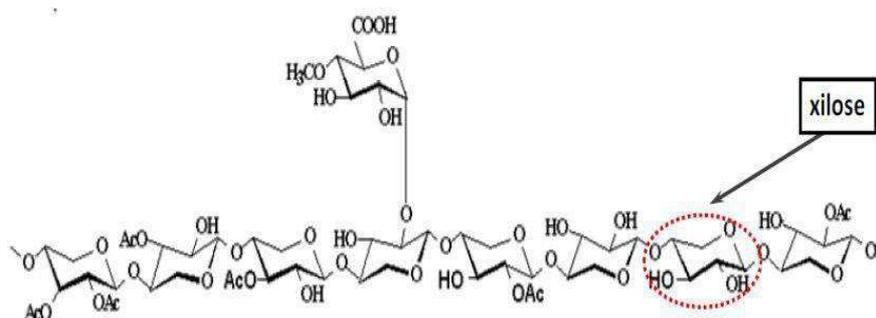


Figura 4 Fórmula estereoquímica das hemiceluloses

Fonte: (ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011)

2.2.3 Lignina

A lignina (do latim *lignum* que significa madeira), também conhecida como lenhina, é uma molécula tridimensional (Figura 5) amorfa observada nas plantas terrestres, em associação com a celulose na parede celular, de natureza polimérica e tridimensional, com finalidade de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência contra ataques biológicos aos tecidos vegetais. Esta molécula é o terceiro componente mais importante encontrado na madeira, correspondendo a 15 a 35% de seu peso. Conclui-se que a lignina é resultante do metabolismo da planta, pois quando o processo de lignificação é completado, geralmente coincide com a morte da célula, formando o chamado tecido de resistência.

A lignina é formada apenas em plantas vasculares, que desenvolvem tecidos especializados em funções como o transporte de soluções aquosas e suporte mecânico. Ou seja, possui como função proteger os componentes vasculares da planta, pois reduz a permeabilidade da parede celular à água, protegendo a madeira contra microrganismos (agindo como um fungicida) e dá suporte para a árvore, suportando sua copa a muitos metros de altura (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Sua estrutura química não foi totalmente elucidada ainda, principalmente pelo fato de sofrer alterações drásticas durante o processo de seu isolamento da madeira. Além disso, a lignina está covalentemente ligada à celulose e outros polissacarídeos da parede celular. Em sua composição química estão presentes apenas carbono, hidrogênio e oxigênio. Em geral é formada por três alcoóis de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapril. Suas proporções variam com a espécie, as estruturas vegetais e ainda, nas camadas de uma única parede celular (KUHAD; SINGH; ERIKSON, 97).

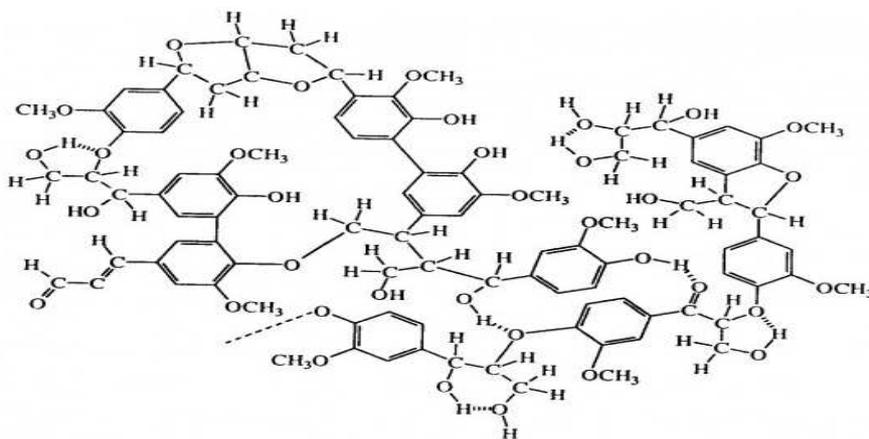


Figura 5 Estrutura molecular da lignina
 Fonte: (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997)

2.2.4 Extrativos e outros compostos

Os componentes de menor massa molecular, presentes na biomassa lignocelulósica, incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe abrange materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis em água e solventes orgânicos (RALPH, J., HELM, R.F., 1993).

2.3 Maracujá

Originário da América tropical, o maracujá é largamente cultivado e processado em todo mundo. O Brasil é o maior produtor mundial, com produção de 480 mil toneladas e área de aproximadamente 36 mil hectares. A Bahia é o

principal produtor, seguido por Espírito Santo, Pará, Minas Gerais, Sergipe, São Paulo e Ceará (IBGE, 2011), conforme demonstrado na (Tabela 3).

Cerca de 150 espécies de Passiflora são nativas do Brasil, das quais mais de 60 produzem frutos, que podem ser aproveitados direta ou indiretamente como alimento.

Tabela 3 Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área escolhida da lavoura permanente de maracujá no ano de 2011

Brasil, Região Geográfica e Unidade da Federação	Quantidade produzida (Toneladas)	Valor da produção (Mil Reais)	Área plantada (Hectare)	Área colhida (Hectare)
Brasil	479.813	309.939	35.856	35.820
Norte	51.077	21.000	5.118	5.104
Rondônia	1.631	788	210	209
Acre	472	370	70	59
Amazonas	904	163	307	305
Roraima	-	-	-	-
Pará	45.297	18.114	4.168	4.168
Amapá	1.052	709	201	201
Tocantins	1.721	856	162	162
Nordeste	244.343	161.373	19.553	19.553
Maranhão	219	179	34	34
Piauí	169	143	16	16
Ceará	40.261	32.885	2.032	2.032
Rio Grande do Norte	2.879	2.116	277	277
Paraíba	6.072	4.101	819	819
Pernambuco	7.803	6.090	722	722
Alagoas	5.504	1.961	566	566
Sergipe	41.526	30.284	4.330	4.330
Bahia	139.910	83.614	10.757	10.757
Sudeste	151.096	107.291	8.593	8.586
Minas Gerais	44.025	26.554	3.063	3.063
Espírito Santo	51.070	44.038	2.097	2.097
Rio de Janeiro	15.012	10.095	1.052	1.052
São Paulo	40.989	26.603	2.381	2.374
Sul	13.714	9.384	1.021	1.021
Paraná	8.531	7.034	626	626
Santa Catarina	5.183	2.350	395	395
Rio Grande do Sul	-	-	-	-
Centro-Oeste	19.583	10.891	1.571	1.556
Mato Grosso do Sul	546	507	42	42
Mato Grosso	4.283	1.956	191	191
Goiás	13.212	6.744	1.223	1.223
Distrito Federal	1.542	1.684	115	100

Fonte: IBGE (2011)

2.3.1 Maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg.*)

A espécie *Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg.*, ou seja, o maracujá azedo ou amarelo é a principal espécie explorada comercialmente sendo cultivada em quase todo o território nacional, destacando-se como principais produtores os estados do Pará, Bahia, Sergipe, São Paulo e Minas Gerais que, juntos, são responsáveis pela liderança brasileira na produção mundial dessa fruta (CEPLAC, 2010).

O maracujá amarelo possui a película externa amarela, casca branca, formato arredondado, polpa ácida, suco amarelo a amarelo-alaranjado. É o mais cultivado no mundo, responsável por mais de 95% da produção do Brasil (CEPLAC, 2010). É utilizado na elaboração de vários produtos existentes no mercado, resultando na produção de grande quantidade de sementes e cascas, as quais representam mais da metade do peso total do fruto (Tabela 4).

Tabela 4 Composição do maracujá in natura

MARACUJÁ	Componente (%)
Casca	50,3
Suco	23,2
Sementes	26,2

Fonte: Ferrari, Colussi e Ayubi (2004).

A casca do maracujá é rica em aminoácidos, proteínas e carboidratos, contendo ainda 10 a 20% de pectina de qualidade semelhante a da laranja. A pectina do maracujá é constituída de 76 a 78% de ácido galacturônico, 9% do grupo metoxila, um pouco de galactose e arabinose; tem propriedades geleificantes e pode ser comparada à pectina dos citros, sendo utilizada como ingrediente funcional na formulação de geléias e sobremesas (MANICA, 1981).

A Tabela 5 apresenta os resultados da composição centesimal da casca de maracujá amarelo obtidos por Martins, Guimarães e Pontes (1985) e Oliveira et al. (2002). As variações de seus constituintes são aceitáveis, pois dependem principalmente do estágio de maturação do fruto, tendo em vista que o amadurecimento leva a perda de umidade, o que acarreta na concentração dos demais constituintes, além de outros fatores, tais como local de plantio e as condições genéticas das plantas.

Tabela 5 Composição centesimal da casca do maracujá amarelo

CONSTITUINTES	CASCA DO MARACUJÁ ¹	CASCA DO MARACUJÁ ²
Umidade (%)	89,08	78,73
Cinzas (%)	0,92	1,61
Lípidos (%)	0,70	0,51
Proteínas (%N x 6,25)	1,07	2,28
Fibras (%)	n.r.	4,35
Carboidrato (%)	8,23	n.r.
Cálcio (mg Ca/100g)	n.r.	10,98
Ferro (mg Fe/100g)	n.r.	3,20
Fósforo (mg P ₂ O ₅ /100g)	n.r.	36,36

¹OLIVEIRA et al., 2002.

²MARTINS et al., 1985. n.r. = análise não realizada.

Cascas e sementes de maracujá são utilizadas por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda sem muita informação técnica adequada. Como este volume representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes resíduos é de interesse econômico, científico e tecnológico (FERRARI, COLUSSI e AYUB, 2004).

2.3.2 Morfologia

O maracujá-amarelo é constituído basicamente de epicarpo ou casca, mesocarpo (parte branca) com espessura que varia de 0,5 a 4,0 cm, arilo carnoso, endocarpo ou polpa e semente, conforme ilustrado na Figura 6.

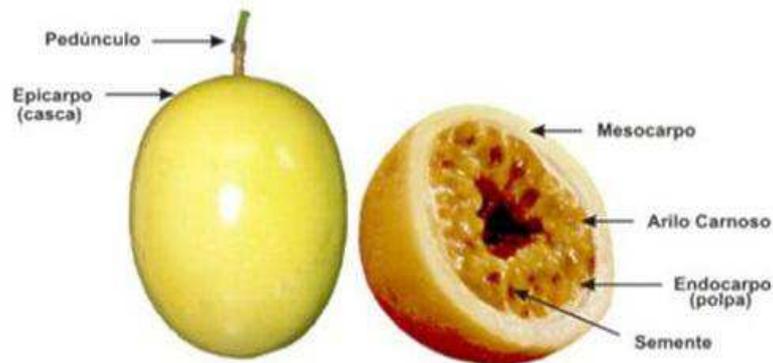


Figura 6 Morfologia do maracujá

Fonte: FAEPE- Federação da agricultura do estado do Paraná, 2007

2.3.3 Características Físico-Químicas e Nutricionais

A casca é constituída por carboidratos, proteínas e pectina. Também apresenta niacina (vitamina B3), ferro, cálcio, e fósforo (GOMES, 2004). Segundo Córdova et al. (2005) a niacina em humanos atua no crescimento e na produção de hormônios, e previne problemas gastrointestinais. A utilização de farinha de casca de maracujá na dieta possui o poder de ajudar em tratamentos com diabéticos e dislipidêmicos já que possui o efeito no controle da glicemia e controle do colesterol LDL. Desta maneira, a farinha da casca do maracujá também poderia se constituir em uma complementação financeira para o pequeno produtor rural, além da conveniência do produto final, pois não exige do consumidor nenhum tipo de preparo (REOLON, 2008).

2.4 Avaliação físico-químicas da polpa e da farinha da casca do maracujá

2.4.1 Ácido ascórbico (AA)

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é sintetizada nas plantas e na maioria dos animais. Contudo os seres humanos, dentre outros primatas não possuem a enzima capaz de biossintetizar a vitamina, sendo necessária a ingestão de alimentos fontes desse nutriente (KRAUSE, 2005). O ácido ascórbico é a vitamina que se degrada mais facilmente, comparando-se com outras vitaminas. Ela é estável apenas em meio ácido, na ausência de luz, oxigênio e calor, sendo que os fatores que favorecem a sua degradação são os meios alcalinos, oxigênio, calor, ação da luz, metais, como Fe, Cu e Zn, e a enzima oxidase do ácido ascórbico (OLIVEIRA et al., 1999).

2.4.2 Acidez titulável (AT)

Altos teores de ácidos no suco revelam uma característica importante no que diz respeito ao processamento, pois é interessante que os frutos possuam elevada acidez, visto que isso diminuiria a adição de acidificantes no suco. Do ponto de vista industrial o elevado teor de AT diminui a necessidade de adição de acidificantes e propicia melhoria nutricional, segurança alimentar e qualidade organoléptica (ROCHA et al., 2001). A literatura descreve que a acidez do maracujá tende a diminuir com o amadurecimento do fruto, conforme confirmado pelos resultados do trabalho (POCASANGRE, 1995). A redução progressiva da acidez total, durante o amadurecimento da fruta, está relacionada ao processo de respiração (AMARO, 2002). Como consequência da evolução do fruto a redução do teor de ácidos nos frutos de maracujazeiro amarelo é visto como um indicativo do seu amadurecimento (VIANNA et al., 2005).

A utilização dos ácidos orgânicos como substrato respiratório não é avaliada como fonte primária (VIANNA et al., 2010), visto que, é função da disponibilidade de outros substratos mais simples, como a glicose, frutose e sacarose, e de reserva, como o amido.

2.4.3 Sólidos solúveis (SS)

Os sólidos solúveis são constituídos por compostos solúveis em água, que representam substâncias, tais como açúcares, ácidos, vitamina C e algumas pectinas. Medidos por refratometria, são usados como índice dos açúcares totais em frutos, indicando o grau de maturidade. Vale ressaltar que o teor de sólidos solúveis pode variar com a quantidade de chuva durante a safra, fatores climáticos, variedade, solo, etc, além, é claro, há que se considerar que durante o processamento, alguns produtores adicionam água para facilitar o processamento, levando à condição de abaixamento do teor de sólidos solúveis no produto final (OLIVEIRA et.al., 1999).

A indústria de alimentos usa o teor de sólidos solúveis totais como um parâmetro que tem sido utilizado como indicador da qualidade dos frutos, havendo preferência por frutos com teores de sólidos solúveis superiores a 13°Brix (BRUCKNER et al., 2002). A comercialização do suco é feita com o suco natural (14° Brix) ou concentrado (50° Brix). Apesar da comercialização do maracujá processado com polpa, geleia e néctar representa um mercado muito pouco significativo atualmente, quando comparado ao do suco (MELETTI, 1996).

Oliveira et al. (1994) considera que, para a agroindústria, os frutos precisam apresentar elevado rendimento de suco, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis totais elevados. No entanto, para mercado in natura, são preferidos frutos mais doces e menos ácidos.

2.5 Aproveitamento das cascas de maracujá amarelo

Os resíduos sólidos da industrialização de alguns produtos agrícolas no Brasil, como os de frutos, normalmente são destinados à ração animal. Entretanto partir da década de 1980 ganha força o aproveitamento de resíduos de frutas

principalmente de cascas, que podem ser utilizadas na alimentação humana, como no desenvolvimento de geleias e doces (CARVALHO et al., 2005).

Segundo Córdova et al. (2005) o estudo dos teores de fibras (solúvel, insolúvel, bruta e alimentar) e das propriedades físico-químicas do maracujá amarelo é importante para se explorar a potencialidade do uso da casca da fruta como ingrediente de novos produtos. Segundo Carvalho (2005), o processo de desidratação aplicado ao mesocarpo de maracujá, permite a obtenção de um produto final com satisfatória aceitação sensorial, além de ser rico em pectina.

Assim poderia se constituir em uma complementação financeira para o pequeno produtor rural, além da conveniência do produto final, pois não exige do consumidor nenhum tipo de preparo. Em 2000, 127,7 mil toneladas de fruto de maracujá foram processadas segundo a Associação das Indústrias processadoras de Frutos Tropicais (ASTN). Isso gerou 51 mil toneladas de casca fresca, que desidratadas gerariam 10,2 mil toneladas de casca seca.

Com processo de extração adequado, forneceriam cerca de mil toneladas (10 % de rendimento) se houvesse o aproveitamento de toda pectina presente na casca (MIN, 2005). Gondim et al. (2005) em trabalho realizado para determinação de análise centesimal e de minerais em cascas de frutas verificaram que as cascas apresentavam em geral teores de nutrientes maiores que de suas respectivas partes comestíveis. Considerando assim que as cascas podem ser fontes alternativas de alimentos, uma alternativa para a casca seria a fabricação de um pó por meio da moagem da parte comestível de vegetais, podendo sofrer previamente processos tecnológicos adequados.

2.6 Resíduos sólidos

A tendência do aproveitamento integral de resíduos é uma necessidade cada vez maior na indústria moderna em nível mundial, especialmente quando

esta deve desenvolver sistemas de gestão ambiental baseados na ISO 14000 (KAWABATA, 2008).

A destinação imprópria para os resíduos do processamento de certas frutas como exemplo, o maracujá, visto que é cultivado em larga escala em quase todo o Brasil, gera uma expressiva quantidade de resíduos (cascas mais sementes) produzidos por toneladas de suco. O incentivo de aproveitamento desses resíduos somente será possível estimulando o desenvolvimento de pesquisas, que ainda são em número insignificante para o setor (DURIGAN; YAMANAKA, 1987 citado por OLIVEIRA et al., 2002). Uma alternativa para o aproveitamento das cascas de maracujá é a produção de ácidos orgânicos, mais especificamente, o ácido cítrico por fungos do gênero *Aspergillus*.

2.7 Ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos por processos biotecnológicos é muito evidenciada, principalmente com a utilização de micro-organismos mais especificamente fungos do gênero *Aspergillus*. Os ácidos orgânicos são amplamente usados na indústria de alimentos como aditivos. Como agentes de processamento, são adicionados para controlar a alcalinidade de muitos produtos podendo agir como tampões ou simplesmente como agentes neutralizantes. Como conservantes, podem atuar desde agentes antimicrobianos até antioxidantes (P. R. ASHURST, 2005). Os acidulantes, juntamente com os edulcorantes, devem proporcionar um sabor agridoce a certos sumos comerciais. Porém, dependendo do composto usado, a adição de certos ácidos orgânicos tem outros fins, como baixar o pH para evitar a degradação por parte de certos microrganismos e podem ser também utilizados como intensificadores de sabor, dependendo dos outros componentes presentes.

Não só a acidez dos alimentos é alterada pelos compostos acidulantes, essas

substâncias também desempenham outras funções como regulador de pH, atuando como tampão nas mais diversas etapas do processamento de alimentos e diminuindo a resistência de microrganismos; agente flavorizante, disfarçando gostos desagradáveis de outras substâncias e tornando o alimento mais saboroso; conservadores, controlando o crescimento e desenvolvimento de bactérias patogênicas e seus esporos (P. R. ASHURST, 2005). Além disso, os acidulantes impedem o escurecimento dos alimentos, modificam a textura de confeitos, realçam a cor vermelha das carnes, contribuem para a extração da pectina e pigmentos de frutas e vegetais, alteram o sabor doce em alguns alimentos, evitam a cristalização indesejada do açúcar, potencializam a ação conservante do grupo benzoato e estabilizam o ácido ascórbico (P. R. ASHURST, 2005).

2.8 Ácido cítrico

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio é um ácido orgânico fraco usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas. Em bioquímica, é importante o seu papel como intermediário do ciclo do ácido cítrico, de forma que ocorre no metabolismo de quase todos os seres vivos.

O ácido cítrico é obtido na indústria graças à fermentação da sacarose realizada por um microorganismo chamado *Aspergillus niger*. O processo de obtenção apresenta várias fases como a preparação do substrato de melaço, a fermentação aeróbica da sacarose pelo *Aspergillus*, a separação do ácido cítrico do substrato por precipitação ao adicionar hidróxido de cálcio, ou cal apagada, para formar citrato de cálcio e, depois, é adicionado ácido sulfúrico para decompor o citrato de cálcio. A eliminação das impurezas é realizada com carvão ativado ou resinas de troca iônica, continuando com a cristalização do ácido cítrico, secagem ou desidratação e o empacotamento do produto.

A produção de ácido cítrico depende principalmente do potencial de síntese do microorganismo utilizado, porém as condições do processo e a composição do meio fermentativo são variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover um acréscimo no rendimento (MILLIS, 1985). Desde 1930, segundo Uchimura (2007), existe a preocupação sobre os mecanismos bioquímicos que provocam a acumulação de ácido cítrico no meio de cultivo com esses microorganismos. O ácido cítrico só se acumula de duas maneiras: ou quando vários nutrientes estão presentes em altas concentrações (açúcar, acidez, oxigênio) ou quando estão em níveis abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato). Várias situações bioquímicas parecem cooperar na produtividade em ácido cítrico. Por causa disso, nem sempre a influência de fatores individuais pode ser determinada sem que haja influência sobre outros fatores. Sendo o ácido cítrico um produto químico amplamente utilizado no mercado de consumo, faz-se necessário a utilização de matérias primas de baixo custo e fácil utilização para a produção industrial.

A descoberta do ácido cítrico é atribuída ao alquimista islâmico Jadir Ibn Hayyan no oitavo século depois de Cristo. Os eruditos medievais na Europa conheciam a natureza ácida dos sumos de limão e da lima; tal conhecimento está registrado na décima terceira enciclopédia *Speculum Majus*, recompilada por Vincent de Beauvais. 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. A produção de ácido cítrico a nível industrial começou em 1860, baseado na indústria italiana dos cítricos.

Em 1893, Wehmer mostrou pela primeira vez que o microorganismo "*Citromyces*" (atualmente chamado de *Penicillium*) produzia ácido cítrico em um meio de cultura com açúcares e sais inorgânicos. Entretanto, a produção microbiana do ácido cítrico não chegou a ser industrialmente importante até a primeira guerra mundial, que interrompeu as exportações italianas de limões. Depois disso, foram

encontrados muitos outros fungos e leveduras com essa mesma capacidade.

Com o aumento da importância comercial do ácido cítrico, o limão italiano estabeleceu-se como monopólio durante boa parte do século XIX, perdendo espaço somente a partir de 1919, quando foi posto em funcionamento na Bélgica o primeiro processo industrial de obtenção do ácido cítrico a partir da fermentação promovida pelo fungo *Aspergillus niger*. No processo original, o ácido cítrico era obtido da seguinte forma: o suco da fruta cítrica era extraído, concentrado e filtrado. Depois, era colocado em contato com uma solução concentrada de amoníaco, resultando na formação de citrato de amônio, substância bastante solúvel em água. Esse citrato de amônio era então posto em contato com cloreto de cálcio, resultando na formação de citrato de cálcio, um sólido pouco solúvel, que precipitava. A solução era novamente posta para filtrar. O sólido retido durante a filtração era então misturado com ácido sulfúrico a 25 %, resultando na regeneração do ácido cítrico, que é solúvel, e de sulfato de cálcio, que é insolúvel. Após uma nova filtração, separa-se o sólido da solução desejada de ácido cítrico. A purificação do ácido cítrico finalizava então com uma etapa de cristalização (UCHIMURA, 2007).

Em 1917, o químico americano James Currie descobriu que algumas cepas de *Aspergillus niger* se desenvolviam em abundância quando colocadas em meios nutritivos com alto teor de açúcares, sais minerais e um pH inicial de 2,5-3,5 e que, durante esse desenvolvimento, ocorria uma grande excreção de ácido cítrico por parte dos microorganismos. Essa descoberta de Currie foi a base para a produção industrial de ácido cítrico nos Estados Unidos, e a partir de 1923, pela empresa Pfizer que começou a produção em escala industrial usando esta técnica anos mais tarde. Aproximadamente 70 % do ácido cítrico produzido é utilizado na indústria alimentícia e de bebidas, 12 % na indústria farmacêutica e 18 % é destinado a outros usos industriais (CERADA & LEONEL, 1995; UCHIMURA, 2007).

2.8.1 Produção de ácido cítrico

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente obtido através de processos de biossíntese utilizando como agente biológico o fungo imperfeito *Aspergillus niger*. Dois processos são utilizados na biossíntese deste ácido, o de superfície e o submerso, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do microorganismo (LEONEL & CERADA, 1995).

Existem muitos fungos produtores de ácido cítrico: *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium luteum*, *Aspergillus clavatus*. São de interesse industrial as espécies que permitem altos rendimentos de produção de ácido cítrico, entre estes os fungos do gênero *Aspergillus* são muito empregados para este propósito (LIMA et al., 2001).

Para que a obtenção do ácido cítrico seja viável comercialmente, vários fatores devem ser levados em consideração no processo fermentativo, como por exemplo, os constituintes do meio de cultivo, o pH, a aeração, a temperatura e o microorganismo empregado (YOKOYA, 1992; KOLICHESKI, 1995; TIMEIS, 2000). Os fungos filamentosos além de sintetizar o ácido cítrico, também secretam uma grande variedade de enzimas extracelulares como protease, amilase, celulasas, lípases entre outras.

2.9 Matérias-primas

Antigamente o ácido cítrico era produzido por fermentação, apenas da sacarose, mas hoje em dia os substratos mais utilizados são: a sacarose, o melão, o caldo de cana-de-açúcar, os melaços cítricos e vários outros hidrolisados (NEHAD, 2002). Uma larga variedade de outras matérias-primas pode ser utilizada para produção de ácido cítrico por fermentação (Tabela 6).

Tabela 6 Matérias-primas usadas na produção de ácido cítrico

Matéria-prima	Tipo de fermentação	Rendimento %
Resíduo de algodão	Superfície	-
Raiz de <i>Asphodelus aestivus</i>	Superfície	-
Açúcar de beterraba	Superfície	40-60 ^a
Resíduo de cervejaria	Superfície e Submerso	78,5 ^a e 42-58 ^a
Hemicelulose da madeira	Submerso	-
Hidrolisado de bagaço de cana de açúcar	Submerso	60 ^a
Polpa de maçã	Estado sólido(SSF)	88 ^a
Polpa de uva	SSF	60 ^a
Casca de fruta de kiwi	SSF	60 ^a
Resíduo de abacaxi	SSF	50-60 ^a

a- Baseado em açúcar consumido. Fonte: Grewal et al. (1995)

Além dos substratos citados, vários trabalhos têm sido publicados demonstrando a utilização de matérias-primas alternativas. Os materiais lignocelulósicos constituem um recurso renovável amplamente distribuído na natureza, e vêm sendo intensamente estudados para a obtenção de energia e conversão em produtos de interesse industrial. Com o constante desenvolvimento dos métodos de pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é possível que se obtenham, a partir desses materiais polissacarídeos, hidrolisados com altas concentrações de açúcares fermentescíveis (MIYAFUJI et al., 2003).

De acordo com Dale (1987), os custos de vários produtos resultantes de processos fermentativos dependem muito do custo da fonte de carboidratos. Segundo este, a conversão da lignocelulose oferece potencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis de menor custo.

2.10 *Aspergillus niger*

Conforme Wainwright (1995) existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Suas colônias podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde.

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentosso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2000) citado por PRADO (2002), o *Aspergillus niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação (Figura 7).

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (PANDEY et al.,1999).

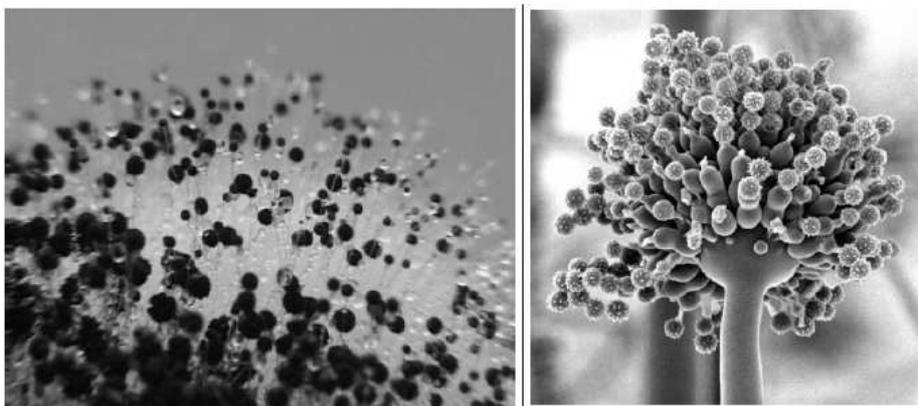


Figura 7 Micrografia de *Aspergillus niger*
Fonte: SCHMIDELL (2001)

A produção de ácido cítrico depende principalmente do potencial de síntese do micro-organismo utilizado, porém as condições do processo e a composição do meio fermentativo são variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover um acréscimo no rendimento (MILLIS, 1985). As principais vantagens no uso de *Aspergillus niger* são as facilidades de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de ácido cítrico (YOKOYA, 1992).

Vários fatores podem afetar o processo de produção de ácido cítrico, dentre os quais os mais estudados são a concentração de íons metálicos, tipo de substrato (melaço ou sacarose), quantidade e idade do inóculo. A presença de metais como contaminantes nas matérias-primas utilizadas como substrato constitui o principal problema na fermentação cítrica. Além disso, em alguns produtos encontram-se substâncias inibidoras e/ou promotoras de crescimento, a maioria pouco conhecidas ou analisadas. Algumas técnicas são usadas para remover ou neutralizar a inibição por esses contaminantes entre elas está a adição de ferrocianato de potássio e metanol. O nitrogênio tem influência na síntese de enzimas que regulam o ciclo de Krebs na via glicolítica, e o carbono na formação de produto e biomassa. Entretanto observa-se que poucos estudos foram desenvolvidos para verificar a influência das fontes de nitrogênio na produção de ácido cítrico (PANDA et al., 1984). Para atender as necessidades nutricionais dos microorganismos, a fim de que o produto desejável possa ser sintetizado, normalmente há a necessidade de enriquecer o meio com uma fonte de nitrogênio.

2.10.1 Bioquímica da produção de ácido cítrico

O ácido cítrico é elaborado e excretado em meios de cultura cujo pH esteja próximo de 1,8 a 2,0. A degradação da glicose (glicólise, sequência de reações bioquímicas catalisadas por enzimas específicas) produz energia e

metabólitos. O produto final da glicólise é o ácido pirúvico que, na presença de oxigênio é metabolizado em acetil-CoA. Durante a fermentação do ácido cítrico duas vias têm evidências, a EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), também chamada de via glicolítica e a do HMP (monofosfato de hexose) (YOKOYA, 1992). Na fermentação com *Aspergillus niger* ambas as vias são usadas durante todo o tempo. A de maior atividade durante a fase de crescimento, quando pouco ácido cítrico é produzido, é a HMP. Já a via EMP, cuja maior atividade ocorre durante a fase vegetativa, desempenha o principal papel na glicólise da fermentação cítrica, pois é através dela que a maior parte do citrato é formada (YOKOYA, 1992; PANDEY et al., 2001).

A via glicolítica tem duplo papel: degradação da glicose para geração de ATP e fornecimento de elementos para biossínteses celulares. A velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades. Em condições aeróbias, o piruvato gerado da glicose sofre descarboxilação oxidativa formando acetil-CoA. O acetil CoA derivado da via EMP condensa-se com o oxalacetato para formar citrato (figura 8). Acredita-se que a entrada desse composto no ciclo de Krebs seja abortada, devido à excessiva acidez do meio (pH próximo de 2) (YOKOYA, 1992; PANDEY et al., 2001).

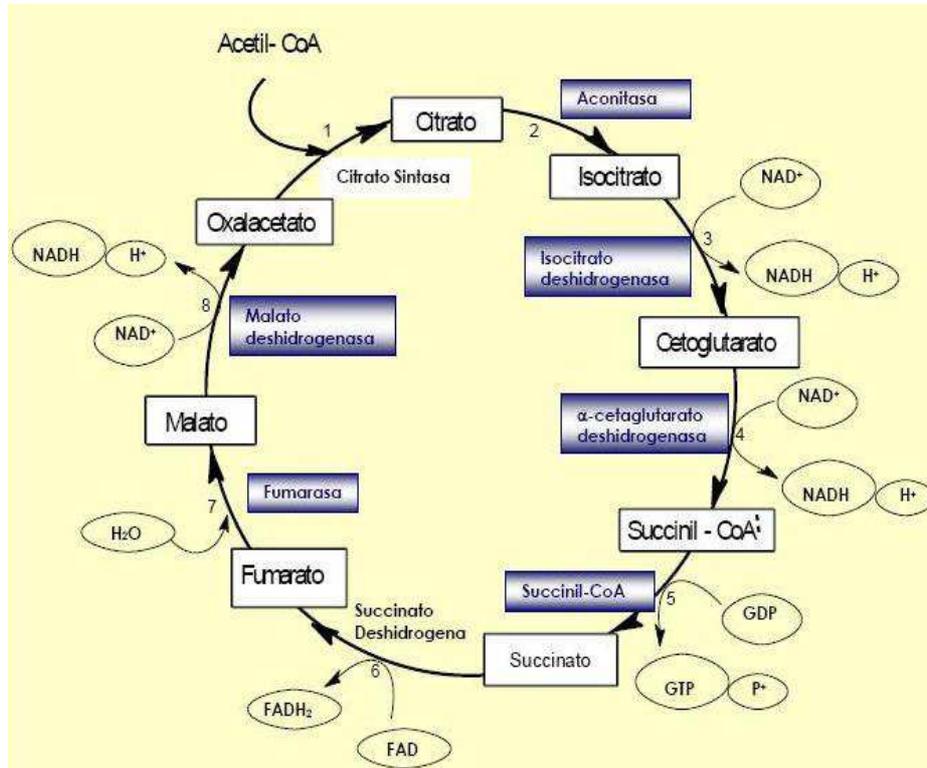


Figura 8 Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs
 Fonte: PAGAGGIANI (2007)

Bioquimicamente, é possível simplificar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose (PAGAGGIANI, 2004). A Figura 9 demonstra o processo que envolve três etapas: (A) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA através da glicólise, (B) formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO₂ e (C) acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs.

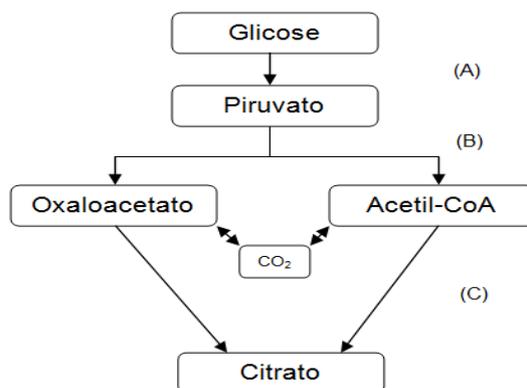


Figura 9 Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs

Fonte: KUBICEK, ROHR (1986)

O processo cinético de produção apresenta uma fase de crescimento rápido do fungo, e uma segunda fase em que o crescimento diminui e a produção de ácido cítrico é máxima, assim fica caracterizado um processo bifásico (PRATA, 1989). Rohr et al. (1981) e Kubicek e Rohr (1986) concluíram que a produção de ácido cítrico é realizada numa pequena proporção por células em crescimento e, na maior parte, por células em fase estacionária.

Duas enzimas chaves foram estudadas em detalhe com relação à fermentação cítrica, que são a aconitase e a isocitrato desidrogenase. A atividade dessas enzimas diminui para um nível muito baixo com o acúmulo de ácido cítrico. Rohr et al. (1981), Ramakrishanan et al. (1955) e Ramakrishanan e Martin (1955) verificam que a enzima isocitrato desidrogenase é inibida na presença de ácido cítrico, pH baixo (1,7-2,0) e de ferrocianeto. A adição de ferrocianeto de potássio ao meio inibe a atividade da aconitase e a da enzima isocitrato desidrogenase, estimulando assim o acúmulo de ácido cítrico. Os valores de pH mais elevados (por exemplo 3,0) levam à uma condição que

inativa a glicoseoxidase, que normalmente dá origem ao ácido glucônico (ácido orgânico indesejável). Em aproximadamente 4-5 dias, 80% do açúcar total é convertido para ácido cítrico, com picos que atingem cerca de 100 (g.L⁻¹) (YOKOYA, 1992), dependendo da concentração inicial de sacarose.

2.10.2 Citrato sintase

O acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é acompanhado pela ação e inativação ou desaparecimento e redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs, tal como aconitase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase e succinato desidrogenase. Quase todas as enzimas do ciclo de Krebs estão presentes em extratos de células de micélio de *Aspergillus niger*, tal como a citrato sintase que desempenha um papel importante na produção de ácido cítrico, pois controla o primeiro passo do ciclo de Krebs, catalisando a entrada de carbono para formar citrato (YOKOYA, 1992). A via metabólica estabelecida envolvida na biossíntese do ácido cítrico inclui a citrato sintase e esta enzima é, muitas vezes, considerada como fundamental no ciclo de Krebs, talvez, porque pode ser considerada como o primeiro passo do ciclo (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

Kubicek e ROHR (1986) em estudo com enzimas envolvidas na produção de citrato por *Aspergillus niger*, avaliaram cepas produtoras de ácido cítrico e todas apresentaram atividade da citrato sintase. A biossíntese de citrato envolve pelo menos uma etapa mitocondrial, ou seja, a citrato sintase, está localizada exclusivamente na mitocôndria. A enzima cataliza a reação de condensação de um resíduo de acetato contendo 2 carbonos de uma acetil coenzima A com uma molécula de oxaloacetato contendo quatro carbonos para formar um citrato de seis carbonos (Figura 10). O oxaloacetado será regenerado após completada uma série do ciclo de Krebs. Esta reação de

equilíbrio favorece a produção de citrato em consequência da tioéster que ocorre como parte da reação (KUBICEK; ROHR, 1986).

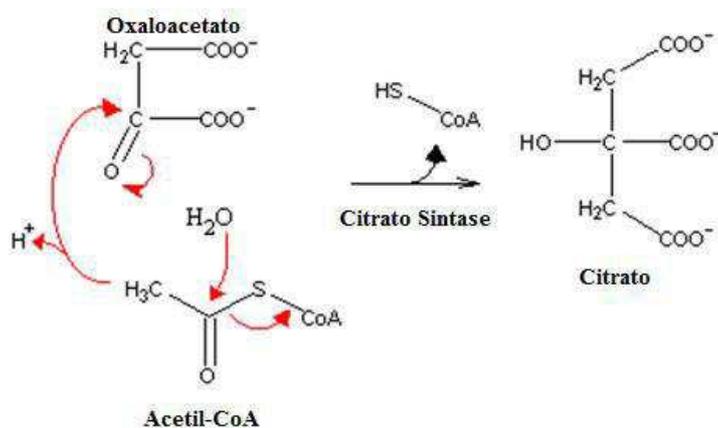


Figura 10 Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível
Fonte: KUBICEK; RÖHR (1986)

A reação segue um mecanismo ordenado, com oxaloacetato vinculado para a primeira enzima e acetil-CoA. “In vitro”, tanto ATP e coenzima A inibem a enzima que catalisa a reação acima, estes dois compostos competem com a acetil-CoA para o sítio ativo (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

2.11 Processos fermentativos

Existem três formas de se produzir ácido cítrico por *Aspergillus niger* descritas na literatura. A fermentação cítrica pode ser conduzida pelos seguintes processos: em superfície, submerso e Koji (KUBICEK; ROHR, 1986).

No primeiro caso utilizam-se bandejas, geralmente de alumínio e alta pureza, contendo uma camada de meio de fermentação de 5 a 20 cm de altura, de acordo com o volume. As bandejas são colocadas em câmaras ventiladas,

onde há circulação de ar e previamente esterilizado, que fornece oxigênio para a fermentação, e ao mesmo tempo serve para retirar o calor produzido durante o processo (MILSON; MEERS, 1985). O crescimento resulta na formação de uma camada semi-submersa de micélio que garante o fornecimento de oxigênio e dos constituintes do meio para a massa celular. A fermentação se processa no período de 8 a 12 dias, de acordo com a concentração de açúcar, resultando em rendimentos de 70 a 75% sobre a quantidade de açúcar inicial. Um fator importante do processo é a retenção do produto pelo micélio, que pode chegar a 15% do total produzido (KUBICEK; ROHR, 1986).

O processo Koji, originalmente desenvolvido no Japão, consiste de uma fermentação em meio sólido, geralmente empregando-se farelo de arroz ou resíduos de frutas que, após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos aspergida sobre a superfície. A fermentação se completa em cerca de 4 dias, em condições ideais (KUBICEK; ROHR, 1986).

O processo de fermentação submersa é o mais difundido para produção comercial de ácido cítrico. Requer menos espaço, possibilita o controle das variáveis durante o período inicial, garantindo o sucesso da fermentação e viabiliza altas velocidades de produção (KUBICEK; ROHR, 1986). Neste trabalho, foi utilizada a fermentação submersa para a produção de ácido cítrico e será descrita abaixo com maiores detalhes.

2.12 Fermentação Submersa

A fermentação submersa ou líquida, por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente, água (MITCHELL et al., 2000). Na fermentação submersa, a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado.

Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, fácil

inoculação, processo contínuo, fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto/substrato, elevado consumo energético, elevado custo tecnológico (HOLKER; LENZ, 2004; MITCHELL; MEIEN; KRIEGER, 2002).

A fermentação submersa é caracterizada pela utilização de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis. Este processo tem como vantagens a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação. A maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente do processo. Outra limitação é quando a enzima produzida é extracelular, obtendo-se uma preparação mais diluída, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração mais trabalhosa no processo de purificação (Alonso, 2001).

2.13 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (LOUGH; WAINER, 1995).

A fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto a separação dos solutos individuais. As forças

elementares que agem sobre as moléculas são de cinco tipos: 1) Forças de dispersão de London ou forças de Van der Waals; 2) Interações de dipolo induzido; 3) Ligações de hidrogênio; 4) Interações dielétricas; 5) Interações eletrostáticas e coulombianas. As variáveis que afetarem essas forças intermoleculares iram influenciar o grau de separação obtido pela passagem dos solutos através da coluna cromatográfica (LOUGH; WAINER, 1995).

Na CLAE emprega-se uma coluna fechada, reaproveitável; portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas por CLAE mais precisas. Vários tipos de detectores, que podem ser colocados na saída da coluna, proporcionam uma identificação e quantificação continua dos componentes da amostra. A análise quantitativa pela CLAE pode atingir uma precisão superior a 0.5% (LOUGH; WAINER, 1995).

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso (COLLINS et al., 1993). A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (COLLINS et al., 1993).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são

reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (LOUGH; WAINER, 1995).

O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros. Detectores de polarimetria para CLAE, recentemente desenvolvidos, diferenciam compostos quirais, através da rotação de seus estereoisômeros frente à luz plano-polarizada (LOUGH; WAINER, 1995).

O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações (LOUGH; WAINER, 1995). A tabela 6 apresenta algumas vantagens e limitações da CLAE.

Tabela 6 Vantagens e limitações da CLAE

Vantagens	Limitações
Menor tempo de análise	Alto custo da instrumentação
Alta resolução	Alto custo de operação
Resultados quantitativos	Pouco usada para análises qualitativas
Boa sensibilidade	Falta de detector universal sensível
Versatilidade	Necessidade de experiência no seu manuseio
Automação	

Fonte: LOUGH; WAINER (1995)

REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, July 2010.
- AMARO, A. P.; BONILHA, P. R. M.; MONTEIRO, M. Efeito do tratamento térmico nas características físicoquímicas e microbiológicas da polpa de maracujá. **Alim. Nutr.**, v.13,p.151-162, 2002.
- AMORIM, H. C.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba: FEALQ, 1996.
- ARGOLLO, F. A. M. **Arquitetura do café**. Campinas: Imprensa Oficial do Estado, 2004.
- AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 8, p. 1308-1311, Nov./Dec. 2000.
- AVELLAR, B. K.; GLASSER, W. G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 205-218, Mar. 1998.
- Ashurst, P.R., 2005. Chemistry and Technology of Soft drinks and Fruit Juices. 2nd Edn., Vol. III (4) **Blackwell Scientific Publication**, London, pp: 433.
- BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros Bromatológicos da casca e polpa desidratada de café em diferentes períodos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Nov. 2008.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICA SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2006. Disponível em: <<http://www.inovação.unicamp.br/etanol/report/hidrólise%20baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2010.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química de Alimentos** 2.ed. São Paulo: Varela, p. 223. 1992.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

BORGES, J. T. S; PIROZI, M. R.; LUCIA, S. M. D; PEREIRA, P. C.; FIALHO E MOARES, A. R.; CASTRO, V. C. Utilização de farinha mista de trigo e aveia na elaboração de bolos. **Boletim CEPPA**. Curitiba, v. 24, n. 1, p. 145-162, jan./jun. 2006.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa e pergamino de café. I.: composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 3, p. 299-304, July/Sept. 1972.

BRUCKNER, C. H.; MELETTI, L. M. M.; OTONI, W. C.; ZERBINI JÚNIOR, F. M. Maracujazeiro. In. BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, p.373-410, 2002.

BRUM, S. S. **Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais**. 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise Ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Analytica**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 48-53, jan. 2010.

CANTERI, S. M. H.; GOMES, M.; SANTOS, M. S.; WOSIACKI G. **Obtenção de pectina da casca de maracujá amarelo agregando valor a um subproduto** XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Florianópolis, 22-26, nov. 2004.

CARDENETTE, G. H. L. **Produtos derivados de banana verde (*Musa spp.*) e sua influencia na tolerância a glicose e na fermentação colônica.** São Paulo, 2006, 46f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GIRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 11, p. 849-864, Nov. 2008.

CARVALHO, V. A.; VASCONCELOS, M. A. M.; ALVES, M. S.; FIGUEIREDO, C. J. S. **Aproveitamento do mesocarpo do maracujá na fabricação de produtos flavorizados.** Comunicado Técnico. Embrapa. Belém, dez. 2005.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHEN, Y. et al. Xylose and cellulose fraction from corncob with three different strategies and separate fermentation of them bioethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 18, p. 6994-6999, Sept. 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores agropecuários**. Brasília: Conab, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

CÓRDOVA, V. K.; GAMA, B. T. M. M. T.; WINTER, G. M. C.; NETO, K. G.; FREITAS, S. J. R. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*passiflora edulis flavicarpa degener*) obtida por Secagem. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 2, p.221-230, jan/jun. 2005.

D' ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: D' ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel**: tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. 2. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1998. p. 45-106.

DALE, B.E. Lignocellulose Conversion and the future of fermentation. **Biotechnology Tibtech**, v.5, p.287-291, 1987.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 3, p. 220-225, Aug. 1996.

DIAS, M. V. Seleção do Processo de Maceração do Albedo de Maracujá Amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. **Anais...**Curitiba:SBCTA, 2006.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

DURIGAN, J. F. Colheita e conservação pós-colheita. In: Simpósio Brasileiro Sobre A Cultura do Maracujazeiro, 5, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998.

ELIAS, L. G. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

ESTELLER, M. S.; JÚNIOR, O. Z.; LANNES, S. C. S. Bolo de “chocolate” produzido com pó de cupuaçu e keffir. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 42, n. 3, jul./set.,2006.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas lignolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FERRARI, R.A.; COLUSSI, F; AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

GAMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 78-88, May 2006.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, July 2010.

GONDIM, M. A. J.; MOURA, V. F. M.; DANTAS, S. A. MADEIROS, S. L. R.; SANTOS, M.K. Composição centesimal e mineral de cascas de frutas. Campinas **Revista Ciência e Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 4, out/dez, 2005.

GREWAL, H.S; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, No 2. pp.212, 1995.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 1, p. 10-18, Jan. 2009.

HSU, T. A. Pretreatment of Biomass. In: WYMAN, C. E. **Handbook on bioethanol, production and utilization**. Washington: Taylor & Francis, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal Anual, 2011**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1&i=P>. Acesso em: jan., 2015.

JAKLITSCH, W. I. M.; KUBFCEK, C. P.; SCRUTTON M. C. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 10, p. 823-827, Nov. 1991

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KAWABATA, C. Y. **Aproveitamento de cinzas da queima de resíduos agroindustriais na produção de compósitos fibrosos e concreto leve para a construção rural**. 2008. 163p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-25032008-145859/pt-br.php>. Acesso em: jan., 2015.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 361-375, Apr. 2004.

KLINKE, H. B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, n. 1, p. 15-26, Mar. 2002.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando como substrato Bagaço de Mandioca**. 137 f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química – Setor de Tecnologia, UFPR. Curitiba, 1995.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 126-131, Oct. 2009.

KRAUSE, M. V. ; MAHAN, L. K. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005.

KUBICEK, C.P., ROHR, M. Citric acid fermentation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**. v.3, Boca Raton, 1986.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 45–125, 1997.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, Apr. 2009.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 124, n. 1-3, p. 1081-1099, 2005.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 1-24, July 1997.

LEONEL, M. e CERADA, M.P.. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Sci. agric.** (Piracicaba, Braz.), v.52, n.2, 1995.

LI, J. B.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 16, p. 3061-3068, Nov. 2007.

LI, C. L. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4900-4906, July 2010.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: volume 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v. 3, 2001.

LOWENSTEIN, J. M. **Citric acid cycle**: control and compartmentation. London: Dekker, 1969. 488p.

MADHAVAN, A. et. al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, Apr. 2009.

MANICA, I. Fruticultura tropical 1 : Maracujá. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1981. 151 p.

MARTIN, C. et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, p. 33-39, Jan. 2007.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 426-432, Feb. 2007.

MARTINS, C.B.; GUIMARÃES, A.C.L.; PONTES, M.A.N. **Estudo tecnológico e caracterização física, físico-química do maracujá (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) e seus subprodutos**. Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias, n.4, 1985. 23 p.

MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I beta. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 138-152, Jan. 2006.

MELETTI, L. M. M., **Maracujá: produção e comercialização em São Paulo**. Campinas, Instituto Agrônomo, p. 2, 24-25, 1996.

MILLIS, Millis, N. F., The organisms of biotechnology In: MOO-YOUNG M. **Comprehensive Biotechnology**, Oxford: Pergamon, v.1. 1985.

MIN (Ministério da Integração Nacional). **Cadernos Frutiséries**. Disponível em www.irrigar.org.br Acesso em 10 mai. 2005.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THORNASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3-4, p. 396-400, 2003.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673–686, Apr. 2005.

MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, Dec. 2005a.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, London, v. 43, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

NEHAD, Z.A. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource technology**, p. 97-100, 2002.
OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1-10, 2010. Disponível em:
<<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/No%20Prelo/RV/RV09400.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2010.

OHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 5, p. 834-839, May 2007.

OLIVEIRA, J. C. de.; NAKAMURA, K.; MAURO, A. O.; CENTURION, M. A. P. C. **Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro**. In: SÃO JOSÉ, A.R. Maracujá: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p.27-37.

OLIVEIRA, M. E. B.; BASTOS, M. S. R.; FEITOSA, T.; BRANCO, M. A. A. C.; SILVA, M. G. G. **Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju**. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 19, n. 3, 1999.

OLIVEIRA, V. D. et al. Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação, **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 424-436, mar./abr. 2001.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACH, V. R.; **Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. vol.22 no.3 Campinas Sept./Dec. 2002.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 25-33, Aug. 2000.

PAN, X. J. et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121, n. 6, p. 1069-1079, 2005.

PANDA T., KUNDU S., MAJUMDAR S.K., Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using idian cane molasses, Process **Biochemistry**, 1984.
PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R., & NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, 1999.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, V.74, n.1, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000a.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Advances in citric acid fermentation by *Asperillus niger*: biochemical aspects, membrane transport ort and modeling. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 244-263, July 2007.

POCASANGRE, E.; H. E.; FINGER, F. L.; BARROS, R. S.; PUSCHMANN, R. Development and ripening of yellow passion fruit. **Journal of Horticultural Science, Ashford**, v. 70, n. 4, p.573-576, 1995.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Solido a partir de Bagaço de Mandioca**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia, Ênfase em Tecnologia de Alimentos – Setor de Engenharia Química, UFPR. Curitiba, 2002.

PRATA, A.M.R. **Avaliação do Hidrolisado Celulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para Obtenção de Ácido Cítrico**. Viçosa: UFV, 1989. 72p. (Tese de Mestrado).

RAMAKRISHNAN, C.V; STEEL, R; LENTZ, C.P. Mechanism of citric acid formation and accumulation in *Aspergillus niger*, **Arch. Biochem. Biophys**, v.55, p.270-273,1955.

RAMAKRISHNAN, C.V; MARTIN, SM. Isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus niger*, **Arch. Biochem. Biophys**. v.55, p.403-407, 1955.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, v. 6, p. 863-871, Nov./Dec. 2003.

RAMOS, F. R. R. **O uso de passiflora sp no controle do diabetes mellitus: estudo qualitativo preliminar**. Trabalho de Conclusão de Curso. Nov. 2004. Centro Universitário de Maringá, Curso de Graduação em Farmácia.

ROCHA, M. C.; SILVA, A. L. B.; ALMEIDA, A.; COLLAD, F. H. Efeito do uso de biofertilizante agrobio sobre as características físico-químicas na pós-colheita do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) no município de Taubaté. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 7, n. 2, p. 7-13, 2001.

ROHR, M.;KUBICEK, C.P. Regulatory aspects of citric acid fermentation by *A. niger*. **Process Biotechnology**. p.34-37, Jun-Jul, 1981.

SAENGER, M. et al. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 103-121, May 2001.

SAHA, B. C. et al. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-194, Mar./Apr. 2009.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1.ed.. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.2, 2001.

SILVA, S.R.; MERCADANTE, A.Z. **Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, 254-258, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

TIMEIS - Technology innovation management and entrepreneurship information service. **Citric acid**. Índia, 2000.

UCHIMURA, M. S.. Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR. 20 jan. 2006. <<http://sbri.ibict.br/upload/sbri1995.pdf>>. Acesso em: Jan. de 2015.

ULLOA, J. B. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. **Waste Management**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 87-97, 2004.

UM, B. H.; KARIM, M. N.; HENK, L. L. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 115-125, 2003.

USHER, K. C. et al. A very short hydrogen bond provides only moderate stabilization of an enzyme-inhibitor complex of citrate synthase. **Biochemistry**, New York, v. 33, n. 2, p. 7753-7759, Mar. 1994.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Ithaca, 1994.

VIANNA-SILVA, T.; RESENDE, E.D.; VIANA, A.P.; ROSA, R.C.C.; PEREIRA, S.M.F.; CARLOS, L.A.; VITORAZI, L. Influência dos estádios de maturação na qualidade do suco do maracujá-amarelo. **Rev. Bras. Frutic.** v. 27 no.3 Jaboticabal Dec. 2005.

VIANNA-SILVA, T.; LIMA, R. V.; AZEVEDO, I. G., ROSA, R. C. C.; SOUZA, M. S.; OLIVEIRA, J. G. Determinação da maturidade fisiológica de frutos de maracujazeiros amarelo colhidos na região do estado do Rio de Janeiro. Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 1, p. 057-066, Março 2010.

VIEIRA, C. V.; VASQUES, H. M.; SILVA, J. F. C. Composição químico-bromatológica e degradabilidade *in situ* da matéria seca, proteína-bruta e fibra em detergente neutro da casca do fruto de três variedades de maracujá (*Passiflora sp*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.1148-1158. 1999.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

WAINWRIGHT, M; **Introducción a La biotecnología de los honos**. Zaragoza: Acribia, 1995.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, Dec. 2005.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 74, n. 2, p. 307-319, 2001.

YOKOYA, F.; **Fermentação cítrica**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo”, 1992.

ZHANG, X. L.; YANG, W. H.; BLASIAK, W. Modeling Study of Woody Biomass: Interactions of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin. **Energy & Fuels**, Washington, v. 25, n. 10, p. 4786-4795, Oct. 2011.

ZHAO, X. B.; CHENG, K. K.; LIU, D. H. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 5, p. 815-827, Apr. 2009.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, London, v. 2, n. 3, p. 51-68, set. 2009.

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM MEIOS COM DIFERENTES
PROPORÇÕES DE CASCA MELOSA DO CAFÉ E CASCA DO
MARACUJÁ AMARELO**

Maysa Costa Alves^{*}, Renato Silva Leal, Sara Maria Chalfoun, Karine Canestri Ribeiro, Elaine Costa Pereira, Giovani Tirelli, Tatiane Martins, Luiz Roberto Marques Albuquerque, Guilherme Cleto e Carlos José Pimenta

^{*} Department of Food Science, Federal University of Lavras – UFLA.
Zip Code 37200.000, Lavras, MG, Brasil

Artigo elaborado segundo as normas da revista
“African Journal of Agricultural Research”
“versão preliminar”

ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of major economic importance in the Brazilian agribusiness. During the processing of grain residues are generated, which are arranged in inadequate forms on the environment. During the processing of grain residues are generated, which are arranged in shapes unsuitable environment. Basically, there are two forms of coffee processing, for dry and wet. When processed by wet, coffee generates as waste pulp and wash water. The shell of passion fruit, composed of flavedo (part staining) and albedo (white part), which is rich in pectin, a soluble fiber which aids in reducing blood glucose levels, the source of niacin (vitamin B3), iron calcium and phosphorus. Improper disposal of waste processing of certain fruits, such as passion fruit, since it is grown on a large scale in most of Brazil implies studies for the use of this by-product, generating high value added products. This study was to evaluate the production of citric acid by *Aspergillus niger* in submerged fermentation using in the culture medium composition, different proportions of coffee pulp extract and flour of passion fruit peel. The agroindustrial residues were analyzed for their content of total reducing sugars, soluble solids and pH, showing the increase that the passion fruit peel flour showed higher acidity and increase in sugar content compared to the coffee pulp extract. A fermentation study using different variations of passion fruit peel flour and coffee pulp extract

was performed. In the fermentation step was used in *A. niger* 00114. During fermentation, the sugars were analyzed consumed, pH, fungal growth (biomass) and citric acid production. As a result, it was found that the maximum production of citric acid by the fungus was 10,21 g.L⁻¹ by the third day of incubation at pH 3.44 for the medium containing 70% coffee ex tract pulp and 30% passion fruit peel flour, which is considered the most effective substrate in citric acid production compared to the others. It is therefore possible to use these agro-industrial by-products tion for citric acid production, proving that the disposal thereof without exploitation is not something to be considered.

Keywords: Coffee pulp. Flour passion fruit peel. Fermentation. Citric acid. *Aspergillus niger*.

1 INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada na produção de ácido cítrico por fermentação submersa, principalmente resíduos da agroindústria. No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou re-processamento de bioresíduos, entre os quais podem ser citados como exemplo o extrato da polpa de café oriunda do processamento úmido do café e a farinha da casca de maracujá (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

O uso de resíduos agroindustriais como suporte na fermentação submersa é economicamente importante do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causa sobre a natureza, valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais. Visando maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado algumas alternativas de utilização dos subprodutos da agroindústria, seleção de microrganismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos para a fermentação cítrica. A casca melosa do café é o principal resíduo originado no processamento úmido do café maduro, representando aproximadamente 40% do peso seco do grão de café, sendo rico em carboidratos, proteínas, minerais e apreciáveis quantidades de taninos, cafeína e potássio. A farinha da casca de maracujá apresenta quantidades significativa de pectina (fibra solúvel) e minerais como ferro, cálcio e fósforo (ABECITRUS, 2015). Uma vez que estes resíduos são ricos em carboidratos e outros nutrientes, apresentam-se como substrato viável para produção de ácido cítrico por fermentação submersa.

O ácido cítrico é o principal constituinte das frutas cítricas, atualmente um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Por causa de suas características, é amplamente utilizado na indústria de

alimentos (acidulante, flavorizante, antioxidante), na indústria farmacêutica (tamponante, sequestrante, quelante) e outros (KAREEM et. al., 2011). Sua importância deve-se a características como baixa toxicidade, palatabilidade e ser facilmente assimilado pelo organismo.

Com o emprego de técnica de processos microbiológicos foi possível obter esse ácido reduzindo o custo de obtenção e possibilitando um grande aumento do uso em escala industrial. Muitos micro-organismos desempenham papel importante na produção industrial de bebidas, produtos alimentícios, substâncias químicas, suplementos, antibióticos e biomassa. A principal razão para utilizar microorganismos na produção de compostos, os quais podem ser isolados de solos, plantas e animais, é a facilidade em seu melhoramento (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2005). Com isso tem sido registrados aumentos de até mil vezes na produção de metabólitos de interesse biotecnológico. Uma aplicação considerável da microbiologia está na indústria biotecnológica em que os microorganismos são utilizados como fábricas para produção de proteínas, surfactantes, adoçantes e ácidos orgânicos, e, como um membro comum dos microorganismos encontrados, o fungo *Aspergillus niger* exerce muitas funções na indústria da biotecnologia.

Este microorganismo produz um vasto leque de enzimas hidrolíticas e enzimas oxidativas, modelo para várias áreas de investigação, incluindo o estudo de secreção proteica, em geral, os efeitos de diversos fatores ambientais sobre a supressão ou a exportação de várias enzimas degradantes e processos de desenvolvimento de fermentação (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2005).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi utilizar os resíduos do processamento do café e maracujá para a produção de ácido cítrico por fermentação submersa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras - UFLA, no Laboratório de Análises Avançadas e no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG.

2.1 Matérias-primas

A casca melosa do café (*Coffea arabica L.*) oriunda do beneficiamento via úmida foi obtida pelo INCT Café – UFLA, Minas Gerais, safra 2014. As cascas do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa Deg.*) foram obtidas no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência dos Alimentos-UFLA. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Análises avançadas do Departamento de Ciência dos Alimentos, congeladas e armazenadas em freezer a -18°C, até o momento das análises.

2.2 Obtenção do extrato da casca melosa do café

O extrato da casca melosa de café foi obtido através da trituração da polpa com o líquido exsudado do seu descongelamento, seguido de prensagem.

2.3 Obtenção da farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*)

Para a obtenção da farinha da casca do maracujá, primeiramente houve uma secagem das cascas em estufa à 105°C até peso constante e posteriormente sua trituração em moinho de facas. Após trituração, a farinha da casca de maracujá foi acondicionada em plásticos hermeticamente fechados e guardados em freezer a -18°C até o momento das análises.

2.4 Tratamentos realizados

O experimento foi realizado através da variação das quantidades de extrato da casca melosa de café e da farinha da casca de maracujá amarelo como mostrado a seguir, a fim de determinar qual tratamento foi mais eficaz na produção de ácido cítrico. As porcentagens de extrato da casca melosa de café e da farinha da casca de maracujá amarelo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela1 Porcentagens de extrato da casca melosa do café e farinha de maracujá

Tratamentos	Extrato da casca melosa de café (%)	Farinha da casca de maracujá (%)
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	60	40
6	50	50
7	40	60
8	30	70
9	20	80
10	10	90
11	0	100

2.5 Microorganismo e método de inoculação

O isolado de *Aspergillus niger* utilizado neste estudo foi o (*A. niger* 00114) oriundo do fruto do café. Este isolado foi identificado como não produtor de Ocratoxina A e obtido no Laboratório de microbiologia do

ECOCentro da EPAMIG (Lavras-MG). A metodologia para a bioprospecção dos esporos foi feita pelo método de plaqueamento direto. Amostras de grãos de café foram distribuídas em meio Batata Dextrose-Agar (BDA) em placas de Petri 9cm de diâmetro e mantidas a 25°C. Após o crescimento do microorganismo nas placas, coletou-se os esporos para posterior purificação. Para a inoculação do isolado de *Aspergillus niger* (A. niger 00114), suspensões de esporos não germinados, obtidas de culturas cultivadas em BDA entre 5 a 7 dias, foram utilizadas como inóculo. Após contagem de esporos em câmara de Neubauer, foi procedida a diluição destas suspensões. Para análises posteriores, a suspensão foi utilizada com concentração inicial de 1×10^8 esporos.mL⁻¹. Para cada variação nas proporções de extrato de café e farinha da casca de maracujá foi utilizado um erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio. O meio de fermentação foi suplementado de acordo com Kolicheski (1995), utilizando-se nitrato de amônio (NH₄NO₃) (2,23 g.L⁻¹), dihidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄) (1,0 g.L⁻¹) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) (0,23 g.L⁻¹).

2.6 Descrição do experimento

Antes de iniciar as fermentações, os meios foram autoclavados, a 121 °C, durante 20 minutos. Após a esterilização, os meios foram resfriados a aproximadamente 30 °C, inoculados com 1 mL da suspensão com 10⁸ esporos/mL e incubados a 28°C e 100 rpm em “shaker” de bancada durante 10 dias de fermentação. Foram coletados 15 mL de cada amostra a cada 24h, durante 10 dias para as análises de pH, sólidos solúveis totais (SST), Açúcares Redutores Totais (ART), ácido cítrico produzido e crescimento fungico (biomassa). Os valores de pH de cada amostra foram medidos no mesmo dia da coleta. Para as análises de sólidos solúveis Totais (SST), as

amostras coletadas foram centrifugadas e usou-se o sobrenadante para as medições, já os precipitados das amostras foram usados para as análises de ART, biomassa e determinação de ácido cítrico.

2.7 Métodos analíticos

As análises realizadas para os meios estão descritas a seguir.

2.7.1 Açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares totais foram determinados espectrofotometricamente, a 620 nm utilizando uma curva padrão de glicose de acordo com o método de antrona proposto por Dische (1962) e apresentados como g de glicose por 100g do alimento ou (%). As amostras foram diluídas quando necessário.

2.7.2 pH

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca QUIMIS, modelo 400 A (QUIMIS/BRASIL), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 conforme AOAC (2000).

2.7.3 Sólidos solúveis totais (SST)

A determinação dos sólidos solúveis totais (SST) foi realizada em um refratômetro digital portátil, modelo PAL-1 com escala variando de 0 a 53 °Brix, colocando-se uma gota do sobrenadante de cada tratamento no prisma e fazendo-se leitura direta em °Brix. A cada leitura, zerava-se o aparelho com água destilada, segundo o manual do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.7.4 Biomassa

A biomassa foi determinada através da diferença de peso após centrifugação em tubo tipo falcon de 50 mL, previamente pesado em balança analítica de acordo com Kolicheski (1995).

2.7.5 Determinação, identificação e quantificação de ácido cítrico

O ácido cítrico produzido no processo fermentativo foi analisado por cromatografia de alta eficiência (CLAE). Para o preparo das amostras, pesou-se 100 mg de cada amostra, adicionou-se 5 mL de água Milli-Q (Millipore Corporation) e levou-se ao banho ultrassônico durante 15 minutos. O cromatógrafo utilizado é um equipamento da marca Shimadzu, com sistema de detecção por condutividade (CDD-6A), polaridade +, uma pré-coluna SHIM-PACK-H(G) (50 mmx7.8 mm) e duas colunas em série SHIM-PACK SPR-H (250 mm x 7.8mm). A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de 16 mM de Bis-Tris, 4 mM de ácido p-tolueno sulfônico e 100 µM de EDTA; com fluxo de 0,8 mL/min. O volume a ser injetado da amostra foi de 20 µL e a temperatura de injeção de 45°C. As amostras foram filtradas através de filtros de seringa (0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro). O ácido cítrico foi detectado via infravermelho (absorbância 210 nm). A identificação foi feita por comparação com tempos de retenção das amostras com o respectivo padrão do ácido, e a quantificação foi feita por meio de curva-padrão. (FRAGUAS et al., 2014).

2.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado na fermentação foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância pelo programa SISVAR 5.1[®] (FERREIRA, 2008). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Scott_knott, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amostras padrão

As análises de pH, sólidos solúveis e açúcares redutores totais, para os tratamentos com variação na porcentagem de extrato da casca melosa do café e de farinha da casca de maracujá encontram-se sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 Teores de pH sólidos solúveis (SST) e açúcares redutores totais (ART) das amostras padrão

Tratamento	pH	SST (°Brix)	ART (%)
1	4,77 ^a	5,77 ^a	4,98 ^a
2	4,61 ^b	6,53 ^b	5,34 ^b
3	4,56 ^c	6,73 ^c	5,76 ^c
4	4,54 ^d	7,47 ^d	5,97 ^d
5	4,49 ^e	7,73 ^e	6,16 ^e
6	4,42 ^f	8,23 ^f	6,34 ^f
7	4,38 ^g	8,43 ^g	6,44 ^g
8	4,35 ^h	8,73 ^h	6,67 ^h
9	4,32 ⁱ	9,43 ⁱ	6,79 ⁱ
10	4,29 ^j	9,76 ^j	6,95 ^j
11	4,26 ^k	10,10 ^k	7,04 ^k

*Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de significância, pelo teste Scott_Knott

Analisando os tratamentos, observa-se que à medida que aumenta a porcentagem de farinha da casca de maracujá, há uma diminuição dos valores de pH, visto que ela (Tratamento 11) apresenta maior acidez em relação ao extrato casca melosa do café (Tratamento 1) e para os demais tratamentos (Tratamento 2 ao 10), os valores de pH variaram de acordo com cada porcentagem de extrato da casca melosa e de farinha da casca de maracujá. Sendo assim, todos os valores de pH diferiram estatisticamente a 5% de significância, mostrando a variação de pH para cada tratamento.

Ferrari et al. (2004) estudaram a variação de pH em bolos elaborados com diferentes proporções de farinha da casca de maracujá e farinha de trigo e encontraram para a amostra totalmente elaborada com farinha da casca de maracujá um pH de 6,28, sendo considerado levemente ácido em comparação com a amostra isenta de casca de maracujá cujo pH foi de 7,89.

Santana et al (2011) ao analisarem a substituição da farinha de trigo por fécula de mandioca e farinha da casca de maracujá em biscoitos, encontraram uma ligeira redução do pH de 5,85 para 5,50. Os valores de pH obtidos neste trabalho foram inferiores àqueles descritos por Falconer et al. (1998), que determinaram o pH de seis cultivares de maracujá amarelo (5,7 a 6,8), sendo, porém, superiores aos valores encontrados por Tocchini et al. (1994), cuja média foi de 3,5 para o pH determinado em dois lotes de farinha da casca de maracujá amarelo.

Os valores de pH do maracujá amarelo obtidos por Vieira (1997), variaram entre 2,8 e 6,1. Estudando o maracujá amarelo, Pocasangre et al. (1995), constataram que a acidez total tende a diminuir com o amadurecimento do fruto, o que foi corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho. Esta diminuição progressiva da acidez total durante o amadurecimento e senescência da fruta é atribuída ao processo de

respiração (AMARO, 2002). Sendo assim, o aumento da acidez pode ser atribuído ao enriquecimento do alimento com a farinha da casca de maracujá, ao qual, por ser proveniente de um fruto cítrico, possui ácidos orgânicos (SANTANA et al., 2011).

Para o extrato da casca melosa do café, o pH encontrado neste trabalho foi de 4,77, valor maior do que encontrado por Rojas et al. (2002), que foi de 4,5 e Menezes (2012), que foi de 4,55.

Em relação aos sólidos solúveis da farinha da casca de maracujá, Machado et al, (2003) encontraram um valor de 7,6°Brix, valor menor do que encontrado neste trabalho que foi de 10,10°Brix. Rosa, et al., (2010) encontraram um valor de 11,7°Brix de sólidos solúveis encontrados para a farinha de maracujá, este valor está próximo ao encontrado neste trabalho. Marchi et al., (2000) encontraram valores de 13,08-14,67°Brix, os quais são valores maiores do que o encontrado este trabalho (10,10 °Brix).

Menezes (2012), ao estudar o extrato da casca melosa do café arábica para a produção de etanol, encontrou um valor de 8,5 °Brix, sendo este valor superior ao encontrado neste trabalho que foi de 5,77 °Brix. Analisando a Tabela 6, pode-se observar que com o aumento da porcentagem de farinha da casca de maracujá, há um aumento no teor de sólido solúveis. Todos os valores de SST diferiram estatisticamente a 5% de significância, evidenciando que a farinha da casca de maracujá apresenta maior teor de compostos solúveis do que o extrato da polpa de café.

Em relação aos teores de açúcares totais, a farinha da casca de maracujá apresentou teor de açúcar total (7,04%) inferior quando comparado a outros frutos tropicais, tais como mamão formosa (10,60%), manga Tommy Atkins (14,12%) e banana (15,4%) (PEREIRA, 2009) e

teores superiores aos presentes em tangerina (1,9%) e pêssego (5,3%) (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Menezes (2012), ao estudar a extração dos açúcares totais presentes na casca melosa do café, obteve um teor de 5,12% após trituração da polpa de café seguida de prensagem, sendo este valor superior ao encontrado neste trabalho que foi de 4,98%. Todos os valores de açúcares redutores totais diferiram estatisticamente a 5% de significância.

Essas diferenças de valores encontrados na literatura tanto para a casca melosa do café oriunda do processamento via úmida tanto da farinha da casca de maracujá podem ser decorrentes do tipo de processamento, das diferentes variedades e cultivares, das condições de cultura, grau de maturação dos frutos, entre outros fatores.

3.2 Análises das amostras sem otimização do meio de cultura

3.2.1 pH

As curvas pH para em função do tempo de fermentação para cada tratamento estão ilustradas na figura 1.

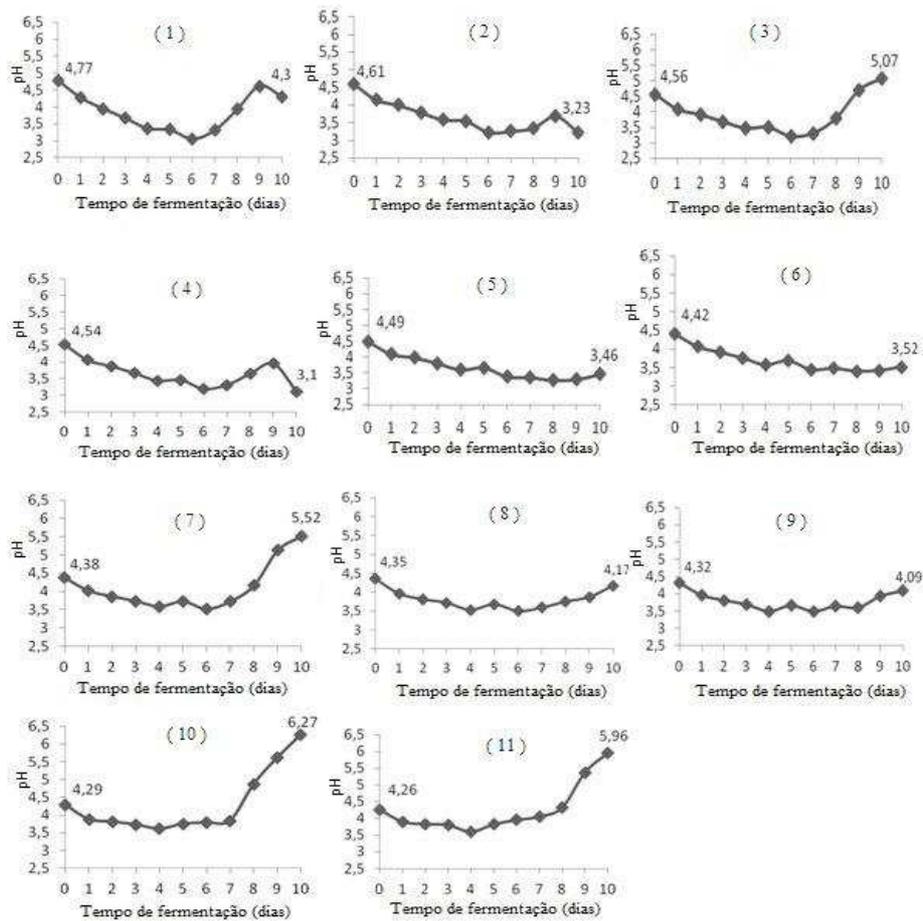


Figura 11 Curvas de pH em função do tempo de fermentação para cada tratamento. (1) 100% café, (2) 90%Café 10% maracujá, (3) 80%Café 20% maracujá, (4) 70%Café 30% maracujá, (5) 60%Café 40% maracujá, (6) 50%Café 50% maracujá, (7) 40%Café 60% maracujá, (8) 30%Café 70% maracujá, (9) 20%Café 80% maracujá, (10) 10%Café 90% maracujá, (11) 7%Café 93% maracujá

Analisando a Figura 1, pode ser observado que houve uma diminuição do pH nos primeiros dias da fermentação (1^o ao 4^o dia) para todos os tratamentos, isto ocorre devido à produção de algumas moléculas ácidas pelo fungo *Aspergillus niger* quando cultivado na presença de meios contendo fontes

de nitrogênio (LEHNINGER et al., 1995). O consumo de nitrogênio causa abaixamento do pH do meio, favorecendo a formação do ácido cítrico. O pH de uma cultura pode variar em razão da atividade metabólica dos microrganismos. O motivo mais óbvio é a secreção de ácidos orgânicos, como é o caso do cítrico, o qual irá causar um abaixamento no pH. (YOKOYA, 1992). É sabido que nenhum fungo conhecido consegue fixar nitrogênio atmosférico; desta forma, fontes de nitrogênio são requeridas para a síntese de aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas dos ácidos nucléicos e para síntese de glicosamina para montagem de quitina (principal componente da parede celular do fungo). Dependendo da espécie do fungo, o nitrogênio pode ser obtido nas formas de nitrato, nitrito, amônia ou nitrogênio orgânico.

A maioria dos fungos usa nitrato que é reduzido a nitrito com mediação da enzima nitrato redutase e depois a amônia. Esta é a forma na qual ocorre a captação de amônia no meio de fermentação no início da germinação dos esporos do fungo e provocam liberação de prótons o que contribui para a redução do pH a níveis adequados para que ocorra a total germinação destes esporos. Se durante essa fase ocorrer um aumento de pH acima de 4,5 a produção de ácido cítrico pode ser reduzida em até 80% (PAPAGIANNI, 1995).

O controle de pH pode ser crítico nos processos de fermentação (NAGEL et al., 1999), pois como consequência da degradação dos açúcares ou matéria orgânica presente no meio, ocorre a formação de ácidos orgânicos que baixam o pH, assim como o consumo de sais de amônio favorecendo o desenvolvimento fungico e o acúmulo do ácido cítrico. Isso justifica a redução de pH observada no início da fermentação para todas as amostras. Por outro lado, se ácidos orgânicos presentes no substrato são assimilados, o pH aumenta, assim como a hidrólise de uréia resulta na alcalinização do meio (RAIMBAULT, 1998). Vale ressaltar também que valores de pH alto não inibem a produção de

ácidos orgânicos indesejáveis (ácido glucônico e ácido oxálico) tornando a recuperação de ácido cítrico mais dificultada a partir do meio de fermentação. Esse aumento do pH pode ser observado em todas as amostras, pois no decorrer da fermentação, houve um aumento do pH a partir do 7º dia de fermentação, com algumas amostras apresentando pH superiores ao pH controle (tempo 0).

De um modo geral, na fermentação submersa os valores iniciais de pH são baixos, favorecendo o crescimento de fungos e leveduras e dificultando o crescimento de bactérias (DEL BIACHI et al., 2001). Porém, não há consenso na literatura sobre um pH inicial ótimo para o acúmulo de ácido cítrico. Yigitoglu et al. (1992), indicam que um pH de 2,5 seria o ideal para a concentração do produto. Papagianni (1995) afirma que um pH de 4,5 durante a fase de produção reduz o rendimento do ácido cítrico, no entanto para que haja o desenvolvimento de esporos é necessário um pH em torno de 5,5. Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos toleram amplas variações de pH. Os fungos filamentosos podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, entretanto algumas leveduras não toleram pH alcalino (PAPAGIANNI, 1995).

3.2.2 Efeito da concentração de açúcares

Os perfis de açúcares redutores totais em função do tempo de fermentação para cada tratamento estão ilustrados na figura 2.

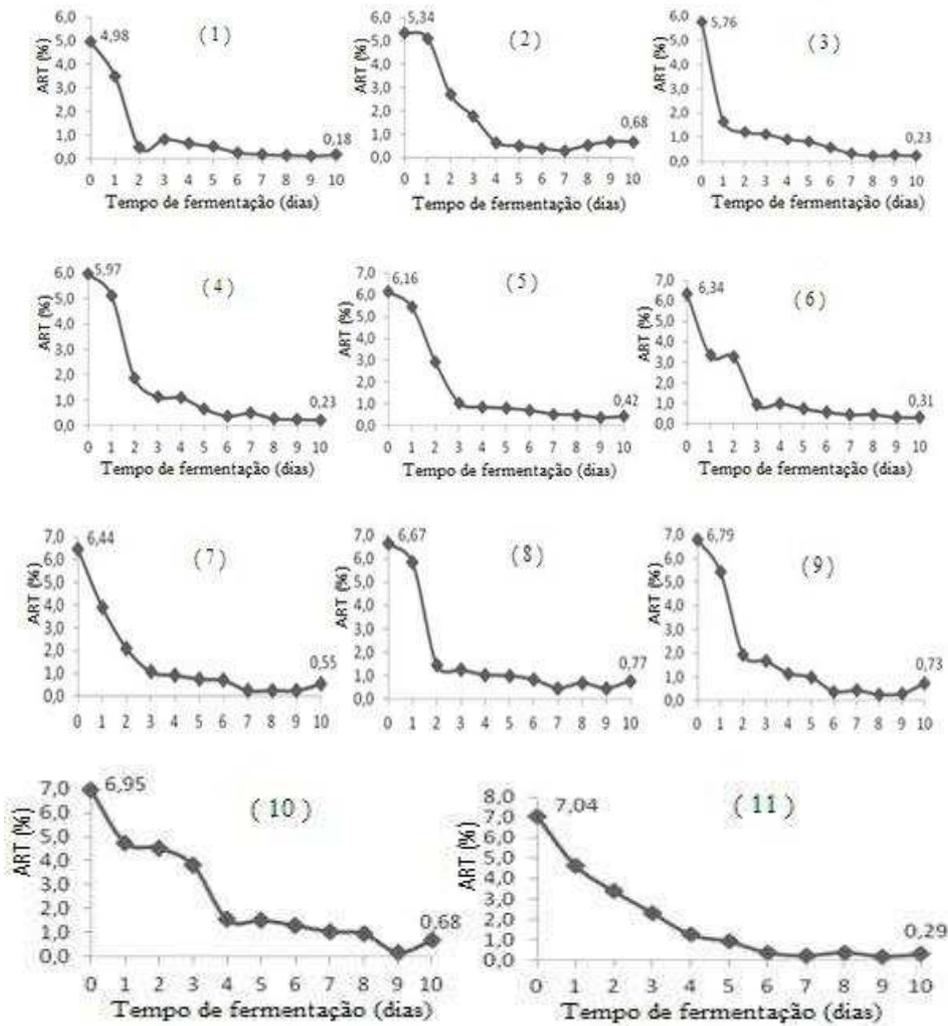


Figura 12 Curvas de Açúcar redutor total (ART) em função do tempo de fermentação para cada tratamento. (1) 100% café, (2) 90% Café 10% maracujá, (3) 80% Café 20% maracujá, (4) 70% Café 30% maracujá, (5) 60% Café 40% maracujá, (6) 50% Café 50% maracujá, (7) 40% Café 60%

Analisando a figura 2, observa-se que em todas os tratamentos houve o consumo do fungo pelos açúcares presentes no meio fermentativo. Nota-se que os açúcares foram rapidamente metabolizados pelo fungo nos primeiros dias de fermentação com posterior desaceleração metabólica e ganho de estabilidade quanto ao consumo dos açúcares. Segundo Penna (2001), as baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, e, conseqüentemente, diminuem a produção de ácido cítrico.

Fontes de carboidrato são necessárias para a produção de ácido cítrico, sendo que a presença de carboidrato prontamente metabolizável é essencial para uma boa produção de ácido cítrico. A maltose, sacarose, manose, glicose e frutose são os açúcares mais apropriados para a produção de ácido. Segundo Kubicek; Rohr (1986), a principal fonte de carbono empregada é a sacarose, seja na forma pura ou na forma presente em melaços de cana-de-açúcar ou beterraba.

A concentração de açúcares afeta significativamente a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. A glicose e a frutose são rapidamente assimiladas pelo fungo, por serem açúcares mais simples. Em escala industrial, utiliza-se a sacarose como fonte de carbono e, neste processo, o fungo atua sob condições ácidas e através da enzima invertase extracelular, hidrolisa a sacarose em seus monômeros (KUBICEK; ROHR, 1986).

A concentração de açúcar é crítica para a produção de ácido cítrico, sendo que a taxa de produção máxima é usualmente obtida entre 14-22% de açúcar (PAPAGIANNI et al., 1999). A faixa ótima de concentração de açúcar encontra-se entre 10-14%, de acordo com Xu et al. (1989). As baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, isso mostra claramente o fato da baixa produtividade de ácido cítrico (PENNA, 2001).

Aspergillus niger assimila facilmente a manose, xilose e arabinose e produz ácido cítrico a partir destes açúcares (MADDOX et al., 1985). Segundo Santos e Prata

(2001), *Aspergillus niger* assimila facilmente os açúcares que estão presentes no hidrolisado de madeira.

3.3 Crescimento fúngico (biomassa)

As curvas de crescimento fúngico (biomassa) função do tempo de fermentação para cada tratamento estão ilustradas na figura 3

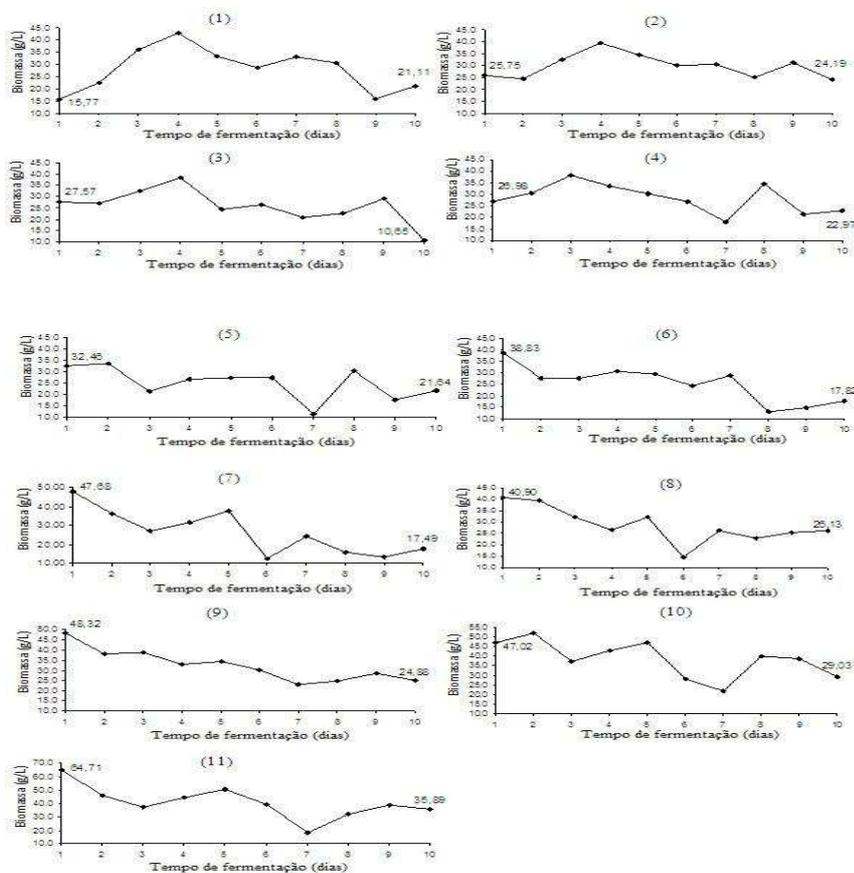


Figura 13 Curvas de crescimento fungico (biomassa) em função do tempo de fermentação para cada amostra. (1) 100% café, (2) 90% Café 10% maracujá, (3) 80% Café 20% maracujá, (4) 70% Café 30% maracujá, (5) 60% Café 40% maracujá, (6) 50% Café 50% maracujá, (7) 40% Café 60

Analisando a figura 3, observa-se que em todas as amostras houve oscilação no crescimento microbiano, isto se deve possivelmente às diferentes proporções de matéria orgânica dos meios, de teores de açúcar disponível (fonte de carbono) fonte de nitrogênio, vitaminas/carboidratos, elementos-traços como ferro, zinco, magnésio, cobre, agitação, temperatura, aeração do meio, produção de gás carbônico entre outros. Vale ressaltar que todos os meios foram suplementados com a mesma quantidade de nitrogênio na forma de nitrato de amônio, fosfato e magnésio.

A forma e a concentração da fonte de nitrogênio afetam consideravelmente no crescimento do fungo e a síntese do ácido cítrico. (HANG et al., 1987). Além de carbono e nitrogênio a presença de fosfato no meio de fermentação tem um efeito considerável na fermentação cítrica. A alta concentração de fosfato promove maior crescimento e menor produção de ácido cítrico (KHAN et al., 1970). Há informações que indicam o dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4) como a melhor fonte de fosfato (KAHLON, 1982; PUROHIT, 1985). Foram estudados seus efeitos com concentrações entre 0,5 - 5,0 (g.L^{-1}), utilizando resíduos de cervejarias, verificando-se um pequeno efeito no crescimento do fungo e na formação do ácido cítrico (HANG et al., 1970). Neste trabalho os meios foram suplementados com 1,0 (g.L^{-1}) de dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4), o que pode ter reduzido o crescimento do fungo entre os dias, durante o processo fermentativo. A fermentação cítrica por *A.niger* fica muito restrita quando está em falta o dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4) e o monohidrogênio fosfato de dipotássio (K_2HPO_4) (SINGH; MEHROTRA, 1975).

3.4 Produção de ácido cítrico

Para cada um dos 11 tratamentos foram coletadas amostras ao longo do tempo, sendo uma a cada 24 h, durante 10 dias, para analisar e verificar o comportamento da produção de ácido cítrico. Correlacionou-se à produção de ácido, o pH, biomassa e o consumo de açúcares redutores totais. A Tabela 3 apresenta a evolução do ácido cítrico, pH e açúcares redutores para cada tratamento ao longo de 10 dias.

Tabela 3 Evolução do ácido cítrico, pH e açúcar redutor total ao longo de 10 dias de fermentação para cada amostra usando resíduos do processamento de café e de maracujá

Tratamento	Análise	Tempo de Fermentação (dias)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	AR	4,98	3,49	0,47	0,82	0,66	0,51	0,27	0,18	0,16	0,12	0,18
	pH	4,77	4,27	3,95	3,67	3,37	3,33	3,06	3,32	3,93	4,62	4,30
	AC	0,00	6,87	7,07	7,26	7,41	7,65	6,64	6,48	6,22	5,78	6,00
	Bio	0,00	15,77	22,47	36,14	42,71	33,38	28,67	33,10	30,67	16,07	21,11
2	AR	5,34	5,11	2,70	1,76	0,65	0,50	0,39	0,30	0,53	0,68	0,68
	pH	4,61	4,15	4,00	3,79	3,58	3,55	3,23	3,26	3,35	3,69	3,23
	AC	0,00	7,97	8,27	8,56	8,81	9,15	7,44	7,18	6,82	6,28	6,30
	Bio	0,00	25,75	24,32	32,48	39,38	34,56	30,02	30,65	24,98	31,12	24,19
3	AR	5,76	1,65	1,21	1,13	0,91	0,82	0,57	0,32	0,23	0,25	0,23
	pH	4,56	4,07	3,90	3,67	3,46	3,49	3,20	3,31	3,80	4,70	5,07
	AC	0,00	8,77	9,07	9,26	9,41	9,55	7,74	7,28	6,92	6,38	6,30
	Bio	0,00	27,57	27,18	32,48	38,41	24,23	26,52	20,65	22,46	29,05	10,65
4	AR	5,97	5,13	1,87	1,14	1,10	0,66	0,38	0,49	0,28	0,25	0,23
	pH	4,54	4,06	3,88	3,67	3,44	3,46	3,19	3,31	3,65	3,96	3,10
	AC	0,00	9,52	9,84	10,04	10,21	9,85	7,86	7,39	7,04	6,49	6,41
	Bio	0,00	26,98	30,72	38,29	33,78	30,16	26,88	18,04	34,62	21,23	22,97
5	AR	6,16	5,44	2,92	1,05	0,86	0,79	0,70	0,53	0,48	0,36	0,42
	pH	4,49	4,09	3,98	3,80	3,60	3,67	3,38	3,36	3,27	3,30	3,46
	AC	0,00	6,23	6,41	6,58	6,71	6,93	5,90	5,72	5,44	4,98	5,18
	Bio	0,00	32,46	33,69	21,60	26,88	27,28	27,48	11,43	30,52	17,72	21,64
6	AR	6,34	3,33	3,26	0,93	0,99	0,72	0,57	0,45	0,45	0,31	0,31
	pH	4,42	4,07	3,91	3,76	3,57	3,69	3,44	3,48	3,40	3,42	3,52
	AC	0,00	7,13	7,41	7,68	7,91	8,23	6,50	6,22	5,84	5,28	5,28
	Bio	0,00	38,83	27,62	27,72	30,56	29,57	24,47	28,82	13,02	14,78	17,82
7	AR	6,44	3,91	2,10	1,08	0,93	0,76	0,70	0,25	0,27	0,26	0,55
	pH	4,38	4,02	3,86	3,73	3,58	3,72	3,51	3,72	4,16	5,13	5,52
	AC	0,00	7,73	8,01	8,18	8,31	8,43	6,60	6,12	5,74	5,18	5,08
	Bio	0,00	47,68	36,11	27,15	31,40	37,78	12,66	24,04	15,78	13,22	17,49
8	AR	6,67	5,84	1,43	1,23	1,02	0,98	0,82	0,45	0,67	0,45	0,77
	pH	4,35	3,96	3,81	3,72	3,53	3,68	3,50	3,59	3,75	3,87	4,17
	AC	0,00	6,00	6,18	6,36	6,50	6,72	5,70	5,52	5,25	4,79	5,00
	Bio	0,00	40,90	39,39	32,17	26,54	32,15	14,57	26,22	22,77	25,48	26,13
9	AR	6,79	5,43	1,94	1,67	1,15	0,98	0,38	0,42	0,26	0,29	0,73
	pH	4,32	3,96	3,81	3,69	3,49	3,66	3,49	3,64	3,60	3,93	4,09
	AC	0,00	6,96	7,24	7,52	7,75	8,08	6,35	6,08	5,71	5,15	5,16
	Bio	0,00	48,32	38,15	38,87	32,80	34,17	30,30	22,98	24,72	28,52	24,88
10	AR	6,95	4,75	4,53	3,80	1,54	1,52	1,31	1,05	0,96	0,18	0,68
	pH	4,29	3,88	3,81	3,73	3,61	3,75	3,79	3,84	4,87	5,62	6,27
	AC	0,00	7,61	7,90	8,07	8,21	8,34	6,51	6,04	5,66	5,11	5,01
	Bio	0,00	47,02	52,01	37,12	42,79	47,04	28,05	21,88	39,89	38,63	29,03
11	AR	7,04	4,63	3,38	2,32	1,25	0,91	0,37	0,22	0,38	0,19	0,29
	pH	4,26	3,90	3,83	3,80	3,60	3,82	3,95	4,05	4,32	5,37	5,96
	AC	0,00	8,22	8,53	8,49	8,71	8,89	6,49	6,04	5,64	5,08	4,98
	Bio	0,00	64,71	46,01	37,42	44,30	50,60	39,20	18,31	32,07	38,59	35,89

ART = Açúcar redutor total (%)

AC = ácido cítrico produzido (g/L)

Bio = Biomassa (crescimento fungico) (g/L)

Conforme observado na Tabela 3, a maior produção de ácido cítrico foi de 10, 21 (g.L⁻¹) para o 4º dia de fermentação em pH 3,44 correspondente ao tratamento 4 (70% extrato da casca melosa do café e 30% farinha da casca de maracujá). Este tratamento comparado com os demais, apresentou a maior produtividade de ácido, sendo de 9,52 g/L.dia após 24h de incubação. Assim, foi realizada a cinética de crescimento da cepa *Aspergillus niger* para esse tratamento por apresentar a maior produção de ácido cítrico no menor tempo de incubação. Os resultados obtidos em biomassa, pH, açúcar consumido e ácido cítrico produzido estão apresentados no gráfico 1.

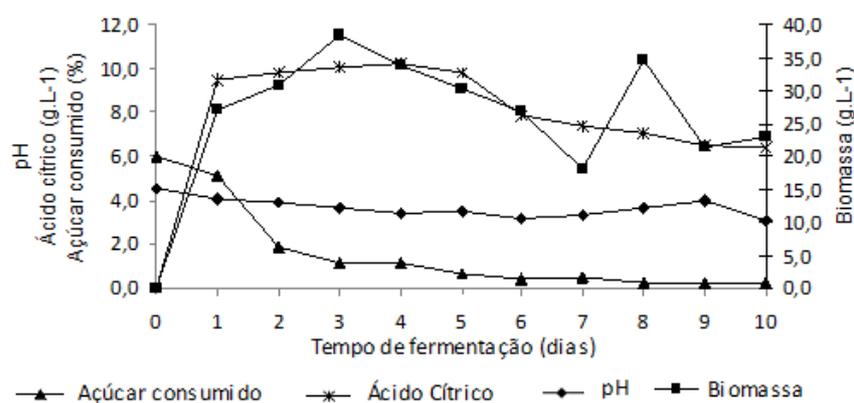


Gráfico 1 Cinética de crescimento da cepa *Aspergillus Níger*

A cinética de crescimento da cepa *Aspergillus niger* mostra o comportamento do pH, açúcar consumido e biomassa em função da produção do ácido cítrico. A maior produção de ácido cítrico ocorreu no início da fermentação (4º dia) devido ao fato que a produção de ácido é realizada numa pequena proporção de células em crescimento e, na maior parte, por células em fase estacionária.

As oscilações observadas durante a fermentação podem ocorrer também em função da produção de gás carbônico, que apesar deste parâmetro não ser analisado neste experimento, coincide com os resultados obtidos por Priede; Thomas (1999), que também observaram estas oscilações ao estudarem a relação entre a morfologia e a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

O pH do meio foi reduzido em função da produção de ácido e voltou a aumentar no sétimo dia de incubação, possivelmente em decorrência de contaminações por outros microorganismos e consumo do ácido cítrico produzido no meio pelo fungo (RAIMBAULT, 1998). O crescimento do fungo (biomassa) apresentou oscilações durante o processo fermentativo, com nova fase de germinação no sétimo dia de incubação; porém, não houve aumento da produção de ácido cítrico visto que no sétimo dia, as quantidades de nutrientes do meio já haviam sido consumidas em grande parte pelo fungo e pela presença de possíveis contaminantes.

A produtividade do ácido cítrico foi reduzida com o tempo de incubação, como resultado da queda da produção do ácido. Sendo assim, os valores de açúcares redutores totais, biomassa, pH, ácido cítrico produzido e produtividade diferiram estatisticamente a 5% de significância, mostrando suas variações durante o tempo de fermentação.

EL-Aasar (2006) observou que o aumento no período de incubação implica na redução de acúmulo de ácido cítrico, assim, concluiu que seis dias seria o período máximo de incubação, com temperatura de incubação 30°C e pH 6,0. O pH inicial e a temperatura dos meios de fermentação são consideradas as condições mais adequadas para que ocorra o melhor desenvolvimento dos fungos e, posteriormente, a produção de ácido cítrico. Esse fato está em concordância com este trabalho, em que a máxima produção de ácido cítrico

(8,31 g.L⁻¹) com temperatura de incubação 30°C e pH 3,62 ocorreu após cinco dias de incubação, com posterior queda na produção do ácido .

O valor de 10,21 (g.L⁻¹) referente à maior produção de ácido cítrico obtido neste trabalho foi baixo em relação aos valores encontrados na literatura. Jernejc et al. (1982) encontraram um ótimo de 140 (g.L⁻¹) de sacarose para fermentação cítrica em meio sintético que resultou numa produção de 85 (g.L⁻¹) de ácido cítrico. Entretanto, Maddox et al. (1985) apresentaram resultados parecidos em fermentação em meio sintético utilizando misturas binárias de açúcares (50 g/L de xilose + 50 g/L de glicose), sendo que o fungo utilizou 48 g de glicose e apenas 13 g de xilose, num tempo de fermentação de 14 dias.

Bonatelli Jr. et al.(1982), realizando fermentação em meio sintético Prescott & Dunn (1959), por um período de 7 dias, obtiveram uma produção máxima de 92 (g.L⁻¹) a partir de uma cepa de fungo *Aspergillus niger* mutante, após 48 h de incubação. Angumeenal & Venkappayya (2005) utilizaram polpa de jaca como substrato para a produção de ácido cítrico e obtiveram uma produção de 73 (g.L⁻¹) no período de 48h de fermentação. Os meios utilizados foram enriquecidos com sacarose e o meio sintético também foi utilizado para comparação.

EL-Aasar (2006), utilizou como substrato para a produção de ácido cítrico soro de queijo e melão de beterraba e obteve uma produção máxima acumulada de 47,63 (g.L⁻¹), após um período de 6 dias de fermentação, e observou, neste caso, que o pH 6,0 é o ideal para a produção de ácido cítrico, diferente do observado por outros autores anteriormente citados.

Leonel e Cerada (1995) realizaram ensaio comparando a produção de ácido cítrico em meio sintético de Prescott e Dunn (1959) e em meio elaborado com manipueira, sendo obtida uma produção de 2,5 e 2,8 (g.L⁻¹), após um período de incubação de 7 dias, respectivamente, no entanto os autores observaram baixo crescimento do fungo, e conseqüentemente o baixo acúmulo

de ácido cítrico no meio e acreditam que o não crescimento do micro-organismo se deva ao alto teor de cianeto, maior que (70 mg.L^{-1}) da manipueira utilizada por eles. Os valores de produção de ácido cítrico encontrados por estes autores são inferiores aos encontrados neste trabalho, porém o fato da redução do crescimento do fungo como ocorreu também neste trabalho juntamente com possíveis contaminações do meio, contribuíram também para a baixa de produção do ácido encontrada neste estudo.

El-Samragy et al. (1996) relataram testes com soro de queijo, utilizando *Aspergillus niger*. Utilizaram rotação de 100 rpm e temperatura de 30°C , como neste trabalho. Na primeira fase do seu experimento eles utilizaram quatro faixas de pH diferentes (2,0; 3,5; 4,0 e 5,0), sem adição de fonte de carbono ou qualquer outro nutriente, e obtiveram $0,03 \text{ g.L}^{-1}$, $1,06 \text{ g.L}^{-1}$, $0,06 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico, acumulado no 9º dia de fermentação, respectivamente para os valores de pH mencionados. O melhor pH encontrado pelos autores foi de 3,5 e está de acordo com este trabalho, pois no pH 3,44 ocorreu a produção máxima de ácido cítrico. Em relação à produção de ácido, este trabalho apresentou valores superiores na condição de ausência de glicose que foi de $10,21 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$. Segundo Kareem et. al (2011) a produtividade de ácido cítrico ocorre preferencialmente após 24 h de incubação. Esse estudo está de acordo com a máxima produtividade encontrada para o mesmo período de incubação.

Dorouneh et al (2009), obtiveram uma produtividade de $13,4 \text{ g/L.dia}$ em fermentação submersa, após um período de 10 dias, utilizando o meio sintético Prescott & Dunn (1959), entretanto ao utilizar um meio enriquecido com melão de cana de açúcar obteve uma produtividade de 12 g/L.dia após 10 dias. Os resultados encontrados por estes autores foram maiores aos encontrados neste trabalho, visto que o meio sintético Prescott & Dunn (1959) é suplementado com sacarose, fornecendo

assim, maior quantidade de açúcares fermentescíveis para a produção de ácido e consequentemente de aumento de produtividade.

Comparando os tratamentos, observa-se que houve um aumento na produção de ácido cítrico do tratamento 1 (100% café) ao tratamento 4 (80% café e 20% maracujá), como é mostrado com mais clareza no gráfico 2, isso se deve possivelmente ao aumento do teor de açúcares, nutrientes e a acidez do meio, visto que a farinha da casca de maracujá é mais ácida quando comparada ao extrato da polpa de café (Tabela 2), sendo benéfica à produção de ácido cítrico, uma vez que a acidez mais elevada do meio reduz a contaminação por outros microorganismos e produção de ácidos orgânicos indesejáveis como ácido oxálico e ácido glucônico, aumentando a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007).

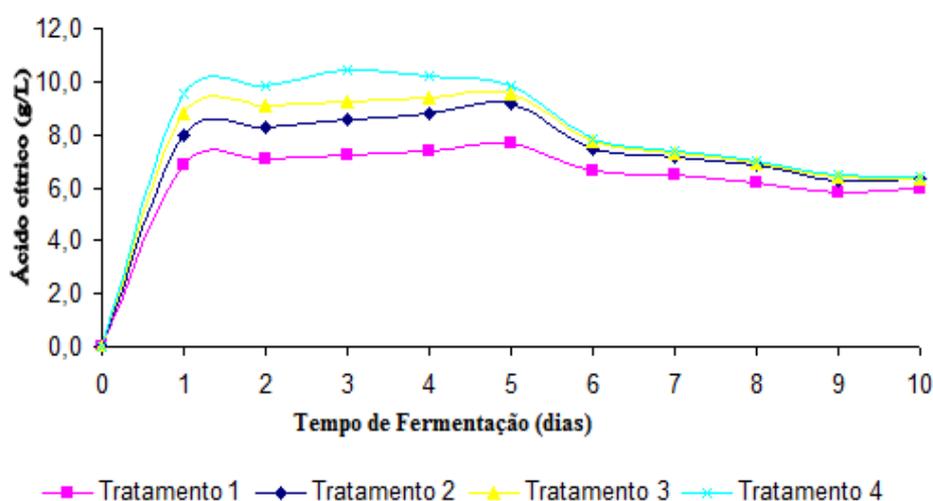


Gráfico 2 Comparação da produção de ácido cítrico para diferentes tratamentos em função do tempo de fermentação

Com base na tabela 3, com exceção do tratamento 4, todos os demais tratamentos apresentaram a máxima produção de ácido cítrico no 5º dia de fermentação, com posterior redução na produção do ácido. Essa redução está associada ao declínio da viabilidade celular, quando o microorganismo tende a realizar o fracionamento do material extracelular, realização de autólise e também o consumo do ácido cítrico produzido (VANDENBERGHE, 2000).

Comparando o tratamento 1 (100% de extrato da casca melosa do café) com o tratamento 11 (100% de farinha da casca de maracujá), observa-se na tabela 3, que a produção de ácido cítrico foi maior para este último meio de fermentação. Considerando os maiores valores de produção do ácido, no tratamento 1, a maior produção ocorreu no 5º dia de incubação e foi de 7,65 (g.L⁻¹) de ácido cítrico, enquanto para o tratamento 11, a maior produção ocorreu no foi de 8,89 (g.L⁻¹) de ácido cítrico para o mesmo período de tempo de fermentação. Sendo assim, quando comparados, o tratamento 11 apresentou-se mais eficiente na produção de ácido cítrico do que o tratamento 1, uma vez que produziu maior quantidade do ácido no mesmo período de tempo.

Isso se deve ao fato da farinha da casca de maracujá apresentar maior concentração inicial de açúcar em relação ao extrato da casca melosa do café (tabela 2) e, conseqüentemente maior produção de ácido cítrico. Este aspecto é de fundamental importância, uma vez que o fungo consome substrato (açúcar) para a formação de produto (ácido). Outro aspecto importante é o fato da polpa de café possuir quantidades consideráveis de celulose, taninos, e compostos fenólicos que podem ter efeitos inibitórios no processo fermentativo, reduzindo a produção de ácido cítrico (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE et al., 1999). Contudo, a melhor composição do meio para a produção de ácido cítrico é composta por 70% de extrato da casca melosa do café e 30% de farinha da casca de maracujá (tratamento 4), como visto anteriormente.

4 CONCLUSÕES

Foi observado que o isolado de *Aspergillus niger* (A. niger 00144) tem potencial para fermentar o meio contendo extrato da polpa de café e farinha da casca de maracujá no intuito de produzir ácido cítrico e otimizar os resíduos agroindustriais gerando valor agregado. Além disso, mesmo em baixas concentrações de açúcares fermentescíveis (glicose), ocorreu o acúmulo de ácido cítrico no caldo de fermentação, obtendo um valor máximo de produção de ácido que foi de 10,21 (g.L⁻¹) em pH 3,44 para o meio contendo 70% de extrato da polpa de café e 30% de farinha da casca de maracujá amarelo, sendo essa composição do meio considerada a mais promissora na produção de ácido cítrico. A produtividade máxima encontrada para esta amostra foi de 9,52g/L.dia e ocorreu 24 horas após a incubação.

Foi observado que mesmo sem o acréscimo de glicose no meio, o fungo foi capaz de produzir ácido cítrico utilizando somente o açúcar natural presente nos resíduos agroindustriais, e em curto período de incubação. Contudo, outras faixas de pH devem ser testadas para buscar a otimização da fermentação e aumento na produção de ácido cítrico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de aplicações industriais, a utilização de biorreatores em processo contínuo, com a entrada de substratos ao longo do processo seria um forma de evitar o decréscimo da produção de ácido cítrico, queda do pH e do consumo de açúcares, gerando assim uma produção constante de ácido cítrico ao longo do processo fermentativo.

A utilização dos resíduos gerados do processo fermentativo, pode ser esterilizado em autoclave e utilizado como adubo na lavoura cafeeira, visto que o meio foi enriquecido com nitrogênio, fósforo, potássio e outros minerais. Outro destino para o resíduo é a queima para a geração de energia durante a secagem do café.

REFERÊNCIAS

ABECITRUS – Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html> acessado em Janeiro de 2006.

AMARO, A. P.; BONILHA, P. R. M.; MONTEIRO, M. Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e microbiológicas da polpa de maracujá. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 13, p. 151-162, 2002.

ANGUMEENAL, A., VENKAPPAYYA, D. Atrocarpus heterophyllus – a potential substrate for citric acid biosynthesis using *Aspergillus niger*. **LWT Food Sci. Technol.** v. 38, p. 89–93. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis of the **Association of Official Analytical Chemistry**. 17. ed. Washington, DC, 2000.

BONATELLI Jr., R., AZEVEDO, J.L., CALENT, G.U. Citric acid production by *Aspergillus Niger* mutants, **Revista Brasileira de Genética**, v.3, p.483-492, 1982.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CLARK, D.S; ITO, K; HORITUS, H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. **Biotechnol Bioeng.**, vol.8, 465-471 (1966).

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, P, I.O., CAPALBO, D.M.F. Fermentação em Estado Sólido. In: Schmidell, W. 158 ENGEVISTA, V. 13, n. 3. p. 149-159, dezembro 2011 et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

DHANKAR, H.S; ETHIRAJ, S; VYAS,S.R. Effects of methanol on citric acid production from sugar cane molasses by *A. niger*. **Ind J. Technol**, v.12, p.316-317 (1974)

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. Carbohydrate chemistry. **New York: Academic**, 1962. p. 477-512.

DOROUNEH, E., ALAVI, A, VOSOUGHI, M., ARJMAND, M., SEIFKORDI, A., RAJABI, R. Citric acid production: Surface culture versus submerged culture. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, n.9, p. 541-545, 2009.

EL-AASAR, S.A., Submerged Fermentation of Cheese Whey and Molasses for Citric acid Production by *Aspergillus niger* **International Journal Of Agriculture & Biology**, Disponível em acesso em 18/07/2010 Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, Egypt, 2006.

EL-SAMRAGY, Y. A.; KHORSHID, M. A.; FODA, M. I., SHEHATA, A. E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.411-416, 1996.

FALCONER, P. *et al.* Caracterização físico-química de frutos de seis cultivares de maracujá azedo (*Passiflora spp.*) produzidos no Distrito Federal. In: Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujazeiro, 5, 1998, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal, 1998. p. 257-79.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos de industrialização do maracujá-Aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p. 101-102, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v26n1/a27v26n1.pdf>. Acesso em Janeiro de 2015.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.

FRAGUAS, R. M., SIMÃO, A. A., LEAL, R. S., SANTOS, C. M., ROCHA, D. A., TAVARES, T. S., MARQUES, T. R., DUARTE, M., MARCUSSI, S., ABREU, C. P. Chemical composition of processed baru (*Dipteryx alata* Vog.) almonds: Lyophilization and roasting. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 1061-1069. 2014.

HANG, Y. D; LUH, B.S; WOODAMS, E.E. Microbial production on citric acid by solid state fermentation of kiwi fruit peel, **J. Food. Sci.**, v.52, p.226-227, 1987.

HORITSU, H. Citric acid fermentation of *A. niger* with tower fermenter, II, Effect of manganese on growth, respiration and citric acid production of *A.niger*, **Hakko Kyokaishi**. V.29, p.460-464, 1977.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. v.1, 533p.

JERNEJC, K; CIMERMAN, A; PERDIH, A. Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 14, p 29-33, 1982.

KAHLON, S.S. Production of citric acid by *Aspergillus* sp. isolated from different sources, **J. Res. Punjab Agric. Univ.**, v.19, p.44-50, 1982.

KAPOOR, K.K; CHAUDHARY, K; TAURO, P. Citric acid. In: Prescott and Dunn's Industrial **Microbiology**, 4ed, G. Reed (ed.) AVI Publishing Co., Westport, CT, 1983.

KAREEM, S. O.; AKPAN, I.;ALEBIOWU, O. O. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 6, p. 161-165, 2011.

KHAN, M.A.A; HOSSAIN, M; KBALIQUE, M.A ;RAHMAN, M.A. Methods of citric acid production from molasses by *A. niger*. **Pak. J. Sci. Ind. Res.**, v.13, p.439-444, 1970.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando como substrato Bagaço de Mandioca**. Curitiba, 1995. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR.

KUBICEK, C.P., ROHR, M. Citric acid fermentation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.3, Boca Raton, 1986.

LAL, D.N. The influence of some ammonium compounds on the production of citric acid by *A. niger* AL 29, **Ind. 1. Agri. Chem.**, v.13, p.153-157, 1980.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.

LEONEL, M., CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, 1995.

MACHADO, S. S. et al. Caracterização física e físico-química de frutos de maracujá amarelo provenientes da região de Jaguaquara – Bahia. **Magistra**, v. 15, n. 2, p. 229-223, 2003.

MADDOX, I.S; SPENCER, K; GREENWOOD, J.M; DAWSON, M.W; BROOKS, J.D. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*, **Biotechnol. Lett**, v.7, p. 815-818, 1985.

MANONMANI, H.K; SREEKANTIAH, K.R. Studies on the conversion of cellulose hydrolysate into citric acid by *A. niger*, *Process. Biochem.*, v.22, p.92-94, 1987.

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. 235 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MUSHNIKOVA, L.N; EGLIT, I.T. Trace and major element requirements in culture of acid producing fungi, **Khelbopok. Konditer. Promst**, v.3, p.34-36, 1984.

NAGEL, F.J., OOSTRA, J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. **Process Biochemistry**, v.35, p.69-75, 1999.

PAPAGIANNI M., MATTEY M., KRISTIANSEN B., The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture, **Enz. Microbial Technol.** 25, 710-717, 1999.

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

PEREIRA, A. C. da S. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de frutas tropicais e cítricas produzidas no ceará.** 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

POCASANGRE, H., FINGER, F., BARROS, R., RUSCHANN, R. Development and ripening of yellow passion fruit. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n. 4, p. 573-6, 1995.

PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. **Industrial microbiology.** 3.ed., New York:Mc Graw-Hill Book, 1959.

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.

PUROHIT, H.S; DAGINAWAL, H.E. Isolation of microorganisms for citric acid production from tamarind seed powder. **J. Soc. Pure Appl. Nat. Sci.** v.1, p.10-15, 1985.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 1998.

ROSA, D. P.; ROMERO, J. T.; CATELAM, K. T. **Análises físico-química da polpa de maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis flavicarpa*).** Disponível em <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_00471990167.pdf> Acesso em Janeiro de 2015.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery waste by *A. niger*. **Enz. Microbial. Techno.**, v.9, p.391-394, 1987.

SANCHEZ-MARROQUIN, A, R. CARRENO and M. LEDCZMA. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *A. niger*. **Appl. Microbiol.** v.20, p.888- 892, 1970.

SANTANA, F. C.; SILVA, J. V.; SANTOS, A. J. A. O.; ALVES, A. R.; WARTHA, E. R. S. A.; MARCELLINI, P. S.; SILVA, M. A. A. P. Desenvolvimento de biscoito rico em fibras elaborado por substituição parcial da farinha de trigo por farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) e fécula de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 391-399, 2011.

SANTOS, R.S; PRATA, A.M.R. Growth of *Aspergillus niger* in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for citric acid. In:10th European Congress on Biotechnology. **Biotechnological challenges in the new millennium** - July 8 - 11, Madrid, Spain, 2001.

SINGH, J; MEHROTRA, B.S. Mycological production of citric acid in India. IV, Role of sulphur and phosphorous compounds, **Sydowia Ann. Myco.** v.26, p.235-242, 1975.

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

TOCCHINI, R. P. *et al* Processamento: produtos, caracterização e utilização. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2. ed. **rev. e ampl.** Campinas, 1994. 267 p. (Série Frutas Tropicais, n° 9).

VANDENBERGUE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A; LEBEAULT, J. M. Review: microbial production of citric acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p. 263-276, 1999.

VANDENBERGHE, L. **Développement d'un Procédé pour la Production d'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro-industrie du Manioc**. Tese de doutorado, Université de Technologie de Compiègne, 205 p., 2000.

XU, D.B., MADRID, C.P., ROHR, M., KUBICEK, C.P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.30, p. 553-561, 1989.

YIGITOGU, M. Production of citric acid by fungi. **Journal of Islamic Academy of Sciences**. 5, 1992.

YOKOYA, F. Fermentação cítrica. Campinas: **Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"**, 79 p., 1992.

OTIMIZAÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

Maysa Costa Alves^{*}, Renato Silva Leal, Sara Maria Chalfoun, Karine Canestri Ribeiro, Elaine Costa Pereira, Giovani Tirelli, Tatiane Martins, Luiz Roberto Marques Albuquerque, Guilherme Cleto e Carlos José Pimenta

^{*} Department of Food Science, Federal University of Lavras – UFLA.
Zip Code 37200.000, Lavras, MG, Brasil

Artigo elaborado segundo as normas da revista
“African Journal of Agricultural Research”
“versão preliminar”

ABSTRACT

The agribusiness and food sectors produce large amounts of waste, both liquid and solid. The observation over time proved that these residues may have elevated problems of disposal and pollution potential, as well as representing, often, loss of biomass and high-value nutrients, such as the coffee pulp derived from wet processing coffee and yellow passion fruit peel flour used in this study. In a particular way, the bioconversion of agricultural residues and food industry is receiving increasing attention, since these materials represent possible and usable resources for the synthesis of useful products. Due to the amount of nutrients available in the agroindustrial waste they can be converted to commercial products or raw materials for secondary processes. In this context the submerged fermentation plays a prominent role in the use of solid waste aiming at the synthesis of various compounds with high added value and of great industrial interest, such as citric acid, for example. The optimization of the culture medium and processing parameters, is intended to contribute to the increase in the production and yield of citric acid and to facilitate its recovery at the end of the process. This work was carried out in order to optimize the culture medium with 70% of coffee pulp extract and 30% of the shell flour aimed at increasing production of citric acid by *Aspergillus niger* (A. niger 00114) in submerged fermentation. After optimization of the culture medium, the

maximum production of citric acid was $11.82 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ at pH 1.88 and occurred on the fourth day of incubation. Thus, there was an increase of $1.61 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ citric acid when compared to no optimal culture medium. Thus, the optimization of parameters of the media was an important factor for the increase in the production of organic acids and allowed the detailed study of the influence of each variable optimized in the final product.

Keywords: Optimization. Fermentation. Coffee pulp. Passion fruit peel. Citric acid.

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico fraco, que se pode encontrar nos citrinos. É usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas. Em bioquímica, é importante o seu papel como intermediário do ciclo do ácido cítrico, de forma que ocorre no metabolismo de quase todos os seres vivos (MILLIS, 1985).

O ácido cítrico é obtido na indústria graças à fermentação da sacarose realizada por um micro-organismo chamado *Aspergillus niger*. O processo de obtenção apresenta várias fases como a preparação do substrato de melaço, a fermentação aeróbica da sacarose pelo *Aspergillus*, a separação do ácido cítrico do substrato por precipitação ao adicionar hidróxido de cálcio, ou cal apagada, para formar citrato de cálcio e, depois, é adicionado ácido sulfúrico para decompor o citrato de cálcio. A eliminação das impurezas é realizada com carvão ativado ou resinas de troca iônica, continuando com a cristalização do ácido cítrico, secagem ou desidratação e o empacotamento do produto (MILLIS, 1985).

A produção de ácido cítrico depende principalmente do potencial de síntese do micro-organismo utilizado, porém as condições do processo e a composição do meio fermentativo são variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover um acréscimo no rendimento (MILLIS, 1985). Desde 1930, segundo Uchimura (2006), existe a preocupação sobre os mecanismos bioquímicos que provocam a acumulação de ácido cítrico no meio de cultivo com esses micro-organismos. O ácido cítrico só se acumula de duas maneiras: ou quando vários nutrientes estão presentes em altas concentrações (açúcar, acidez, oxigênio) ou quando estão em níveis abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato). Várias situações

bioquímicas parecem cooperar na produtividade em ácido cítrico. Por causa disso, nem sempre a influência de fatores individuais pode ser determinada sem que haja influência sobre outros fatores.

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. Os resíduos agroindustriais são os substratos mais pesquisados. Em geral são baratos e abundantes. Além do mais, têm estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúvel em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de microrganismos. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura miceliar de fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de resíduos agroindustriais como substrato, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, etc (CORREIA, 2004).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o meio de cultura contendo 70 % de extrato da casca melosa do café e 30 % de farinha da casca de maracujá amarelo e analisar a influência das variáveis de cultivo otimizadas na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras - UFLA, no Laboratório de Análises Avançadas, no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG-UFLA. A obtenção das matérias-primas, do extrato da polpa de café (*Coffea arabica L.*) e da farinha da casca do maracujá amarelo foram realizadas conforme explicitado no artigo 1.

2.1 Microorganismo

O isolado de *Aspergillus niger* (A. niger 00114) foi obtido do fruto do café. O Laboratório de Microbiologia do ECOCentro da EPAMIG (Lavras-MG) forneceu o isolado usado neste trabalho. Este isolado foi identificado como não produtor de Ocratoxina A.

2.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo foi composto por 70% de extrato da casca melosa do café (*Coffea arabica L.*) e 30% de farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg.*). Este meio foi escolhido por apresentar a maior produção de ácido cítrico em menor tempo de incubação, como estudada no artigo 1.

2.3 Otimização do meio de cultura

A otimização do meio de cultura foi feita de acordo com Kolicheski; Soccol (1995). As variáveis: fonte de nitrogênio e micronutrientes adicionados na forma de sais ao meio de fermentação foram estudados, devido à importância em diversos mecanismos de crescimento do *Aspergillus niger* e formação de ácido cítrico. A composição otimizada do meio foi de nitrato de amônio (NH_4NO_3) ($1,12 \text{ g.L}^{-1}$),

dihidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4) (200 mg.L^{-1}), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (500 mg.L^{-1}), sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (375 mg.L^{-1}) e ajuste do pH do meio para 2,0 com solução de HCl 1M.

2.4 Descrição do experimento

Antes de iniciar as fermentações, o meio foi autoclavado, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos. Após a esterilização, o meio foi resfriado a aproximadamente $30 \text{ }^\circ\text{C}$, inoculado com 1 mL da suspensão com 10^8 esporos/mL e incubado a 28°C e 100 rpm em “shaker” de bancada durante 10 dias de fermentação.

Foram coletados 15 mL de cada amostra a cada 24h, durante 10 dias de fermentação para as análises de, pH, Açúcares Redutores Totais (ART), ácido cítrico produzido e crescimento fungico (biomassa). Os valores de pH foram medidos no mesmo dia da coleta. Os precipitados das amostras foram usados para as análises de ART, biomassa e determinação de ácido cítrico.

2.5 Métodos analíticos

As análises realizadas para o meio otimizado estão descritas a seguir.

2.5.1 Açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares totais foram determinados espectrofotometricamente, a 620 nm utilizando uma curva padrão de glicose de acordo com o método de antrona proposto por Dische (1962) e apresentados como g de glicose por 100g do alimento ou (%). As amostras foram diluídas quando necessário.

2.5.2 pH

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca QUIMIS, modelo 400 A (QUIMIS/BRASIL), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 conforme AOAC (2000).

2.5.3 Biomassa

A biomassa foi determinada através da diferença de peso após centrifugação em tubo tipo falcon de 50 mL, previamente pesado em balança analítica de acordo com Kolicheski (1995).

2.5.4 Determinação, identificação e quantificação de ácido cítrico

Para o preparo das amostras, pesou-se 100 mg de amostra para cada dia de fermentação, adicionou-se 5 mL de água Milli-Q (Millipore Corporation) e levou-se ao banho ultrassônico durante 15 minutos. O ácido cítrico produzido no processo fermentativo foi analisado por cromatografia de alta eficiência (CLAE). Para o preparo das amostras, pesou-se 100 mg de cada amostra, adicionou-se 5 mL de água Milli-Q (Millipore Corporation) e levou-se ao banho ultrassônico durante 15 minutos. O cromatógrafo utilizado é um equipamento da marca Shimadzu, com sistema de detecção por condutividade (CDD-6A), polaridade +, uma pré-coluna SHIM-PACK-H(G) (50 mmx7.8 mm) e duas colunas em série SHIM-PACK SPR-H (250 mm x 7.8mm).

A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de 16 mM de Bis-Tris, 4 mM de ácido p-tolueno sulfônico e 100 µM de EDTA; com fluxo de 0,8 mL/min. O volume a ser injetado da amostra foi de 20 µL e a temperatura de injeção de 45°C. As amostras foram filtradas através de filtros de seringa (0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro). O ácido cítrico foi detectado via UV (absorbância 210 nm). A identificação foi feita por comparação com tempos de

retenção das amostras com o respetivo padrão do ácido, e a quantificação foi feita por meio de curva-padrão. (FRAGUAS et al., 2014).

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado na fermentação foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância pelo programa SISVAR 5.1[®] (FERREIRA, 2008). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Scott_knott, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das variáveis otimizadas

As condições do processo e a composição do meio fermentativo são variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover um acréscimo na produção de ácido cítrico (MILLIS, 1985). Assim, o acompanhamento das variáveis otimizadas permite a obtenção da influência de cada uma no processo.

3.2 pH

O comportamento do pH em função do tempo de fermentação para a amostra contendo 70% de café e 30% de farinha da casca do maracujá antes e depois da otimização do meio está representado no gráfico abaixo.

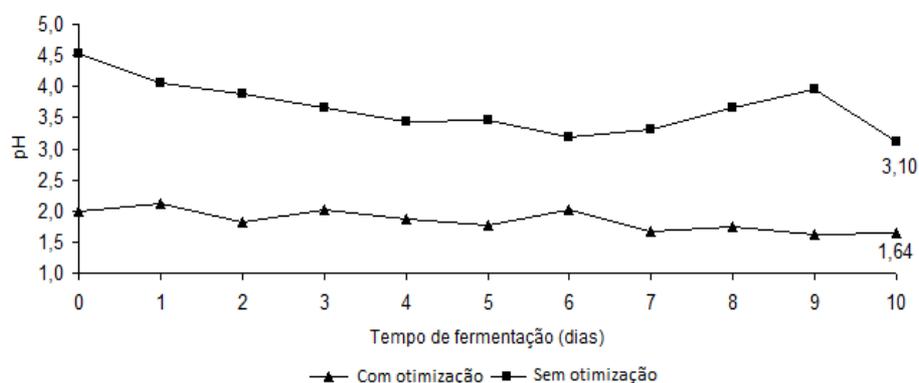


Gráfico 1 Comportamento do pH em função do tempo de fermentação antes e depois da otimização do meio de cultura

O pH do meio de fermentação é conhecido como um dos parâmetros mais críticos para os processos de produção de ácido cítrico. Relata-se que o pH inicial do meio de fermentação deve ser muito bem definido e otimizado, dependendo do microorganismo, substrato e técnica de produção (Fawole e Odunfa, 2003).

Pode-se observar no gráfico 1, oscilações em ambos os processos, visto que o meio não foi tamponado. Sem otimizar o meio de cultura, o pH teve uma constante diminuição até o 4º dia e voltou a aumentar a partir do 6º dia de incubação, esse aumento possivelmente ocorreu devido à contaminações do meio por outros microorganismos e ao consumo de ácido cítrico pelo fungo. No meio otimizado ocorreram oscilações de pH, porém o meio mais ácido evita contaminações por outros microorganismos, fazendo com que o meio não tenha seu pH alterado bruscamente.

Em ambos os meios observa-se a redução do pH com o tempo de incubação, em decorrência do consumo da matéria orgânica e de nutrientes do meio e à produção de ácido cítrico. A enzima aconitase e/ou isocitrato-desidrogenase, contribui para a degradação do ácido cítrico e quando o pH do meio é menor que 3, a enzima é inibida, ocorrendo maior acúmulo de ácido cítrico. O pH inicial requerido depende da fonte de carbono usada. Em geral, o pH abaixo de 2 é o mais utilizado para a otimização da produção do ácido e tem a vantagem de favorecer o crescimento de fungos e leveduras, prevenir uma possível contaminação por bactérias e inibir a produção de ácido oxálico (KUBICEK; ROHR, 1986). Em valores de pH iguais ou superiores a 4,0 a formação de ácido oxálico é acelerada devido à alta capacidade de tamponamento do meio (USAMI; FUKUTOMI, 1977). A maioria dos fungos filamentosos se desenvolvem bem sob condições ligeiramente ácidas, variando de 3 a 6, mas alguns fungos são capazes de crescer a um pH abaixo de 2 para melhor competir contra bactérias (Fawole e Odunfa, 2003). Para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, a faixa de pH inicial de 2 a 6 é comumente utilizado em substrato sólido e fermentação submersa (Watanabe et al., 1998; Adham, 2002; Lesniak et al., 2002). Grewal e Kalra (1995), sem levar em conta o tipo de crescimento do fungo, ressaltaram que um pH a partir de 2,0 é necessário para uma produção ótima para quase todos os substratos.

3.3 Influência do nitrogênio, fósforo e metais traço com o aumento da produção de ácido cítrico

As quantidades de nitrato de amônio (fonte de nitrogênio utilizada neste estudo) e de dihidrogenofosfato de potássio foram adicionadas ao meio de cultivo nas concentrações (1,12 g/L e 200 mg/L, respectivamente), visando o aumento da produção de ácido cítrico, visto que o acúmulo desse ácido está relacionado às condições limitantes de nitrogênio e fósforo. Os íons magnésio e zinco também foram avaliados, tendo em vista que esses metais divalentes podem afetar a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Shankaranand; Lonsane, 1994).

A tabela 1 mostra as variáveis: produção de ácido cítrico, pH, açúcar consumido e biomassa, após a otimização do meio de cultura.

Tabela 1 Teores de pH, ART, Ácido cítrico e Biomassa para o tratamento com 70% de extrato da casca melosa do e 30% de farinha da casca de maracujá após a otimização

pH	ART (%)	Ácido cítrico (g/L)	Biomassa (g/L)
2,11 ^a	3,84 ^a	10,52 ^d	34,36 ^e
1,83 ^e	3,06 ^b	11,01 ^c	47,06 ^a
2,01 ^c	2,32 ^d	11,45 ^b	36,98 ^b
1,88 ^d	1,72 ^g	11,82 ^a	35,55 ^c
1,77 ^f	2,32 ^d	10,42 ^e	31,46 ^f
2,02 ^b	2,38 ^c	8,46 ^f	30,32 ^g
1,65 ^h	1,85 ^f	8,05 ^g	34,49 ^d
1,74 ^g	2,05 ^e	7,67 ^h	26,17 ^h
1,62 ^j	1,59 ^h	7,17 ⁱ	24,93 ⁱ
1,64 ⁱ	1,54 ⁱ	7,01 ^j	23,44 ^j

* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de significância, pelo teste Scott_Knott

Como citado anteriormente por Kubicek; Rohr (1986), o $\text{pH} < 3$ inibe a ação de enzimas reguladoras do ciclo de Krebs, fazendo com que ocorra o acúmulo de ácido cítrico e reduz a contaminação por outros microorganismos. Sendo assim, pode-se observar na tabela 2 que o pH otimizado contribuiu para a maior produção de ácido cítrico e no pH 1,88 a produção máxima de ácido foi de $11,82 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$. Estatisticamente, os valores de pH, ácido cítrico, açúcar consumido e biomassa diferiram entre si à 5% de significância, devido às oscilações que ocorrem durante a fermentação. As oscilações na produção de ácido cítrico ocorreram devido à produção de gás carbônico como relatado por Priede; Thomas (1999). O gráfico 2 mostra que o fungo ao consumir açúcares do meio, excreta ácido cítrico promovendo a queda do pH.

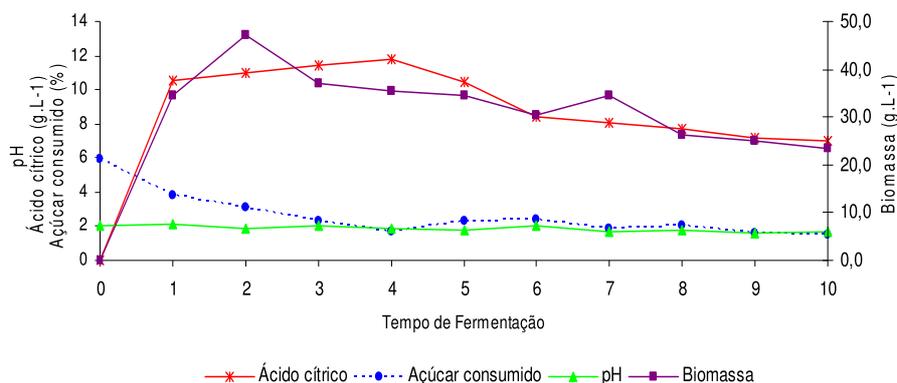


Gráfico 2 Produção de ácido cítrico durante a fermentação

Sabe-se que a produção de ácido cítrico ocorre principalmente em células na fase estacionária e em menor quantidade nas células em fase de crescimento (KUBICEK; ROHR, 1986). Esse fato pode ser observado no gráfico 2. Após a fase estacionária, o fungo voltou a germinar a partir do 6º dia de incubação, porém não ocorreu aumento na produção de ácido. A otimização da fonte de nitrogênio e fósforo, contribuiu para o aumento da produção do

ácido cítrico, pois esse aumento está relacionado às condições limitantes de nitrogênio e fósforo no meio (HANG et al., 1987). Os minerais, zinco e magnésio também foram otimizados, pois auxiliam no aumento da produção de ácido cítrico. Assim, após a otimização do meio de cultura, a produção de ácido cítrico aumentou de 10,21 (g.L⁻¹) para 11,82 (g.L⁻¹) no mesmo tempo de incubação (4 dias) (gráfico 3) ou seja; houve um acréscimo de 1,61 (g.L⁻¹) de ácido cítrico definindo-se assim como melhor condição o pH de 1,88 sem a adição de glicose no meio fermentativo.

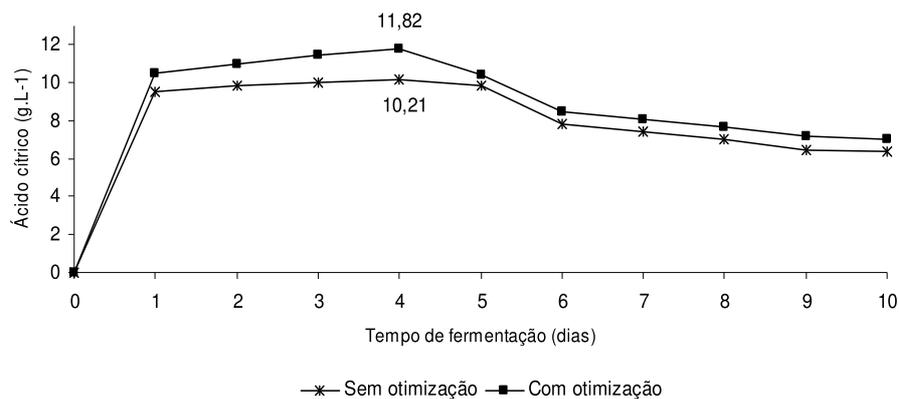


Gráfico 3 Comparação de produção de ácido cítrico antes e depois da otimização do meio de cultura

A seguir, será feita uma abordagem sobre influência do nitrogênio, fósforo e metais traço no metabolismo do fungo e no aumento da produção de ácido cítrico.

O nitrogênio é necessário na produção de ácido cítrico por fungos, e geralmente sua fonte é sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, uréia, etc (DHANKAR, 1974; HANG, 1977; KAHN, 1982; LAL, 1980; MANONMANI, SREEKANTIAH, 1987). O consumo de

nitrogênio leva à diminuição do pH, que é um ponto muito importante para a fermentação do ácido cítrico (Rohr et al., 1983, e Kubicek Rohr, 1986).

O ácido cítrico só se acumula de duas maneiras: ou quando vários nutrientes estão presentes em altas concentrações (açúcar, acidez, oxigênio) ou quando estão em níveis abaixo do ótimo (íons metálicos, nitrogênio, fosfato). Uma elevada concentração de nitrogênio aumenta o crescimento de fungos e o consumo de açúcares, mas diminui a quantidade de ácido cítrico produzido (Cair et al., 1977).

O nitrogênio tem influência na síntese de enzimas que regulam o ciclo de Krebs e na via glicolítica (PANDA et al., 1984). Uma excessiva produção de ácido cítrico e isocítrico foi observada sob limitação de crescimento por nitrogênio ou outros componentes minerais como enxofre, fósforo e magnésio (RYMOWICZ et al., 2008). De acordo com Habison et al. (1983); Rohr e Kubicek (1981), a deficiência de manganês ou fosfato e limitação de nitrogênio, inibe o anabolismo de *Aspergillus niger* e a degradação resultante de proteínas leva ao aumento da concentração de íon amônio. Este aumento é capaz de contrabalancear a inibição exercida pelo ácido cítrico na enzima fosfofrutoquinase, acarretando no acúmulo de ácido cítrico no meio (HABISON et al. (1983).

Elevadas concentrações de íon amônio e glicose também reprimem a síntese da enzima α -cetoglutarato-desidrogenase, inibindo a via catabólica do ciclo de Krebs, contribuindo para a acumulação de ácido cítrico (HABISON et al. (1983).

O fósforo é conhecido por ser essencial para o metabolismo e crescimento de *Aspergillus niger*, na síntese de ácidos nucleicos e nos processos de transferência de energia. A presença de fosfato no meio tem um grande efeito sobre a produção de ácido cítrico. Assim como o nitrogênio, baixos níveis de fósforo favorecem a produção de ácido cítrico, no entanto, a presença de excesso de fósforo provoca uma diminuição na fixação de CO₂, estimulação de crescimento do fungo (WOOD et al., 2006; LI et al., 2008) e, conseqüentemente, a redução da produção de ácido cítrico.

Os cátions bivalentes: zinco, cobre, manganês, ferro e magnésio têm apresentado influência na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (MUSHNIKOVA; EGLIT 1986; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1987). Assim como o nitrogênio, quando esses elementos limitam o crescimento vegetativo, há maior produção de ácido cítrico (CLARK et al., 1966; HORITSU, 1977; SANCHEZ-MARROQUIN, 1970). No caso do íon magnésio, a literatura cita a sua importância para o crescimento celular. A fonte utilizada comumente é o sulfato de magnésio e a concentração ótima varia entre 0,02-0,025% (KAPOOR et al., 1983). Sendo assim, a combinação desses fatores, favoreceram o aumento da produção de ácido cítrico neste estudo.

Kolicheski e Soccol (1995), obtiveram um aumento de 6,6% para 18% no rendimento de ácido cítrico após a otimização do meio de cultura contendo 70 (g.L⁻¹) e pH 2,0. Rodrigues et al. (2006) ao otimizar os parâmetros físico-químicos do processo obteve um aumento na produção de ácido cítrico de 383,5 (g.Kg⁻¹) para 450 (g.Kg⁻¹) utilizando polpa cítrica seca de PC seca em pH de 3,5 solução a 108 (g.L⁻¹) de açúcares totais durante 4 dias a 30°C. Estes resultados foram superiores ao encontrado neste trabalho, pois os meios continham maior concentração de açúcares e neste trabalho foi utilizada somente a concentração natural de açúcares presente nos subprodutos do café e do maracujá.

4 CONCLUSÕES

Após a otimização do meio de cultura, houve o aumento da produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (A. niger 00114) de 10,21(g.L⁻¹) para 11,82 (g.L⁻¹). Ficou comprovado que o ajuste do pH do meio fermentativo para 2,0 e a otimização das variáveis foram fatores importantes no aumento da produção do ácido, pois evitaram possíveis contaminações do meio por outros microorganismos e atuaram na inibição das enzimas reguladoras do ciclo de Krebs, favorecendo o acúmulo do ácido cítrico.

Assim, as condições ótimas para o aumento da produção de ácido cítrico neste estudo foram de pH 1,88, (1,12 g.L⁻¹) de nitrato de amônio, (NH₄NO₃), (200 mg.L⁻¹) de dihidroxifosfato de potássio, (500 mg.L⁻¹) de sulfato de magnésio heptahidratado e, (375 mg.L⁻¹) de sulfato de zinco heptahidratado.

REFERÊNCIAS

ADHAM, N.Z. (2002). Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Biores. Technol.**, 84:97-100

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis of the **Association of Official Analytical Chemistry**. 17. ed. Washington, DC, 2000.

CLARK, D.S; ITO, K; HORITUS, H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. **Biotechnol Bioeng.**, vol.8, 465-471 (1966).

DHANKAR, H.S; ETHIRAJ, S; VYAS,S.R. Effects of methanol on citric acid production from sugar cane molasses by *A. niger*. **Ind J. Technol**, v.12, p.316-317 (1974).

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. Carbohydrate chemistry. **New York: Academic**, 1962. p. 477-512.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.223-227, 2003.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.

FRAGUAS, R. M., SIMÃO, A. A., LEAL, R. S., SANTOS, C. M., ROCHA, D. A., TAVARES, T. S., MARQUES, T. R., DUARTE, M., MARCUSSI, S., ABREU, C. P. Chemical composition of processed baru (*Dipteryx alata* Vog.) almonds: Lyophilization and roasting. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 1061-1069. 2014.

GREWAL, H.S; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, No 2. pp.212, 1995.

Habison, A.; Kubicek, C.P.; Röhr, M. (1979). Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid accumulating *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiol. Lett.** 5, 3942.

HANG, Y. D; LUH, B.S; WOODAMS, E.E. Microbial production on citric acid by solid state fermentation of kiwi fruit peel, **J. Food. Sci.**, v.52, p.226-227, 1987.

HORITSU, H. Citric acid fermentation of *A. niger* with tower fermenter, II, Effect of manganese on growth, respiration and citric acid production of *A.niger*, **Hakko Kyokaiishi**. V.29, p.460-464, 1977.

KAHLON, S.S. Production of citric acid by *Aspergillus* sp. isolated from different sources, **J. Res. Punjab Agric. Univ.**, v.19, p.44-50, 1982.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando como substrato Bagaço de Mandioca**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR. Curitiba, 1995. 137 f.

KOLICHESKI, M. B, SOCCOL, C.R. **Otimização do meio e condições de cultura na produção de ácido cítrico por fermentação submersa**. Curitiba, 1995. Setor de Tecnologia, UFPR.

KUBICEK, C.P., ROHR, M. Citric acid fermentation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.3, Boca Raton, 1986.

LAL, D.N. The influence of some ammonium compounds on the production of citric acid by *A. niger* AL 29, Ind. 1. **Agri. Chem.**, v.13, p.153-157, 1980.

LEONEL, M., CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, 1995.

MANONMANI, H.K; SREEKANTIAH, K.R. Studies on the conversion of cellulose hydrolysate into citric acid by *A. niger*, **Process. Biochem.**, v22, p.92-94, 1987.

MUSHNIKOVA, L.N; EGLIT, I.T. Trace and major element requirements in culture of acid producing fungi, **Khelbopok. Konditer. Promst**, v.3, p.34-36, 1984.

MILLIS, Millis, N. F., The organisms of biotechnology In: MOO-YOUNG M. **Comprehensive Biotechnology**, Oxford: Pergamon, V.1. 1985

PANDA T., KUNDU S., MAJUMDAR S.K., **Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using idian cane molasses**, Process Biochemistry, 1984.

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.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGUE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção- de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR. Curitiba, 2006.

Röhr, M.; Kubicek, C.P. (1981). Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Process Biochem.** 16, 3437.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery waste by *A. niger*. **Enz. Microbial. Techno.**, v.9, p.391-394, 1987.

SANCHEZ-MARROQUIN, A, R. CARRENO and M. LEDCZMA. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *A. niger*. **Appl. Microbiol** . v.20, p.888- 892, 1970.

UCHIMURA, M. S.. Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR. 20 jan. 2006. <http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt1995.pdf> Acesso em Janeiro de 20015.

USAMI, S; FUKUTOMI, N. **Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse and concentrated liquor of pineapple waste**, Hakk kogaku, v.55, p.44-50, 1977.

Watanabe, T., Suzuki, A., Nakagawa, H., Kirimura, K., Usami, S. (1998). Citric acid production from cellulose hydrolysate by 2-deoxyglucose resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. **Biores. Technol.**, 66:271-274

Wood, D.A. (1979). A new method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. **Biotechnology Letters**. p.255-260.