

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM TECNOLOGIA  
AMBIENTAL  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Ezequiel Bavaresco Cremonese**

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS OLEOQUÍMICOS PARA PRODUÇÃO  
DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE *Aspergillus niger***

Santa Cruz do Sul, novembro de 2012

**Ezequiel Bavaresco Cremonese**

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS OLEOQUÍMICOS PARA PRODUÇÃO  
DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Co-Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul, novembro de 2012.

**Ezequiel Bavaresco Cremonese**

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS OLEOQUÍMICOS PARA PRODUÇÃO  
DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE *Aspergillus niger***

Esta Dissertação foi submetida ao Programa de Pós Graduação – Mestrado em Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

---

*Dr. Rafael Costa Rodrigues*  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Viviane Gomes Muller*  
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

---

*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Teresinha kist*  
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

---

*Dr<sup>a</sup>. Rosana de Cassia de Souza Schneider*  
Professora orientadora – UNISC

---

*Dr. Valeriano Antonio Corbellini*  
Professor co-Orientador – UNISC

Santa Cruz do Sul, novembro de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora professora Rosana Schneider por ter me concebido uma bolsa de estudos e também por toda a orientação, apoio, paciência, respeito. Ao co-orientador, professor Valeriano Antonio Corbellini pelas ideias as quais contribuíram para o aprimoramento e desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Mestrado em Tecnologia Ambiental que de alguma forma contribuíram ao longo destes dois anos de trabalho. Obrigado a todos por dividirem um pouco de seus conhecimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas de pesquisa Carla Cremonese, Clairton dos Santos, João Vitor Pasa, Gabriela Zimmer, pelo auxílio prestado, e em especial a Manuella Schneider bolsista CNPq que me acompanhou e teve grande importância durante a realização deste trabalho.

Aos meus gestores da Central Analítica, que me proporcionaram flexibilidade em meus horários de trabalho.

Aos meus colegas do Mestrado em Tecnologia Ambiental pela convivência e amizade formada, em especial aos grandes amigos Alexandre, Gilberto, Rangel, Carolina e Rosana Muller.

Em especial a minha esposa Carla C. K. Cremonese, que me deu total apoio, seja psicológico e também de conhecimento, durante toda a realização deste trabalho.

E por fim a Deus, por ter me dado saúde, força, inspiração, durante esta longa jornada.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um  
pedaço do seu futuro que deixa de existir”*

STEVE JOBS

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o aproveitamento da torta de tungue e mamona para produção de ácidos orgânicos com ênfase no ácido cítrico por Fermentação em Fase Sólida. Para tal, foi avaliada as condições de produção (crescimento), rendimentos e matérias-primas envolvidas nos bioprocessos. Primeiramente foi realizada a padronização das condições de FFS em torta de tungue e mamona, com e sem gordura residual e em diferentes concentrações de glicerol, tais como, 0, 10, 20 e 40%, utilizando o fungo *A. niger*. Este fungo foi inoculado na torta e seu desenvolvimento foi acompanhado por sete dias consecutivos. Para monitoramento da produção de ácido cítrico foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e Espectroscopia na região do Infravermelho para observar possíveis transformações durante o processo fermentativo. Também foi realizado o acompanhamento do crescimento dos fungos por método colorimétrico e a atividade lipase por método potenciométrico. Tanto na torta com e sem gordura o fungo obteve potencial de crescimento, porém foi observado que tanto na torta de mamona como na de tungue, com gordura, o fungo obteve melhor desenvolvimento. Na torta de mamona e de tungue, com gordura na concentração de 20% de glicerol, foram encontrados os maiores rendimentos em ácido cítrico 35% e 34% (m/m) respectivamente.. A maior atividade lipase, tanto na torta de tungue como na de mamona foi encontrada em meio sem gordura e com 40% de glicerina Para avaliar o sistema de produção de ácido cítrico foi realizado a análise quimiométrica utilizando a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e foi possível constatar que há correlação entre os dados obtidos por HPLC e por espectroscopia e foi possível concluir que o modelo pode ser utilizado para predição da produção de ácido cítrico nas condições testadas. Assim, o fungo em associação com as diferentes condições em que foi submetido, em substratos derivados de processos oleoquímicos (torta e glicerina), apresentou potencialidade para a produção de ácido cítrico.

**PALAVRAS CHAVE:** torta, tungue, mamona, FFS, glicerina, *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

This work has propurse to study the use of cake tung and castor for the production of organic acids with emphasis on citric acid Fermentation by Solid Phase. To this end, we evaluated the conditions of production (growth), income and raw materials involved in bioprocesses. Firstly was performed to standardize the conditions of FFS pie tung and castor oil, with and without residual fat and different concentrations of glycerol, such as 0, 10, 20 and 40% using the fungus *A. niger*. This fungus was inoculated into the pie and their development was monitored for seven consecutive days. To monitor the production of citric acid analyzes were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and Infrared Spectroscopy in the region to observe possible changes during the fermentation process. It was also performed to monitor the growth of fungi by colorimetric method and lipase activity by potentiometric method. Both the pie with and without fat fungus got potential, but it was observed that both the castor bean as in tung, with fat, the fungus got better development. In castor bean and tung with fat at a concentration of 20% glycerol, were found in the highest yield 35% citric acid and 34% (m / m) respectively. The highest lipase activity in both pie tung as in castor oil was found in medium without fat and 40% glycerin to evaluate the system for citric acid production was performed using chemometric analysis for Partial Least Squares Regression (PLS) and it was established that there is a correlation between data obtained by HPLC and spectroscopy and it was concluded that the model can be used to predict the production of citric acid under the conditions tested. Thus, the fungus in combination with the different conditions under which it was subjected to substrates derivatives oleochemical processes (and glycerin pie) showed potential for citric acid production

**KEYWORDS:** pie, tung, castor, FFS, glycerin, *Aspergillus niger*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

FFS- Fermentação em Fase Sólida

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FT-IR- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

PLS- Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

TCG- Torta de tungue com gordura

TSG- Torta de tungue sem gordura

MCG- Torta de mamona com gordura

MSG- Torta de mamona sem gordura

TCG- 0,10, 20 ou 40% - Torta de tungue com gordura com respectivo percentual de glicerina

TSG- 0,10, 20 ou 40% - Torta de tungue sem gordura com respectivo percentual de glicerina

MCG- 0,10, 20 ou 40% - Torta de mamona com gordura com respectivo percentual de glicerina

MSG- 0,10, 20 ou 40% - Torta de mamona sem gordura com respectivo percentual de glicerina

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Reação de transesterificação de óleos vegetais .....	20
Figura 2. Representação microscópica do <i>A. niger</i> . (A) conidióforo, e (B) formação dos corpos de frutificação.....	22
Figura 3. Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs .....	26
Figura 4. Fluxograma do delineamento da pesquisa proposto.....	29
Figura 5. Reação da glicosamina pelo método colorimétrico. ....	33
Figura 6. Aspectos das tortas: A) tungue e B) mamona.....	37
Figura 7. Registro fotográfico das placas referente ao cultivo de <i>A. niger</i> USP 898 por CMR em ágar Sabouraud (superior), em torta de tungue (médio) e por homogeneização com substrato (inferior). A: tempo zero, B: 24 horas, C: 48 horas e D: 72 horas.....	40
Figura 8. Avaliação de cloridrato de glicosamina pelo método colorimétrico em FFS em torta de tungue .....	42
Figura 9. Rendimento de ácido cítrico da FFS da torta de tungue quantificado em HPLC.....	44
Figura 10. Avaliação de pH durante a FFS de TCG e TSG .....	46
Figura 11. Curva de atividade lipase em TCG.....	48
Figura 12. Curva de atividade lipase em TSG.....	49
Figura 13. Rendimento de ácido cítrico da FFS da torta de mamona quantificado em HPLC .....	51
Figura 14. Avaliação de pH durante a FFS de MCG e MSG .....	53
Figura 15. Curva de atividade lipase em MCG.....	54
Figura 16. Curva de atividade lipase em MSG .....	55
Figura 17. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de <i>A. niger</i>	

USP 898 da torta de tungue com gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .....	58
Figura 18. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de <i>A. niger</i>	
USP 898 da torta de tungue sem gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .....	59
Figura 19. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de <i>A. niger</i>	
USP 898 da torta de mamona com gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .....	59
Figura 20. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de <i>A. niger</i>	
USP 898 da torta de mamona sem gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol.....	60
Figura 21. Correlação entre espectros de FT-IR e áreas de HPLC referente a previsão de concentração de ácido cítrico para FFS de MSG. ....	64

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Utilização de micro-organismos em processos biotecnológicos em diferentes segmentos da indústria.....	19
Tabela 2. Aplicações industriais da fermentação em fase sólida .....	24
Tabela 3. Potencial de produção de ácido cítrico em fase sólida utilizando variadas cepas de <i>A. niger</i> .....	25
Tabela 4. Caracterização físico-química de subprodutos oleoquímicos.....	38
Tabela 5. Resultados do teor de metais nas tortas de tungue e de mamona ..	38
Tabela 6. Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais.....	57
Tabela 7. Figuras de mérito referentes aos diferentes modelos PLS-DRIFTS de previsão de concentração de ácido cítrico supervisionada por HPLC.....	63

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	17
2.1	Produção mais limpa .....	17
2.2	Aproveitamento de resíduos vegetais.....	19
2.3	Glicerina .....	20
2.4	<i>Aspergillus niger</i> .....	21
2.5	Fermentação em fase sólida (FFS) .....	23
2.6	Produção de ácidos orgânicos .....	24
2.6.1	Ácido cítrico .....	25
2.7	Produção de lipases .....	27
3	METODOLOGIA .....	29
3.1	Delineamento da pesquisa .....	29
3.2	Amostragem .....	30
3.2.1	Caracterização dos subprodutos oleoquímicos .....	31
3.3	Avaliação do potencial de assimilação de tungue por <i>A. niger</i> .....	31
3.4	Bioprocesso de FFS .....	32
3.5	Monitoramento do bioprocesso .....	32
3.5.1	Produção de biomassa .....	33
3.5.2	Produção de lipase .....	34
3.6	Avaliação de pH.....	35
3.7	Produção de ácido cítrico .....	35
3.7.1	Análise por HPLC .....	35
3.7.2	Análises por FT-IR .....	35
3.8	Tratamento quimiométrico .....	36
4	RESULTADOS.....	37

4.1	Caracterização dos subprodutos oleoquímicos .....	37
4.2	Resultados da FFS em torta de tungue .....	39
4.2.1	Avaliação do potencial de assimilação de tungue por <i>A. niger</i> .....	39
4.2.2	Bioprocesso de FFS .....	40
4.3	Monitoramento do bioprocesso .....	41
4.3.1	Produção de biomassa .....	41
4.3.2	Produção de ácido cítrico .....	43
4.3.3	Avaliação do pH.....	45
4.3.4	Análise da atividade lipase .....	47
4.4	Resultados em FFS em torta de mamona .....	50
4.4.1	Bioprocesso de FFS .....	50
4.4.2	Produção de ácido cítrico .....	51
4.4.3	Avaliação do pH.....	52
4.4.4	Análise da atividade lipase .....	54
4.5	Aplicação de FT-IR associada a quimiometria para quantificação de ácido cítrico supervisionada por HPLC .....	56
4.5.1	Análise quimiométrica.....	61
5	Considerações finais .....	66
6	SUGETÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	67
7	REFERÊNCIAS.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para promover uma mudança no processo produtivo que visa diminuir os impactos negativos à natureza.

Já no século XX, a produção industrial tornou-se muito dependente da energia fóssil e a petroquímica assumiu um papel central, sendo em boa parte uma indústria de materiais. No início do século XXI, a necessidade de uso de biocombustíveis em substituição ao petróleo, tornou-se realidade, pois: de um lado, a ameaça de escassez, a instabilidade de preços e a distribuição desigual a petróleo têm causado até mesmo guerras; de outro lado, a necessidade de estancar o atual processo de mudanças climáticas causadas pela atividade antropogênica, especialmente pelas emissões de CO<sub>2</sub>, metano e óxidos de nitrogênio. Além disso, o desenvolvimento tecnológico exige alguns elementos para ir ao encontro da sustentabilidade: a emergência de novas tecnologias e a transição para uma economia sustentável, baseada em recursos renováveis. Com isso, várias situações foram propostas para diminuir a problemática da poluição ambiental, muitos estudos têm sido propostos para viabilizar as novas tecnologias de utilização de matérias-primas para obtenção de produtos que possam gerar valor agregado e também diminuir os custos de produção.<sup>1,2</sup>

A problemática ambiental ocasionada com a maior demanda de produção de biodiesel é o aumento na geração de resíduos e de subprodutos. Atualmente têm sido propostas algumas formas de aproveitamento desses resíduos, as principais indicações para a utilização da torta gerada no processo de extração do óleo vegetal das sementes de oleaginosas são para a alimentação animal, como adubo orgânico, produção de energia térmica e tem-se estudado que este subproduto tem grande potencial na biotecnologia para crescimento e transformações microbiológicas, para produção de ácidos orgânicos. A glicerina, principal co-produto da reação de transesterificação dos óleos vegetais, vem sendo alvo de estudos para a sua transformação química em produtos de maior valor agregado, sobretudo para a produção de aditivos

para combustíveis, e de intermediários, por exemplo, para a produção de plásticos.<sup>3</sup>

As tecnologias em questão são as biotecnologias e/ou tecnologias de transformação, que estão contribuindo para um avanço contínuo e acelerado na introdução de novos materiais funcionais e estruturais.

O contexto da transição para a sustentabilidade teve como principal determinante a necessidade ou o interesse estratégico de se substituir petróleo por outras matérias-primas, mas outros elementos estão adquirindo importância crescente: a disponibilidade de água, a contaminação dos oceanos, a perda de qualidade e extensão de áreas agrícolas ao lado das necessidades crescentes de vastas populações que buscam melhores condições de vida. Uma estratégia para esta transição está em grande parte baseada no uso crescente de matérias-primas produzidas pelo agronegócio, oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos, criando o risco de uma competição pelo uso da terra para a produção de alimentos, energia e matérias-primas industriais.<sup>4</sup>

Considerando a matéria-prima renovável e a inovação incorporada à biotecnologia, atualmente é realizada com maior capacidade a produção de ácidos orgânicos, biomassa, lipases e biossurfactantes, sob condições de metabólitos primários, a conversão de açúcar em álcool (na produção de bebidas e combustíveis) e a conversão de açúcar em ácido lático (como ocorre na produção do queijo). Com o passar do tempo, os processos fermentativos foram desenvolvidos, e foram isolados novos micro-organismos com potencial produtivo.<sup>5</sup>

Neste contexto, a utilização de políticas de substituição de combustíveis de petróleo e o aumento de resíduos vegetais da cadeia produtiva dos biocombustíveis, exigem o estudo de alternativas de aproveitamento para estes resíduos, mais especificadamente do biodiesel. Além disso, desenvolvimento de energias alternativas é uma escolha inevitável para o crescimento econômico, e sustentável, de uma região.<sup>6</sup>

Somam-se a isto, os incentivos governamentais nos últimos anos, que tiveram um papel importante para impulsionar a produção de biodiesel. A grande quantidade de biodiesel produzido gerou também uma quantidade

excedente de glicerol, co-produto gerado na transesterificação. Na produção de uma tonelada de biodiesel em larga escala são gerados em torno de cem quilos de glicerina.<sup>7</sup>

Assim como a glicerina deve ser melhor aproveitada, alguns resíduos agroindustriais podem conter substâncias de alto valor agregado. Se os resíduos forem empregados com uma tecnologia adequada, podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

Numerosas substâncias (co-produtos ou resíduos) relacionadas aos processos produtivos são adequadas para sua reutilização. Entre os processos biotecnológicos mais envolvidos podem ser citados três exemplos de implementação de transformação de resíduos de agroindústrias em produtos de valor agregado: 1) transformação de resíduos em ingredientes para a indústria de sucos e panificação; 2) uso dos resíduos como bioadsorvente em tratamento de resíduos; e, 3) bioconversão dos resíduos por fermentação em fase sólida.<sup>8</sup> Esta última transformação é que se objetiva este trabalho, associando o reaproveitamento de resíduos e co-produtos da cadeia produtiva do biodiesel.

Com base no exposto o objetivo deste trabalho foi estudar o aproveitamento das tortas de tungue e mamona e também da glicerina para produção de ácidos orgânicos com ênfase no ácido cítrico por fermentação em fase sólida utilizando *Aspergillus niger*. Para tal proposta foi avaliada condições de produção (crescimento), rendimentos e matérias-primas envolvidas nos bioprocessos.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Os estudos em oleoquímica, inseridos numa proposta de sustentabilidade e de conscientização ambiental, têm buscado alternativas ao uso de derivados de petróleo, como combustíveis, ceras, resinas e lubrificantes, uma vez que, estão intimamente ligados à poluição ambiental durante a produção e o uso.

No Brasil, existe uma grande disponibilidade de matéria-prima para a produção de biodiesel, e sua produção está acelerada devido à adição ao diesel, e em consequência, a quantidade de glicerina gerada também está aumentando e a demanda por este co-produto não aumenta na mesma proporção. Por isso, é necessário buscar alternativas para o uso desta glicerina excedente. Na forma pura, o glicerol, o principal componente da glicerina tem várias aplicações industriais. Segundo Rivaldi et al.<sup>9</sup>, os processos para a purificação do glicerol incluem várias etapas, representando um custo bastante alto para pequenos e médios produtores de biodiesel, assim a sua utilização em processos biotecnológicos, pode agregar maior valor aos produtos provenientes de rotas fermentativas.

Contudo, a produção de biodiesel, a partir de sementes oleaginosas representa também uma fonte renovável, que gera muitos resíduos vegetais na etapa agrícola e na extração. A torta ou farelo gerado apresentam grande potencialidade para serem utilizados nos processos biotecnológicos como nutrientes.

### **2.1 Produção mais limpa**

Impactos ambientais são efeitos oriundos de ações no meio natural, social e antropogênica, e a minimização da geração de impactos são consideradas através da política de gerenciamento no âmbito industrial agrícola e de consumo. E, a educação da sociedade e a coordenação de ações impactantes permitem a incorporação de opiniões de diversos grupos sociais na minimização destes impactos e modificações de processos.<sup>10</sup>

O aprimoramento e/ou desenvolvimento dos principais fontes produtoras de resíduos e a conseqüente geração de impactos ambientais,

contribuem para o controle de poluição. Neste contexto têm sido elaborados métodos diferenciados durante um processo para reintroduzir resíduos gerados ao processo evitar o chamado *fim-de-tubo* em evolução aos conceitos da Produção mais Limpa. Sobre a questão a reutilização dos resíduos, pode-se considerar uma mudança de concepções, pois o que antes era um problema com pouca solução, agora é um processo a ser otimizado que ganhou importância. Isto só foi possível após a percepção de que o resíduo não era inerente ao processo, mas pelo contrário, era um claro indicativo da ineficiência deste. Portanto, é a identificação e análise do resíduo que dará início à atividade de avaliação de Produção mais Limpa.<sup>11</sup>

Para auxiliar no desenvolvimento de processos mais sustentáveis, a biotecnologia tem muito a ser explorada, pois é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente favoráveis. As etapas dos processos biotecnológicos a serem considerados são coleta de material biológico adequado, triagem de materiais com potenciais adequados, seleção e aplicação dos materiais com os melhores potenciais para o desenvolvimento de um produto ou processo industrial. Nas aplicações dos processos biotecnológicos o valor dos micro-organismos é avaliado de forma direta pelo seu potencial de aplicação e/ou transformação no processo e pelo valor de mercado do produto gerado e de forma indireta pelos benefícios ambientais e sociais decorrentes do tratamento de resíduos industriais e poluição ambiental, tais processos e segmentos envolvidos estão demonstrado na Tabela 1. A propulsão do desenvolvimento biotecnológico está diretamente relacionada à economia, direcionada principalmente pelas indústrias que buscam o desenvolvimento de novos produtos e os avanços da ciência e tecnologia. Em suma a biotecnologia é voltada à inovação, no sentido em que proporciona tecnologias inteiramente novas para atividades industriais existentes e permite a geração de novas indústrias e produtos.<sup>12</sup>

**Tabela 1 - Utilização de micro-organismos em processos biotecnológicos em diferentes segmentos da indústria**

Segmento	Processos biotecnológicos
Indústria de alimentos	produção e preservação de alimentos produção de bebidas aromas e essências aditivos para alimentos
Indústria farmacêutica	antibióticos, antimicrobianos e antivirais vitaminas e hormônios vacinas e probióticos biotransformações em química fina
Agro-Indústria	aumento de fertilidade do solo fixação biológica de nitrogênio controle biológico de insetos e patógenos promotores de crescimento de plantas compostagem e tratamento biológico de resíduos
Indústria Química	produção de matérias-primas assimilação de metano e enxofre enzimas de aplicação industrial bioprodução de ácidos orgânicos

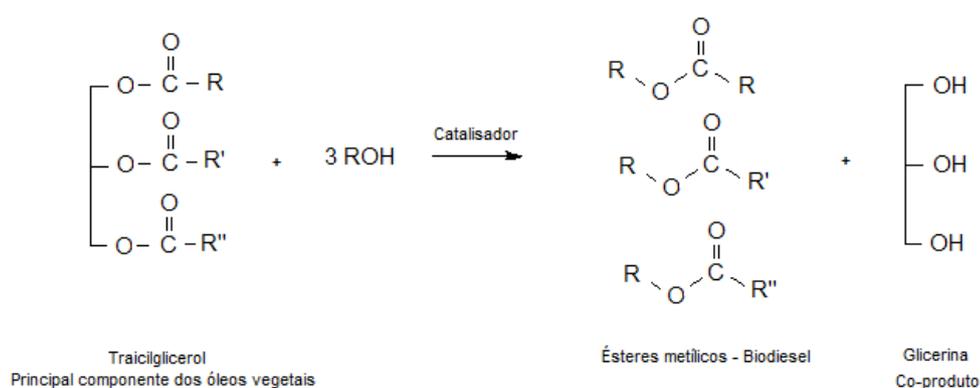
Fonte: Adaptação de Canhos & Manfio<sup>13</sup>

## 2.2 Aproveitamento de resíduos vegetais

Entre os vegetais que podem ser utilizados para produção de biodiesel está o tungue (*aleurites sp*), que é uma árvore de pequeno porte, originária da Ásia ganha destaque de produtividade na região sul do Brasil em virtude do clima favorável a seu plantio, longevidade e baixo custo de extração do óleo. A produtividade do óleo de tungue varia de 300 a 450 kg há<sup>-1</sup>, sendo que o teor de óleo da fruta pode variar de 14 e 20%, o das sementes 30-40 %. Possui propriedades de polimerização e secagem rápida devido ao índice elevado de ácido  $\alpha$ - oleostearico.<sup>14</sup>

## 2.3 Glicerina

A transesterificação demonstrada na Figura 1 é o principal mecanismo de obtenção do biodiesel, este processo consiste em reagir um ácido graxo, de origem animal e/ou vegetal, com um álcool (etanol ou metanol) em presença de catalisador, porém, geram alguns subprodutos que podem ter interesses industriais, tais como, farelo e torta, oriundos da extração e prensagem do óleo respectivamente e a glicerina como principal co-produto da reação de transesterificação.<sup>15</sup>



**Figura 1. Reação de transesterificação de óleos vegetais**

O glicerol (1,2,3-propanotriol), é um composto orgânico também chamado de glicerina possui fórmula molecular  $C_3H_8O_3$ , descoberto por Carl W. Scheele, em 1779, durante a separação de uma mistura aquecida de óxido de chumbo (PbO) preparada com óleo de oliva.<sup>16</sup> O glicerol está presente na composição de vegetais, tais como, soja, mamona, girassol e nos animais em forma de glicerina associada a ácidos graxos. Para o metabolismo de micro-organismos, é extremamente importante, pois atua como precursor e regulador de vias bioquímicas celulares.<sup>17</sup>

Aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol, isso o torna principal co-produto desta transformação.<sup>18</sup> Este percentual alerta para buscas alternativas para o uso do glicerol gerado, antevendo problemas devido ao acúmulo na produção, uma vez que, a produção de biodiesel deve ser aumentada com o passar do tempo.

Obtido na produção de biodiesel o glicerol possui algumas impurezas como sais, ácidos graxos álcool, óleo residual, que lhe impossibilitam de ser utilizados na indústria de alimentos onde atua como aditivo alimentar, agindo como estabilizante, antioxidante, sequestrante, emulsificante e umectante, e na indústria farmacêutica onde é utilizado em xaropes, quando o glicerol está na forma pura é muito explorado.<sup>19</sup>

O glicerol é matéria-prima para obtenção de vários produtos com valor industrial, como polímeros, obtidos através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas), aditivos para combustíveis, como ésteres.<sup>15,20</sup>

Financeiramente vários processos dependem da redução dos custos de produção e do preço final do produto, com isso, há interesse na purificação do glicerol ou no seu aproveitamento sem tratamento. Os tratamentos de purificação do glicerol incluem filtração, destilação a vácuo e troca de íons para a remoção de potássio e sódio.<sup>21</sup>

Os processos biotecnológicos para conversão microbiana do glicerol em produtos de valor agregado, em consórcio com biomassa se torna possível pois este é considerado como uma fonte de carbono altamente assimilável por fungos ou bactérias em condições aeróbicas e anaeróbicas<sup>19</sup>.

## **2.4 *Aspergillus niger***

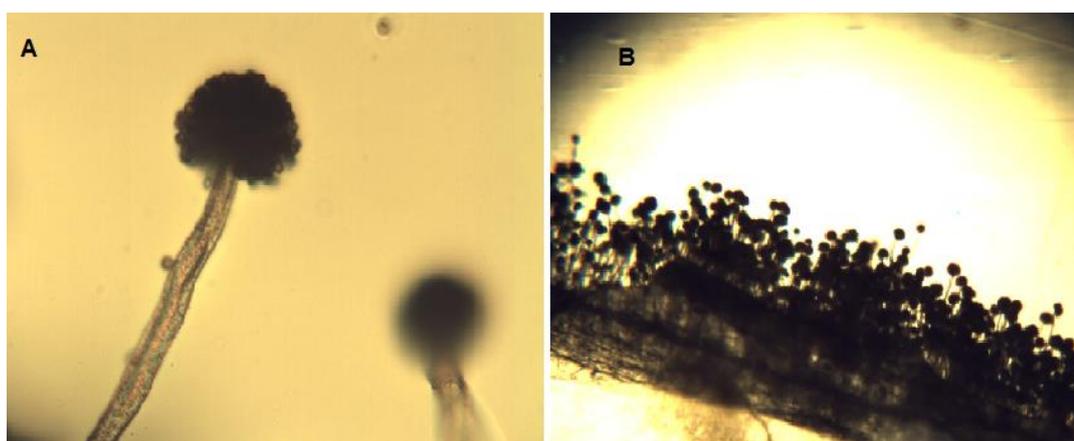
*A. niger* faz parte dos fungos filamentosos que constituem um grupo de micro-organismos aeróbios fisiologicamente diversos. Estes fungos podem ser encontrados em seu ambiente natural e/ou se desenvolver em superfície de líquidos e sólidos de tal maneira que uma grande parte de suas hifas são aéreas. É um fungo ascomiceto imperfeito (classe dos Deuteromicetos), e faz parte da família Aspergillaceae. Possui coloração preta (*niger*, preto em latim), tendo uma grande variedade de cepas e subespécies.

Durante a vida de um fungo imperfeito existem quatro etapas fisiológicas importantes que são a dormência, a germinação, a multiplicação vegetativa e a conidiogênese. Um esporo de *A. niger* em um meio favorável deixa seu estado de dormência e passa por uma etapa de germinação, passa por fenômenos

morfológicos e metabólicos permitindo ao esporo germinar, se desenvolver formando hifas e, em seguida, o micélio.<sup>22</sup>

A germinação do esporo não pode começar se a umidade ambiente for insuficiente. O esporo também deve encontrar no seu meio todos os elementos necessários para o crescimento da hifa. Neste instante a atividade metabólica é intensa (síntese de constituintes celulares, ácidos amínicos, nucleotídeos) quando comparado como crescimento vegetativo.<sup>22</sup>

*A. niger* apresenta como características particulares, colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos e estão representados na Figura 2 abaixo, medem de 3 a 5  $\mu\text{m}$  e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. Apresenta hifas finas, septados e conidióforos com vesículas recobertas por conídios pretos.<sup>23</sup>



**Figura 2. Representação microscópica do *A. niger*. (A) conidióforo, e (B) formação dos corpos de frutificação**

As principais vantagens no uso do *A. niger* são a facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de produtos finais.

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados para produção de ácidos orgânicos. O ácido cítrico é produzido via Embden-Meyerhof onde o primeiro passo é o ciclo do ácido tricarboxílico, o controle do processo envolve a inibição da fosfofrutoquinase por ácido cítrico.

O processo comercial utiliza *A. niger* em meios deficientes em ferro e manganês. A alto nível de produção de ácido cítrico também está associada com uma elevada concentração intracelular de frutose 2,6-bisfosfato, um ativador

da glicólise. Outros fatores que contribuem para a alta produção de ácido cítrico são a inibição da desidrogenase isocitrato por ácido cítrico e o pH baixo (1,7-2,0). Os valores de pH mais elevados (por exemplo 3,0) levam à produção do pH que inativa a glicose oxidase, que normalmente dão origem ao ácido glucônico. Em aproximadamente 4-5 dias, a porção do açúcar (80%) é convertido para ácido cítrico, com picos que atingem cerca de 100 g.L<sup>-1</sup>.<sup>24</sup>

## 2.5 Fermentação em fase sólida (FFS)

A fermentação em fase sólida (FFS) pode ser definida como um processo onde o micro-organismo é cultivado sobre partículas de uma matriz sólida, na qual o conteúdo de líquido está associado a um nível de atividade de água que permita o crescimento metabólico das células e não comprometa a capacidade de ligação da água com a matriz sólida.<sup>25</sup>

Este tipo de fermentação é característico, pois utiliza substratos insolúveis com baixos percentuais de água em sua composição essencial, que podem atuar como suporte fisiológico e/ou fonte de nutrientes na ausência de água.<sup>26</sup>

Vários fatores são importantes no processo de FFS; dentre eles, estão a seleção do micro-organismo, a escolha do substrato e a otimização de parâmetros.<sup>26</sup>

Devido à simplicidade e por ser economicamente mais atraente, a FFS em associação com micro-organismos como o *A. niger* tem sido muito utilizada para a produção de ácidos orgânicos.<sup>27</sup>

Considerando o potencial econômico, os processos que envolvem FFS têm sido relevantes para a obtenção de produtos para as indústrias de alimentos (humano e animal), farmacêutica e agrícola. Esses procedimentos possuem um viés econômico principalmente para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, como é o caso do Brasil, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo.<sup>28</sup>

Devido a algumas mudanças realizadas nos processos de FFS, esta possui a grande capacidade de rendimento e recuperação de produto. A FFS com fungos filamentosos têm sido muito utilizados industrialmente. Possui

como vantagens condições de cultivo muito próximas das condições naturais, pois crescem naturalmente em resíduos agroindustriais, frutas e grãos.<sup>22</sup>

Fungos filamentosos apresentam outras características estimulantes para a utilização na FFS, porque crescem em meios com baixa atividade de água (aw), baixo pH e produzem esporos, facilitando a estocagem e a preparação dos inóculos, além de simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos a tratar, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação.<sup>22,29</sup>

A Tabela 2 apresenta algumas aplicações industriais onde há o emprego do processo de FFS.

**Tabela 2. Aplicações industriais da fermentação em fase sólida**

<b>Aplicações</b>	<b>Exemplos</b>
Aditivos de alimentos	Flavorizantes, corantes
Produção de enzimas	Amilases, proteases, xilanases
Medicamentos	Penicilina
Fermentação de ácidos orgânicos	Ácido cítrico, láctico, oxálico
Metabólitos fúngicos	Hormônios

Fonte: Raimbault<sup>30</sup>

A atividade de água tem relação direta com o crescimento do micro-organismo e a síntese de metabólitos. Na FFS os micro-organismos desenvolvem-se nas partículas do substrato sólido onde grande parte da água está absorvida dentro das partículas com quantidade de água livre entre as partículas muito baixa.<sup>31,32</sup>

## **2.6 Produção de ácidos orgânicos**

A produção de ácidos orgânicos por processos biotecnológicos é muito evidenciada, principalmente com a utilização de micro-organismos mais especificadamente fungos do gênero *Aspergillus*.

### 2.6.1 Ácido cítrico

Este ácido é o principal constituinte de frutas cítricas, tais como a laranja e o limão, tem fórmula molecular  $C_6H_8O_7$ . Em média a produção anual mundial de ácido cítrico é de 1,6 milhões de toneladas, sendo utilizado em vários segmentos industriais, cerca de 70% é usado pela indústria de alimentos e bebidas, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias.<sup>33, 34</sup>

Dentre todos os ácidos orgânicos produzidos por processos biotecnológicos o ácido cítrico merece um destaque maior. A utilização do fungo *A. niger* para produção de ácido cítrico é extremamente vantajosa, pois é um catalisador de excelência devido à facilidade de manuseio, habilidade para utilizar uma grande variedade de matérias-primas, de baixo custo e altos rendimentos, a Tabela 3 demonstra o potencial de produção de ácido cítrico em fase sólida utilizando variadas cepas de *A. niger*.

**Tabela 3. Potencial de produção de ácido cítrico em fase sólida utilizando variadas cepas de *A. niger*.**

Cepa <sup>Referência</sup>	Substrato	Produção de ác. cítrico (g Kg <sup>-1</sup> )
<i>A. niger</i> YANG n°2 <sup>35</sup>	Batata doce	99
<i>A. niger</i> ACM 4942 <sup>36</sup>	Casca de abacaxi	194
<i>A. niger</i> LPB BC <sup>37</sup>	Polpa cítrica	383
<i>A. niger</i> NRRL 2001 <sup>38</sup>	Bagaço de mandioca	347
<i>A. niger</i> NRRL 567 <sup>39</sup>	Bagaço de maçã	66
<i>A. niger</i> NRRL 2001 <sup>35</sup>	Bagaço de maçã	61

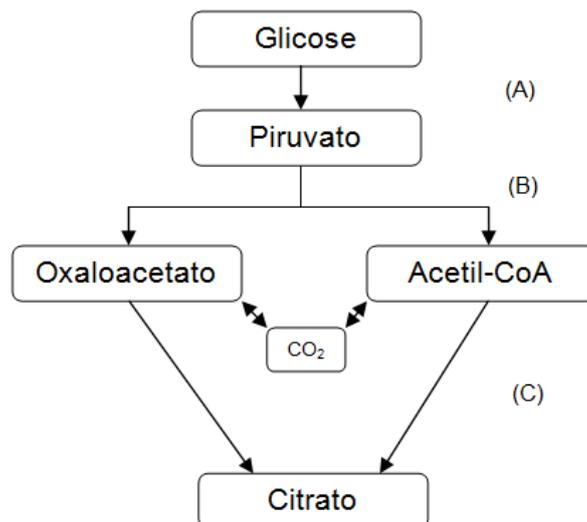
Este fungo necessita de alguns fatores favoráveis para seu desenvolvimento durante a fermentação: - neste sentido as fontes de carbono (açúcares, em especial a glicose) existentes para a fermentação de produção de ácido cítrico são importantes e as que merecem maior destaque são as que utilizam fontes de polissacarídeos, pois estes açúcares que são rapidamente absorvidos pelo fungo podem permitir um rendimento elevado na produção de ácido cítrico.<sup>38</sup>

Por outro lado quando os polissacarídeos estão hidrolisados não favorecem a produção de ácido cítrico, porque eles são metabolizados lentamente para compensar a alta taxa de açúcar necessária para a produção

de ácido cítrico e a baixa atividade enzimática, ao pH baixo que é necessária para a produção de ácido cítrico. – outro fator condicionador que favorece a germinação dos esporos do fungo é o  $\text{pH} > 5$  do meio, com a esporulação e fermentação para produção de ácido cítrico, o  $\text{pH} < 2$  é favorável, isto reduz o risco de contaminação com micro-organismos externos e não favorece a produção de outros ácidos orgânicos,  $\text{pH} \geq 4,5$  durante a fermentação pode reduzir o rendimento final de ácido cítrico em até 80%.<sup>38</sup>

O ácido cítrico é excretado como produto metabólico primário no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Durante a fermentação do ácido cítrico duas vias têm evidências, a EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) e a do HMP (monofosfato de hexose), na primeira via ocorre uma maior atividade na fase vegetativa com grande importância na glicólise da fermentação cítrica, sendo assim uma maior produção de citrato, já na segunda via ocorre maior atividade durante a fase de crescimento, porém por esta via pouco ácido cítrico é produzido.<sup>40</sup>

Bioquimicamente, por via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico é possível simplificar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose. A Figura 3 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  $\text{CO}_2$  e (C) acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs.



**Figura 3. Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs**

Fermentação em estado sólido é um recurso muito mais produtivo para produção de ácido cítrico, Vandenberghe et. al.<sup>34</sup> utilizaram três materiais sólidos oriundos de resíduos agroindustriais, bagaço de mandioca, bagaço de cana de açúcar e casca de café, e avaliaram a eficiência na produção de ácido cítrico com *A. niger*, resultados mostraram que o cultivo do fungo em bagaço de mandioca obteve melhor crescimento, dando o rendimento mais elevado de ácido cítrico entre os substratos testados, pelas análises a cepa do fungo teve boa adaptação ao substrato (bagaço de mandioca) e aumentou o conteúdo de proteína (23 g kg<sup>-1</sup>), no material fermentado a produção de ácido cítrico atingiu um máximo (88 g kg<sup>-1</sup> matéria seca), quando a fermentação foi realizada com bagaço de mandioca, com umidade de 62% a 26 ° C durante 120 h.

## 2.7 Produção de lipases

Dentre as possíveis fontes produtoras de lipases, as oriundas de processos microbianos merecem destaque. Lipases produzidas por bioprocessos de FFS, devido a altas taxas de crescimentos da biomassa e baixa atividade proteolítica.

Utilizando consórcio de micro-organismos, Santis-Navarro et. al.<sup>41</sup> propuseram FFS de resíduos industriais ricos em gordura, sob condições termofílicas (temperatura superior a 45 °C durante 20 dias) em reatores de capacidade de 4,5 L. A atividade de lipases encontrada foi de 120.000 UA g<sup>-1</sup> de matéria seca.

Na mesma linha de pesquisa Santis-Navarro et. al.<sup>39</sup>, Kumar et. al.<sup>42</sup> propuseram a inoculação em FFS do fungo *Penicillium chrysogenum* em resíduos de gordura industrial em meio Czapek adicionado de farelo de trigo em proporção 1:1:2 (m / m / v) . Este experimento obteve como rendimento de lipase 38 U mL<sup>-1</sup>, em FFS em 32 °C por 8 dias. Após a utilização da técnica estatística de planejamento fatorial (EVOP), os valores da atividade de lipase encontrado foi de até 46 U mL<sup>-1</sup> a 30 °C em pH 7,0, nas mesmas proporções de 1:1:2 (m / m / v) resíduos de gordura industrial:meio Czapek:farelo de trigo.

Em contra partida aos estudos realizados por fermentação em fase sólida, Wang et.al.<sup>43</sup> avaliaram a produção de lipases em fase submersa em

resíduos de alimentos com *Aspergillus niger* UV-60. Em concentração 2,5 % (biomassa seca), produziu  $126 \text{ U mL}^{-1}$  de glicomilases após 96 horas de fermentação, em paralelo uma concentração de 3,75 % (base úmida) rendeu uma produção de  $137 \text{ U mL}^{-1}$ , nas mesmas condições de fermentação.

Fernandes et. al.<sup>44</sup>, utilizaram a FFS em torta de mamona para avaliar a atividade de lipases, o resultado obtido foi baixo  $6,2 \text{ U g}^{-1}$  em comparação a estudos já desenvolvidos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento da pesquisa

A metodologia proposta no trabalho é descrito no fluxograma da Figura 4 abaixo.

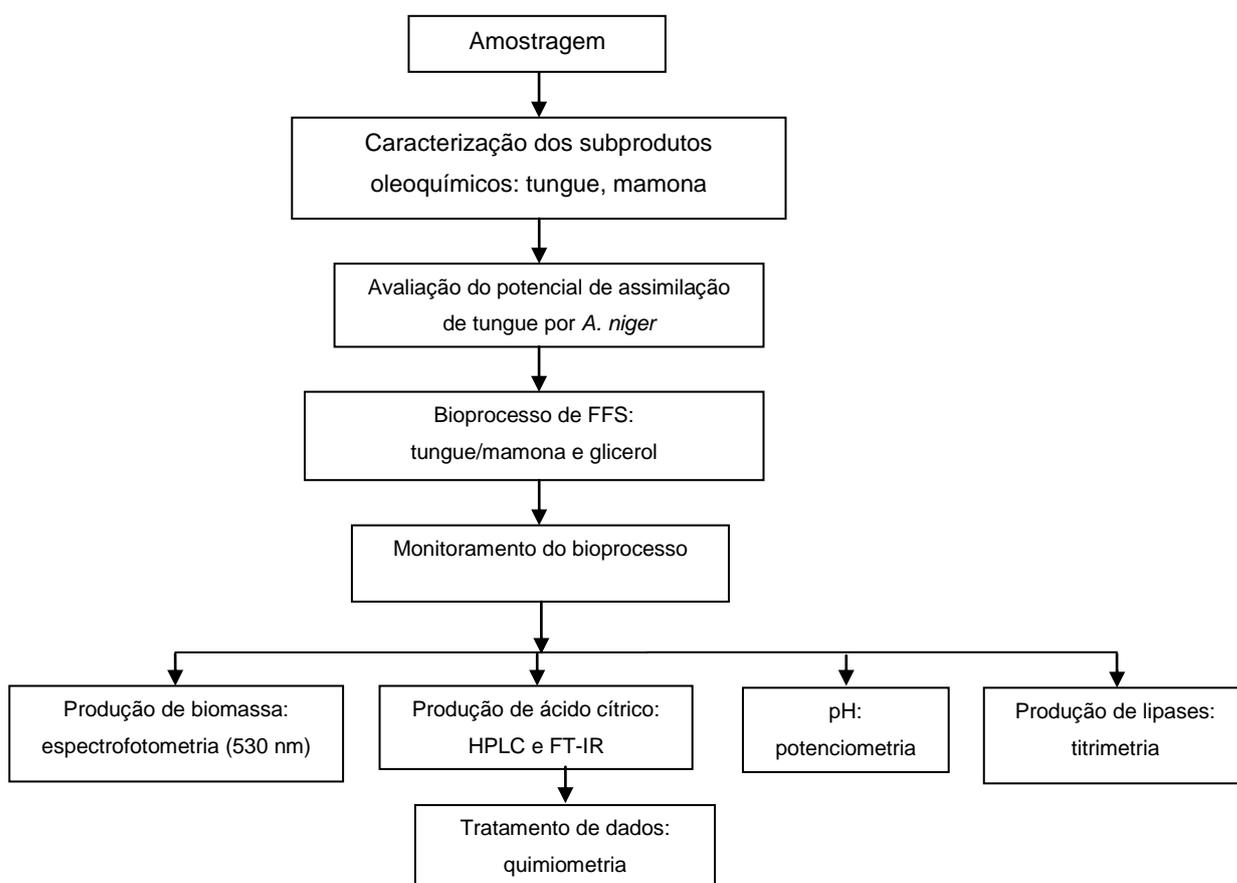


Figura 4. Fluxograma do delineamento da pesquisa proposto

O estudo consistiu de uma etapa inicial de seleção de torta de tungue e mamona como subprodutos oleoquímicos para FFS e da seleção da cepa de *Aspergillus niger* para o respectivo processo fermentativo. Na próxima etapa do processo foi realizada a caracterização bromatológica da torta de tungue e mamona através dos ensaios de determinação de proteínas (nitrogênio), teor

de óleo, acidez e cinzas. Em seguida foi realizada a avaliação do potencial de assimilação de tungue por *A. niger*. Este último experimento não foi realizado com torta de mamona por já se conhecer o potencial de crescimento do referido fungo neste substrato por estudos anteriores (dados não publicados).

A quarta etapa do estudo visou avaliar a produção de ácido cítrico, biomassa e lipase de *A. niger* por FFS sob tortas de tungue e mamona com ou sem processo prévio de extração de gordura residual e com ou sem adição de glicerol (0, 10, 20 e 40%). O monitoramento da produção de ácido cítrico, de biomassa e de lipase foi realizado por métodos de referência (espectrometria de absorvância molecular no visível, cromatografia líquida e titrimetria). Particularmente, no monitoramento da produção de ácido cítrico foi proposto um método analítico inovador baseado em FT-IR associada à quimiometria e supervisionada por HPLC (acrônimo para *High Performance Liquid Chromatography*).

### 3.2 Amostragem

A cepa de *A. niger* USP 898 foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, cuja manutenção foi realizada com inoculações periódicas em tubo inclinado contendo ágar Sabouraud (Oxoid) a  $30 \pm 2$  °C por 48 horas e mantida a 4° C por até um mês. Os esporos foram suspensos em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água esterilizada a 121° C durante 15 minutos (solução mãe). A padronização do inóculo foi realizada pela diluição seriada *pour-plate*  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

A torta de tungue utilizado neste trabalho foi fornecida pela Cooperfumos, e a torta de mamona foi produzida na planta piloto da UNISC as quais foram tamisadas, selecionando-se a fração granulométrica entre 0,42 e 0,4 mm para o estudo.

### **3.2.1 Caracterização dos subprodutos oleoquímicos**

As análises das características físico-químicas realizadas na torta de tungue e mamona foram umidade, cinzas, proteínas, fibras e lipídeos conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.<sup>45</sup> Metais (cobre, zinco, manganês, ferro e cromo) foram determinados conforme Hermes e Torres<sup>46</sup>.

Umidade foi determinada por desidratação em estufa a 50 °C por 3 horas; lipídeos totais (teores de óleo residual) por extração em Soxhlet; cinzas por queima em mufla a 650 °C; fibras pelo método de Weender e proteínas totais pelo método Kjeldahl.

As análises dos metais cobre, zinco, manganês, ferro e cromo na torta foram realizadas através de digestão ácida de 0,50 g de material seco previamente triturado com 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (Nuclear) sob aquecimento em bloco digestor a 160 °C por 2 horas. Após resfriamento adicionou-se 1 mL de HClO<sub>4</sub> (Vetec), aquecendo por mais 1 hora a 210 °C. A quantificação foi realizada em Espectrofotômetro de Absorção Atômica Varian AA55 modo chama, utilizando lâmpada de cátodo oco específico para cada metal.<sup>46</sup>

### **3.3 Avaliação do potencial de assimilação de tungue por *A. niger***

As fermentações foram realizadas na torta de tungue com óleo residual (torta com gordura) e em torta sem óleo residual (sem gordura). A extração do óleo residual foi realizada com diclorometano (Vetec) na proporção 1:2 (torta:solvente) sob agitação mecânica por 45 minutos, seguido de filtragem do material sólido e evaporação do solvente em estufa a 45 °C.

Foram avaliados dois métodos de crescimento: o crescimento por homogeneização prévia no substrato e o crescimento micelial radial. Para o primeiro método, a inoculação foi conduzida em placa de petri de 7 cm de diâmetro, contendo 8 g de material sólido (torta), esterilizado a 121 °C durante 15 minutos e acrescido de 1 mL da suspensão do fungo (solução mãe), e incubado por 72 horas a 30±2°C. Para crescimento micelial

radial a inoculação da suspensão de esporos foi conduzida no centro da placa, tendo como controle a inoculação em placa semelhante contendo 9 mL de ágar Sabouraud.

A assimilação de tungue foi avaliada visualmente levando em consideração a formação de hifas, que representa a fase inicial do crescimento e a viabilidade celular do fungo ao meio, a formação de esporos (esporulação), que indica o estágio de reprodução assexuada do fungo no meio.

### **3.4 Bioprocesso de FFS**

A cepa do micro-organismo foi inoculada em diferentes condições: 1º) torta com óleo residual (com gordura) e torta sem óleo residual (sem gordura); 2º) diferentes concentrações de glicerol no meio de fermentação, sendo estas 0, 10, 20 e 40%.

A inoculação foi conduzida em placas de petri de 7 cm de diâmetro (em triplicatas), contendo 8 g de substrato sólido (torta com ou sem gordura, esterilizado a 121 °C durante 15 minutos), acrescido de glicerol (0, 10, 20 e 40%, esterilizado separadamente), homogeneizado, acrescido de 1 mL da suspensão de  $1 \times 10^{-5}$  UFC mL<sup>-1</sup> de *A. niger* e 8 mL de água deionizada estéril. As placas foram incubadas a  $30 \pm 2$  °C por 7 dias (168 horas) com recolhimento de uma triplicata a cada 24 horas.

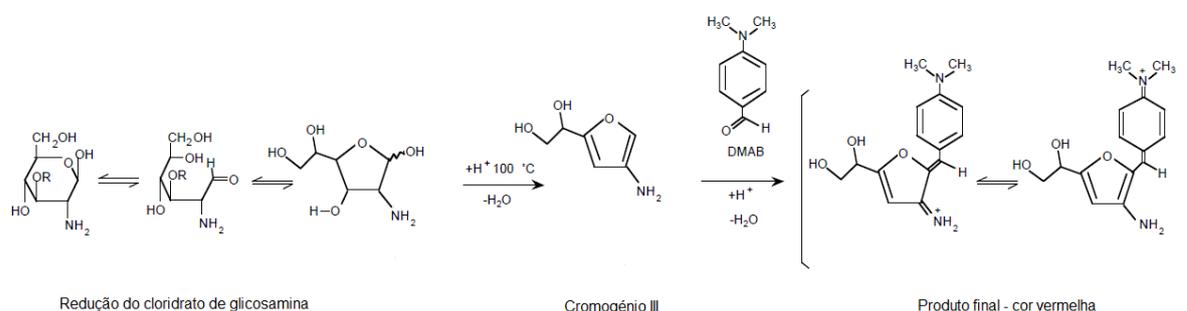
### **3.5 Monitoramento do bioprocesso**

Após o término do ciclo de incubação, as placas foram retiradas da geladeira e submetidas à liofilização sob  $1 \times 10^{-4}$  torr por 48 horas e conservadas em dessecador. Em seguida este material foi submetido às análises de pH e produção de biomassa (crescimento fúngico), ácido cítrico e de lipase.

### 3.5.1 Produção de biomassa

O crescimento do fungo foi determinado utilizando o método colorimétrico adaptado ao proposto por Chen & Johnson<sup>47</sup> e Cheng et. al.<sup>48</sup>, onde é considerada a medida da glicosamina, unidade básica da quitina, que é determinada por espectrometria após despolimerização da quitina. O Método Colorimétrico proposto por Chen & Johnson<sup>45</sup>, para determinação do crescimento fúngico foi determinado pelo teor de *N*-acetil glicosamina e, através desta análise, foi possível indicar a concentração de quitina, a qual é proporcional à biomassa fúngica.

O método adaptado neste trabalho é um dos mais utilizados ensaios colorimétricos para determinação de glicosamina. Baseia-se na medida da concentração após hidrólise ácida a 100°C da biomassa, onde o cloridrato de glicosamina sofre reduções sucessivas até a formação do cromogénio III, que em seguida reage com o dimetil-*p*-aminobenzaldeído (solução de Erlich) e origina coloração vermelha (Figura 5), o que pode ser detectado em 530 nm.<sup>49</sup>



**Figura 5. Reação da glicosamina pelo método colorimétrico.**  
FONTE: Asteriou et.al.<sup>49</sup>

Desta forma, uma amostra de 8 µg foi mantida sob refluxo em balão de 50 mL com HCl 6 mol L<sup>-1</sup> por 3 h à 100 °C. Em seguida, foi realizada a filtração em sílica gel e lã de vidro, sendo evaporado totalmente o HCl em banho-maria à 90 °C. Em seguida foram adicionados 1 mL de água deionizada e 0,5 mL de solução 4% de acetilacetona em carbonato de sódio a 0,75 mol L<sup>-1</sup>, sendo a mistura novamente aquecida por 1 h. A seguir, foram adicionado 2 mL de etanol 95% e 0,5 mL de Solução de Erlich, 1,6 g de *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldeído (Vetec) em 30:30 mL de mistura de etanol (Nuclear) e HCl.

Para determinar o comprimento de onda na região do UV/vis foi feita uma varredura empregando um espectrofotômetro UV/vis da Analítica, modelo 918.

As análises das amostras foram realizadas por padronização externa com soluções padrões de cloridrato de glicosamina (Vetec) de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.5.2 Produção de lipase

As amostras de biomassa foram homogeneizadas, e analisadas em triplicatas. Foram pesados 0,2 g de biomassa e adicionados 19 mL de emulsão 5% Tween 80 em tampão fosfato de potássio pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup>, iniciando-se assim a reação enzimática de hidrólise de ésteres de ácidos graxos. A reação foi mantida sob temperatura de aproximadamente de 37 °C por 30 min. em incubador orbital com 150-200 rpm.

Para dosar a quantidade de ácidos graxos produzidos ao término da reação foi titulado até o ponto final (pH = 9,5), utilizando uma solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> previamente preparada.

A unidade de atividade lipase (UI) para esta e demais análises especificadas nas seções seguintes, foi considerada como a quantidade em  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos liberados pela ação das enzimas contidas em 1g de biomassa durante o tempo de 1 minuto de incubação, conforme equação (1):

$$UI = \frac{(\Delta V_{\text{NaOH}}) \cdot (\text{Conc. NaOH}) \cdot 1 \times 10^3}{T \cdot M} \quad (1)$$

Onde:

UI= Unidade de atividade lípase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )

$\Delta V_{\text{NaOH}}$  = diferença entre o volume de NaOH (mL) gasto com a amostra e o volume gasto com o branco.

Conc. NaOH = concentração (mol L<sup>-1</sup>) do NaOH utilizado

T = tempo de incubação em minutos

M<sub>inóculo</sub> = massa de biomassa (g) utilizado

### **3.6 Avaliação de pH**

A amostra foi homogeneizada, macerada em gral e pistilo e 2g foram suspensas em 10 mL de água destilada sob agitação por 1 hora em incubadora a 160 rpm a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi filtrado através de membrana micropore de 45  $\mu\text{m}$ . O pH das amostras foi aferido por potenciometria (potenciômetro Quimis® Q400-MT) sendo calibrado com soluções de pH 6,01 e 9,01 marca Quimis®.

### **3.7 Produção de ácido cítrico**

O mesmo extrato obtido para avaliação de pH foi também submetido a quantificação de ácido cítrico conforme método adaptado ao proposto por Dhillon et. al.<sup>50</sup>, para as análises por HPLC.

#### **3.7.1 Análise por HPLC**

Os experimentos realizados foram conduzidos com diferentes concentrações do substrato e de ácido cítrico. As soluções foram preparadas em concentrações de 1 a 100  $\text{mg L}^{-1}$  e determinadas por HPLC. A análise foi conduzida em um equipamento Shimadzu com bomba em modo isocrático modelo LC-20AT e Detector de arranjo de diodos modelo SPD – M 20A, com uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) de 25 cm, temperatura de  $40^\circ\text{C}$ , vazão de 0,4 a 0,8  $\text{mL min}^{-1}$  de fase móvel tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de amostra injetada de 10  $\mu\text{L}$ .

#### **3.7.2 Análises por FT-IR**

Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  do extrato aquoso foi misturada com 100mg de KBr grau espectroscópico (Vetec) e analisada em triplicata pela técnica de espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS), usando acessório específico (Pike Technologies, Madison,

USA) em equipamento Perkim Elmer Spectrum 400, na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 pulsos de varredura, resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , sendo os espectros analisados em absorbância.

### 3.8 Tratamento quimiométrico

Os espectros foram salvos em extensão \*.spa, normalizados (0-1) e salvos em extensão \*.csv em software OMNIC 4.1.1.0. Os referidos arquivos foram organizados em planilha excel em ordem crescente de tempo de incubação para as diferentes condições de fermentação, totalizando uma coluna de comprimento de onda ( $\nu$  em  $\text{cm}^{-1}$ ), 384 colunas de amostras (intensidade de absorbâncias normalizadas) e uma coluna áreas referente ao ácido cítrico (HPLC). Para cada triplicata foi inserida uma quarta coluna referente a média dos espectros.

O tratamento de dados foi realizado através do método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) contido no pacote quimiométrico Pirouette 4.0 da Infometrix®, excluindo-se a faixa de 2400-2301  $\text{cm}^{-1}$  (absorção de  $\text{CO}_2$ ), com pré-processamento centrado na média e correção SNV, considerando os seguintes critérios, as diferentes condições de matriz biológicas:

- a) torta de tungue com gordura;
- b) torta de tungue sem gordura;
- c) torta de tungue com e sem gordura;
- d) torta de mamona com gordura;
- e) torta de mamona sem gordura;
- f) torta de mamona com e sem gordura;
- g) torta de tungue e de mamona com e sem gordura;

Os modelos PLS-DRIFTS assim obtidos foram otimizados por exclusão de amostras anômalas (*outliers*), quando necessário, mantendo-se a faixa espectral original e validados por validação cruzada com mútua exclusão de um por vez, usando como figuras de mérito o coeficiente de correlação  $R^2$  (rVal) mais próximo de 1 e raiz quadrada de erro médio de validação cruzada (RMSECV) mais próximo de zero.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos subprodutos oleoquímicos

As tortas de tungue e mamona foram os substratos utilizados na FFS. Estas devem ter algumas características que possibilitem o maior rendimento em bioproduto bem como em produção de biomassa durante o processo. Porosidade, tamanho e forma das partículas, teor de água (umidade) do meio de fermentação devem ser adequados ao desenvolvimento do micro-organismo. A Figura 6 demonstra a aparência das tortas utilizadas na FFS.



**Figura 6. Aspectos das tortas: A) tungue e B) mamona.**

A extração do óleo de tungue por prensagem foi realizada em uma planta da Scottech de  $60 \text{ kg h}^{-1}$ , obtendo-se, em média  $55,1 \pm 1,8 \%$  de torta, o que justifica a sua investigação do seu aproveitamento como matéria-prima para FFS.

As análises foram feitas com o objetivo de padronizar as condições de incubação, tais como, quantidade ideal de substrato (torta) e umidade do meio em que ele seria submetido. Também foram realizados testes físico-químicos com a torta. Nesta etapa preliminar as incubações realizadas foram no meio sem adição de glicerol.

Primeiramente, foi realizado o processo de extração do óleo das sementes de tungue, recentemente coletadas. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4. Caracterização físico-química de subprodutos oleoquímicos.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Torta de tungue (%)</b>	<b>Torta de mamona (%)</b>
Fibras	23,0±1,5	37,9±1,6
Cinzas	4,3±0,8	5,0±1,2
Óleo	24,8±1,3	29,3±1,8
Água	9,1± 1,0	27,4±1,3
Proteínas	23,9±1,4	15,8±0,9

Os valores encontrados nos permitem identificar que a torta tem potencial para ser utilizada para vários fins. Apesar de conter aproximadamente 23% de proteínas, a torta de tungue não é indicada para alimentação animal devido a sua toxicidade. No entanto, este resultado faz com que ela seja interessante para a utilização no cultivo de micro-organismos com potencial para produção de biomoléculas de interesse comercial como ácido cítrico e lipases.

Certos íons metálicos, como  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , podem causar ação inibidora na produção de ácido cítrico em fase submersa, mesmo em concentrações inferiores a  $1\text{ mgL}^{-1}$ . Por outro lado em fermentação em fase sólida os íons metálicos causam menor ação inibitória, podendo até causar efeito estimulador a produção de ácido cítrico. A Tabela 5 apresenta as médias das concentrações e seus desvios padrões de metais na torta, após análise em triplicata.

**Tabela 5. Resultados do teor de metais nas tortas de tungue e de mamona**

<b>Substrato</b>	<b>Cobre</b>	<b>Manganês</b>	<b>Ferro</b>	<b>Cromo</b>
TSG	0,011 ± 0,001	0,039 ± 0,008	0,619 ± 0,015	< 0,001
TCG	0,011 ± 0,001	0,027 ± 0,006	0,652 ± 0,024	< 0,001
MSG	0,018 ± 0,001	0,085 ± 0,001	0,741 ± 0,014	< 0,001
MCG	0,012 ± 0,001	0,036 ± 0,001	0,680 ± 0,032	< 0,001

\*TSG: tungue sem gordura; TCG: tungue com gordura; MSG: mamona sem gordura; MCG: mamona com gordura

Como pode ser observado todos os metais determinados possuem concentração menor que  $1 \text{ mgL}^{-1}$ , o que, segundo Lu, Maddox & Brooks<sup>51</sup> pode evidenciar uma possível ação estimuladora à produção a ácido cítrico.

## **4.2 Resultados da FFS em torta de tungue**

### **4.2.1 Avaliação do potencial de assimilação de tungue por *A. niger***

Com o propósito de padronizar o crescimento do fungo em torta de tungue, foram realizados testes preliminares baseados em crescimento micelial radial e crescimento por homogeneização prévia para avaliar a sua adaptação sobre o substrato.

Já com 24 horas de incubação na torta de tungue observou-se a formação de micélio vegetativo, que se espalhou rapidamente sobre o substrato cobrindo completamente em quatro dias, semelhante ao cultivo em ágar Sabouraud. O micélio reprodutor já foi observado com cerca de 48 horas de incubação e cobriu o substrato completamente em cerca de cinco dias, sendo que parte deste aspecto fisiológico pode ser visualizado na Figura 7. Neste caso, a velocidade de crescimento micelial radial em torta de tungue foi semelhante ao observado em ágar Sabouraud.

O crescimento por homogeneização prévia com substrato foi mais rápido cobrindo as partículas do substrato em três dias inclusive com micélio reprodutor.

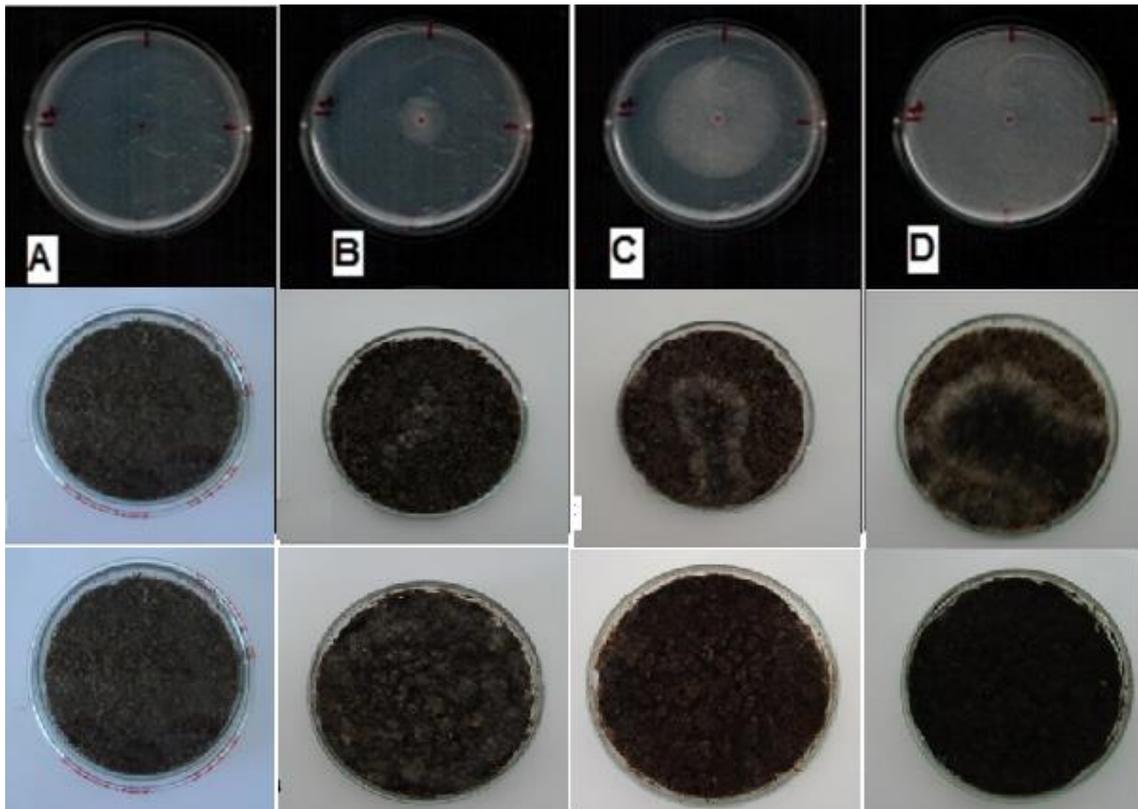


Figura 7. Registro fotográfico das placas referente ao cultivo de *A. niger* USP 898 por CMR em gar Sabouraud (superior), em torta de tungue (médio) e por homogeneizao com substrato (inferior). A: tempo zero, B: 24 horas, C: 48 horas e D: 72 horas.

*A. niger* possui uma capacidade adaptativa muito grande a diferentes substratos orgânicos, o que lhe confere um crescimento micelial intenso em um curto período de tempo. Este comportamento também foi observado com a torta de tungue. Entretanto, a assimilao do substrato  dependente do tempo de preparao da torta, uma vez que seu armazenamento por períodos prolongados (cerca de 1 ms), tornou o crescimento do fungo inviável.

A partir destes testes ficou evidente o potencial de crescimento do *A. niger* na torta de tungue, sendo que a próxima etapa foi adicionar o glicerol em diferentes proporoes  para aumentar a oferta de fontes de carbono e propiciar a produo de ácido cítrico.

#### 4.2.2 Bioprocesso de FFS

A adio de glicerol em diferentes concentraoes  torta de tungue influenciou o crescimento do fungo apenas para a concentrao de 40% de

glicerol, observando-se um retardo na produção de biomassa fúngica, independente da extração prévia da gordura residual.

Em TCG40% e TSG40% observa-se o início de formação de hifas somente após 72 horas do período de incubação. Nesta condição há uma maior concentração de glicerol, fazendo com que o fungo tenha um período maior para se adaptar ao meio e começar o processo de assimilação de nutrientes para seu crescimento. O máximo de esporulação em TCG40% e TSG40% foram alcançados em 144 e 168 h de incubação respectivamente.

Na incubação do *A. niger* em torta de tungue em fase sólida, observou-se que o fungo teve uma maior adaptação para o desenvolvimento de seu crescimento nas concentrações TCG 0%, 10 % e 20 % de, isto deve-se ao fato que nestas condições (torta com gordura) o fungo fez a melhor assimilação de suas necessidades de crescimento e desenvolvimento.

Andrea et. al.<sup>53</sup> relatam que a absorção do glicerol como fonte de carbono durante crescimento do *A. niger* USP 898 depende das condições dos substratos onde este fungo é incubado. Em várias situações a assimilação de menores concentrações de glicerol pode ser muito mais elevada, promovendo um maior crescimento do fungo, em comparação com maiores concentrações de glicerol no meio, ocasionando uma menor assimilação pelo fungo que o esperado.<sup>52</sup>

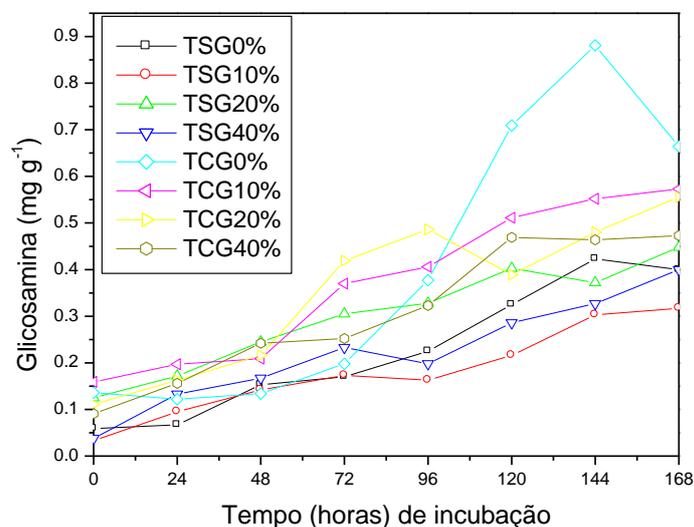
O efeito da adição de glicerol está relacionado com a tentativa de aumentar a atividade de água do substrato e melhorar o desenvolvimento metabólico promovendo um melhor crescimento do fungo.<sup>53</sup>

### **4.3 Monitoramento do bioprocesso**

#### **4.3.1 Produção de biomassa**

A Figura 8 mostra a evolução do desenvolvimento de crescimento do fungo avaliado pelo método colorimétrico em diferentes concentrações de glicerol em torta de tungue com e sem gordura, considerando os resultados

expressos em cloridrato de glicosamina ( $\text{mg g}^{-1}$ ) obtidos pela curva padrão ( $r^2 = 0,996$ ).



**Figura 8. Avaliação de cloridrato de glicosamina pelo método colorimétrico em FFS em torta de tungue**

O método colorimétrico otimizado para a determinação do crescimento de *Aspergillus niger* USP 898 permitiu, a partir da leitura da absorbância das amostras em 530 nm, construir a curva de crescimento do fungo em FFS.

Verifica-se que o teor de glicosamina aumentou durante o período de incubação, o que, segundo Nopharatana et. al.<sup>54</sup>, é devido a resistência da quitina aos danos após a morte do fungo, sendo que a quitina pode permanecer nas hifas vazias.

Durante a quantificação da biomassa ocorre a hidrólise enzimática da quitina, originando a enzima quitinolítica quitinase, o que torna a quitina resistente à desacetilação, resultando no acréscimo dos valores de atividade quitinase aos de glicosamina total.<sup>45</sup>

Também pode ser observado que as maiores concentrações de glicosamina foram observadas na TCG nas concentrações de 0%, 10% e 20% de glicerol, comprovando o que foi observado e discutido no item anterior, onde nestas concentrações observaram-se os melhores crescimentos.

Podem ser observadas as três principais etapas clássicas de crescimento microbiano, primeiramente, a fase latente até 24 horas de incubação, segundo fase de crescimento exponencial até 96 horas de

incubação, e por último a fase estacionária. Nas demais condições observa-se um crescimento menos intenso porém em fase exponencial não chegando a atingir a fase platô ao final de sete dias.

O fato do fungo ter obtido melhor desenvolvimento no crescimento em TCG proporcionou-lhe uma maior capacidade em hidrolisar a quitosana e a quitina, expressando maior concentração de cloridrato de glicosamina. Assim, pequenas quantidades de glicosamina podem estar presentes em forma de quitina e quitosana nas amostras ou podem ter surgido devido à parcial desacetilação durante o tratamento ácido utilizado no método analítico. Por fim, apesar deste método precisar de cuidados especiais, tem como vantagem pouca quantidade de biomassa (7- 9 µg) para determinar o cloridrato de glicosamina das paredes das células fúngicas.<sup>55</sup>

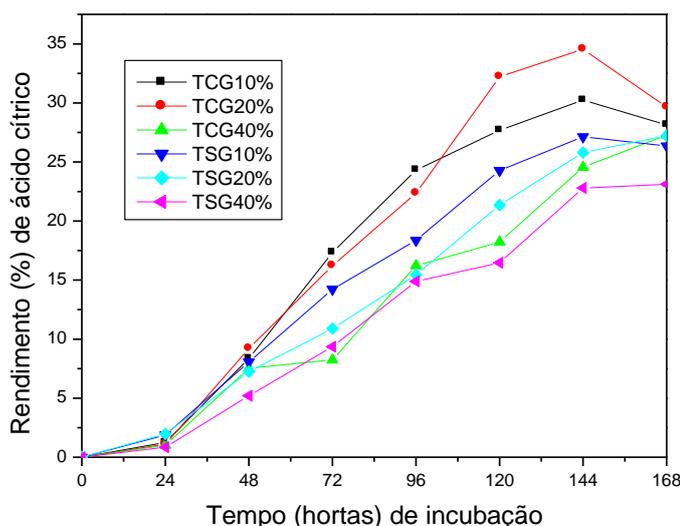
Por outro lado, apesar do método colorimétrico ter sido importante para monitorar o crescimento fungico no meio estudado, ele é suscetível a variações devido a possibilidade de hidrólise incompleta da quitina, além de não ter alta sensibilidade e reprodutibilidade. Neste caso, a cromatografia líquida apresenta-se como um método alternativo com maior reprodutibilidade porém mais caro e demorado.<sup>56</sup>

#### **4.3.2 Produção de ácido cítrico**

A otimização do método foi realizada para que os resultados obtidos fossem satisfatórios, para isso os valores das áreas da HPLC foram transformadas em concentração de ácido cítrico (m/m) através da curva analítica obtida com  $R^2 = 0,996$ . Esta curva foi utilizada para caracterização da FFS de torta de tungue e mamona.

Observando a Figura 9 que expressa o rendimento em % (m/m), e analisando os resultados obtidos pode-se concluir que os rendimentos de ácido cítrico obtidos no processo fermentativo da torta de tungue foram satisfatórios.

Observa-se na Figura 9 que os maiores rendimentos 34% e 25% foram encontrados nas amostras TCG20% e TSG10% respectivamente.



**Figura 9. Rendimento de ácido cítrico da FFS da torta de tungue quantificado em HPLC**

Um fato de relevância que pode ser observado nas quantificações dos rendimentos de ácido cítrico por HPLC, foi que os maiores rendimentos foram encontrados em TCG e os menores rendimentos em amostras de TCG40% e TSG40% de glicerol. Segundo Chatzifragkou et. al.<sup>54</sup>, embora verifiquem-se condições favoráveis de crescimento (biomassa e nutrientes) a quantidade em excesso de fonte de carbono, tanto do óleo residual e principalmente a alta concentração de glicerol no meio fermentativo pode ter ocasionado a alteração no metabolismo do fungo, devido ao efeito osmótico do glicerol proporcionando menores rendimentos de ácido cítrico nestas amostras.<sup>57</sup>

Os maiores percentuais de rendimentos encontram-se em 144 h de incubação ou eventualmente em 168 h (TCG40% e TSG20%). Comparado com outros substratos orgânicos, como na fermentação de *A. niger* em bagaço de mandioca e também em casca de abacaxi cujos maiores rendimentos foram observados em 120 h de processo fermentativo, a torta de tungue causa um retardo no processo.<sup>58,59</sup>

Em comparação aos estudos propostos por Oliveira et. al.<sup>60</sup> e Vandenberghe et. al.<sup>61</sup> que utilizaram como substrato polpa cítricas e bagaço de mandioca, e obtiveram rendimentos de aproximadamente 38% e 35% respectivamente, os rendimentos alcançados neste trabalho estão de acordo com a literatura.

Contudo, em ambos os processos fermentativos das tortas, após 144 h de incubação houve uma queda na produção de ácido cítrico, segundo Angumeenal & Venkappayya<sup>62</sup>, isto pode ser devido a alguns fatores, tais como: declínio da viabilidade celular, o micro-organismo tende a realizar o fracionamento do material extracelular, realização de autólise e também o consumo do ácido cítrico produzido.

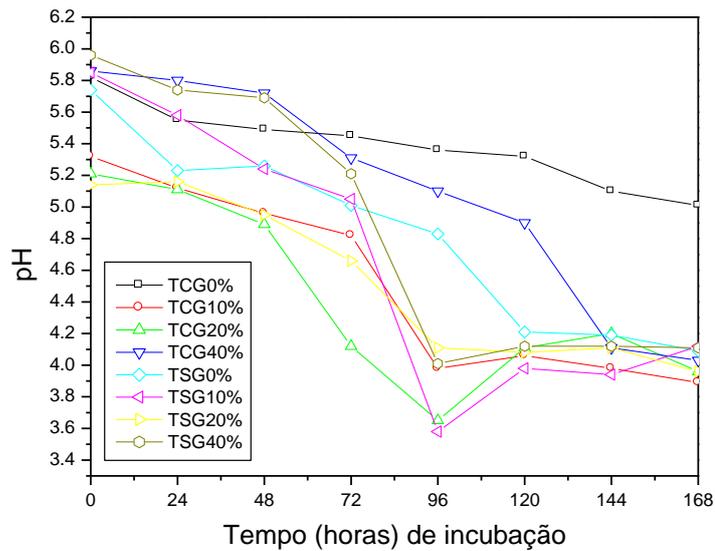
### **4.3.3 Avaliação do pH**

A Figura 10 demonstra a variação do pH durante o processo fermentativo em TCG e TSG.

Para TCG pode-se observar que no tempo zero o valor de pH das diferentes amostras variam de 5,1 a 5,9. Com o passar do período de incubação notou-se um decréscimo nos valores de pH. A amostra TCG20% no início da incubação (tempo zero) possui pH de 5,2, este valor decresce até 3,6 após transcorridos 96 horas de incubação e volta a aumentar, alcançando pH de 3,9 no final do ciclo fermentativo.

Analisando o comportamento das amostras TCG10% e TCG40% também se observou uma diminuição nos valores de pH, os menores valores foram encontrados para ambas as amostras no último dia de incubação, sendo 3,9 e 4,0 respectivamente.

Já a amostra TCG0% apresentou uma diminuição menos intensa no pH, em relação as demais amostras, iniciando em 5,9 e terminando com 5,2.



**Figura 10. Avaliação de pH durante a FFS de TCG e TSG**

Os comportamentos das variações de pH observados na Figura 10 referente as amostras de TSG, o pH no tempo zero varia de 5,1 a 6,0 para as diferentes concentrações de glicerol. As quatro diferentes amostras possuem comportamentos semelhantes, decrescem do tempo zero até 96 horas de incubação, onde houve oscilação até o último dia.

A amostra TSG10% apresenta valor de pH de 3,6 em 96 horas de incubação, após houve oscilação terminando o processo fermentativo no último dia no mesmo patamar das demais amostras.

A presença de gordura residual nas amostras que não receberam a adição de glicerol influenciou a evolução do pH com a fermentação, enquanto que a amostras TCG0% apresentou uma queda de 0,7 unidades a amostra TSG0% apresentou uma queda mais intensa.

Observando a Figura 10, nota-se que após 120 h de incubação houveram oscilações nos valores de pH em relação ao início do ciclo fermentativo.

Segundo Kareem et. al.<sup>56</sup> a produção de ácido cítrico ocorre preferencialmente após 24 h de incubação. Entende-se que a queda de pH observada durante o processo foi devido ao acúmulo de ácido cítrico. Observa-se que a variação de pH coincide com o mesmo período (96 h) de incubação onde é evidenciado o maior rendimento de ácido cítrico.

Pastore et. al.<sup>63</sup> relataram que a fermentação em meio sintético realizada por um período de 7 dias, apresentou uma produção máxima de 92 g L<sup>-1</sup> a partir de uma cepa de fungo *A. niger* mutante, após 48 h de incubação.

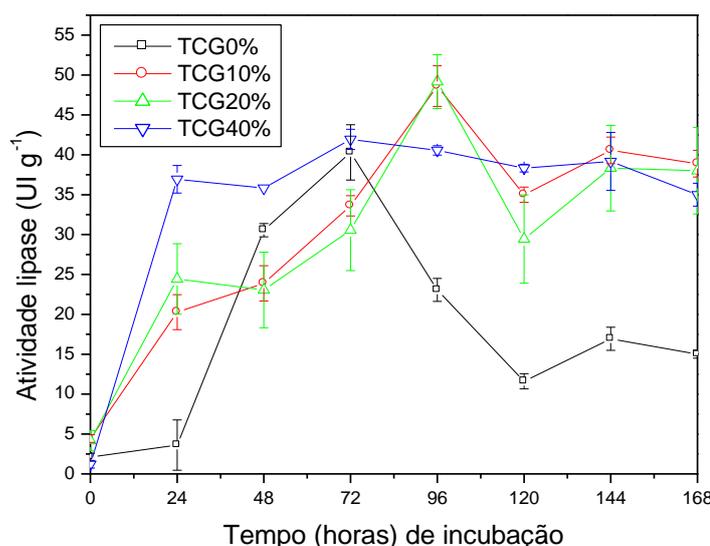
Contudo, o pH do meio fermentativo é importante em duas fases do processo, na germinação e na formação de esporos. Para produção de ácido cítrico o pH deve ser baixo (2,0 – 3,5), isto evita a formação de ácido oxálico e glucônico e ainda evita a contaminação com outros micro-organismos.<sup>36</sup>

#### 4.3.4 Análise da atividade lipase

Para a fermentação do *A. niger* em fase sólida, usando torta de tungue nas diferentes concentrações de glicerol foi realizada a análise de atividade lipase, as curvas de atividade após a determinação, durante 7 dias, estão sendo representadas nas Figuras 11 e 12.

Analisando a Figura 11 pode ser observado que ocorre um aumento da atividade lipase em todas as amostras até 72 e 96 h do processo de incubação. As amostras TCG10% e TCG20% possuem comportamentos de atividades semelhantes, alcançando nas 96 horas de incubação aproximadamente 50 UI g<sup>-1</sup> de atividade. Já as amostras TCG0% e TCG40% possuem atividade lipase máxima em 72 horas com 41 UI g<sup>-1</sup> e 42 UI g<sup>-1</sup> respectivamente.

A alta atividade lipase encontrada para amostras de TCG pode ser explicada pelo alto percentual de óleo remanescente na torta 24,8%, o qual pode servir de indução para a expressão desta enzima semelhante ao comportamento observado com outros substratos sólidos para obtenção de lipases por cepas de *A. niger*.<sup>64,65, 66</sup>



**Figura 11. Curva de atividade lipase em TCG**

Neste sentido Mahadik et al., obtiveram as maiores produções de lipase (630 UI/g) utilizando fungo em FFS, verificando que a biossíntese da enzima ocorreu preferencialmente na presença de um substrato lipídico<sup>67</sup>

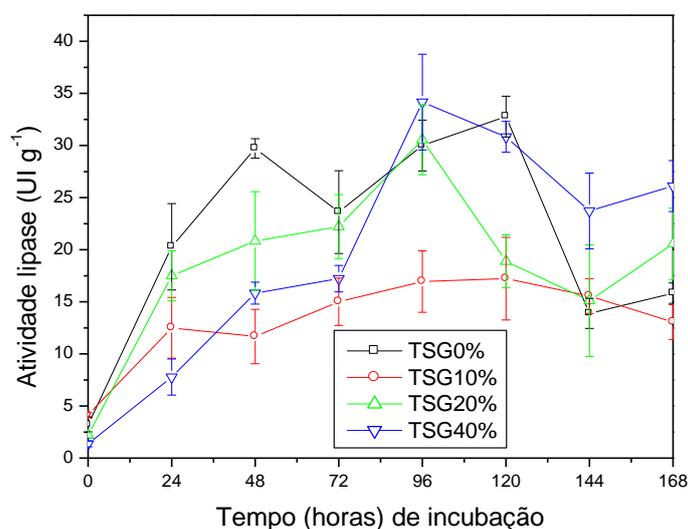
Conforme pode ser observado na Figura 12, durante o período de incubação há uma variação muito grande na atividade lipase. As amostras com maiores picos de produção de lipase são TSG20% e TSG40% em 96 horas e TSG0% em 120 h de incubação, os valores de atividade lipase para estas amostras são de 30 UI g<sup>-1</sup>, 35 UI g<sup>-1</sup> e 33 UI g<sup>-1</sup> respectivamente.

Dantas e Aquino<sup>77</sup>, utilizaram como substrato torta de babaçu e mamona e obtiveram 24,6 UI g<sup>-1</sup> e 19 UI g<sup>-1</sup> de atividade lipase respectivamente, estes valores são inferiores aos encontrados neste trabalho.

Segundo Gombert et al.<sup>68</sup>, a utilização de resíduos sólidos vegetais como tortas de sementes de oleaginosas oriunda dos processos de prensagem de óleo, associada ao óleo de oliva, leva à produção de maior atividade lipase do que com a mesma torta e peptona, salientando a possibilidade de uso da torta associada a um óleo para produção de lipases.

Através da determinação da atividade lipase foi constatado que o fungo se adaptou bem às matrizes e ao glicerol em que foi incubado. As curvas demonstradas nas Figuras 11 e 12 mostram uma atividade inicial lenta até 48 h

após o início da incubação e com máxima intensidade de produção de lipase em 96 e 120 h de incubação, para as amostras de TCG e TSG.



**Figura 12. Curva de atividade lipase em TSG**

Pode-se observar que as amostras com gordura residual (TCG) apresentaram os melhores valores de atividade lipase, devido à enzima realizar a reação de hidrólise. Logo é importante que no meio haja um conteúdo de óleo ou gordura para que o efeito na produção de lipase seja mais pronunciado, resíduos agroindustriais como a torta de oleaginosas, também podem servir de suporte para produção de lipase.<sup>69</sup>

A partir do segundo dia é possível notar, claramente, um consumo do glicerol e da gordura residual pelo fungo. O final deste primeiro ciclo de consumo de gordura, pelos fungos, coincide com o início da primeira produção significativa de lipase, que ocorre após ter transcorrido 96 h do processo de incubação.

Contudo, as fontes de carbono (glicerol) e substratos orgânicos (tortas) têm-se mostrado importantes para a produção de lipases com altos rendimentos, sendo que os melhores resultados são produzidos na presença de uma substância indutora, que neste caso foi o óleo.<sup>70</sup>

## 4.4 Resultados em FFS em torta de mamona

### 4.4.1 Bioprocesso de FFS

Na FFS da torta de mamona, assim como na FFS da torta de tungue a adição de glicerol em diferentes concentrações influenciou no retardo do crescimento do fungo apenas para a concentração de 40% de glicerol independente da extração prévia da gordura residual.

As evidências de crescimento com formação de micélio vegetativo pôde ser observado logo após 24 h do início do processo fermentativo em TCG e TSC 0%, 10% e 20% de glicerol, nestas mesmas condições, a partir de 72 h, iniciou a esporulação de forma intensificada.

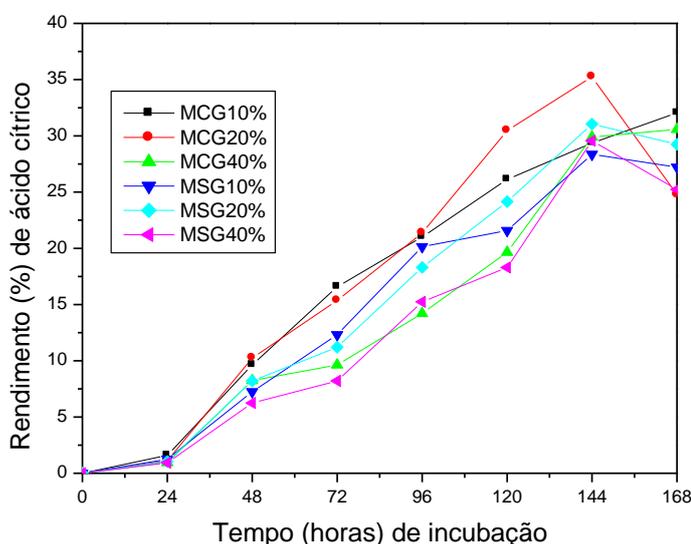
Em MCG40% e MSG40% observa-se o início de formação de micélio vegetativo somente a partir de 72 e 96 h de incubação respectivamente. Nesta condição há uma maior concentração de glicerol, fazendo com que o fungo tenha um período maior para se adaptar ao meio e começar o processo de assimilação de nutrientes para seu crescimento. Nesta matriz foi observado o máximo de esporulação em MCG40% e MSG40% no penúltimo dia do processo fermentativo, diferentemente do que foi observado na torta de tungue.

Na incubação do *A. niger* em torta de tungue em fase sólida, observou-se que o fungo obteve uma maior adaptação para o desenvolvimento de seu crescimento nas concentrações TCG 0, 10 e 20 % de, isto se deve ao fato que nestas condições (torta com gordura) o fungo fez a melhor assimilação de suas necessidades metabólicas.

Um evento particular durante a FFS da torta de mamona foi o aparecimento de uma substância particulada de coloração amarelada a partir do 2º dia (48 h) de incubação na amostra MCG, possivelmente oriunda do metabolismo do fungo.

#### 4.4.2 Produção de ácido cítrico

Durante a evolução do processo fermentativo demonstrado na Figura 13 é possível observar que há um aumento nos rendimentos de ácido cítrico até 144 h de incubação, sendo que neste período a amostra MCG20% chega a um pico de aproximadamente 35% de rendimento, enquanto as demais amostras variam de 26% a 30% de rendimento. No último dia de incubação pode ser observado um decaimento no rendimento de ácido cítrico com exceção da amostra MCG10% que atingiu 32% de rendimento após o fim do ciclo fermentativo.



**Figura 13. Rendimento de ácido cítrico da FFS da torta de mamona quantificado em HPLC**

Assim na concentração de MCG20% assim como na maioria o fungo obteve o melhor percentual de rendimento (35%) em 144 h de incubação, pois nesta concentração de fonte de carbono e em substrato com gordura em que o fungo foi submetido conseguiu realizar a assimilação, ocasionando maior conversão a ácido cítrico.

Com comportamento de rendimento progressivo e máximo em 144 h de incubação (com exceção da amostra MCG10%) e após observa-se declínio até o último dia de incubação, este último evento está associado ao declínio da viabilidade celular, quando o micro-organismo tende a realizar o fracionamento

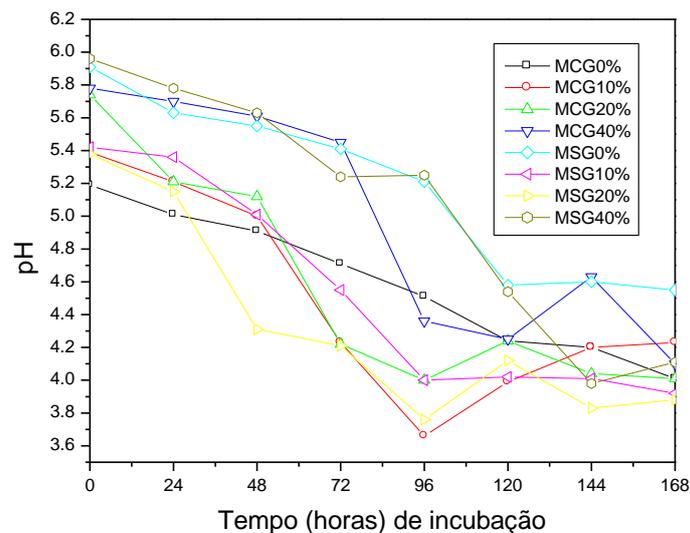
do material extracelular, realização de autólise e também o consumo do ácido cítrico produzido. <sup>61</sup>

Ao contrário do que ocorreu com os rendimentos das demais amostras, a amostra MCG10% apresentou rendimento linear durante todo o processo fermentativo, sendo que neste caso o fungo, além de assimilar os nutrientes do substrato, assimilou precursores de seu metabolismo primário de forma mais efetiva, tais como aminoácidos, piruvato, acetatos, para produção de ácido cítrico. <sup>71</sup>

Embora a amostra MSG40% possua elevada concentração de glicerol no meio fermentativo, este nutriente nesta condição pode ter inibido parcialmente o metabolismo associado ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos por diminuição da atividade de água, proporcionando menores rendimentos de ácido cítrico. <sup>54</sup>

#### **4.4.3 Avaliação do pH**

Observando as variações do pH demonstradas na Figura 13, as amostras de MCG no tempo zero possuem valores de pH que variam de 5,2 a 5,9. Durante o período de incubação observou-se um decréscimo acentuado nos valores de pH. Após 96 h de incubação a amostra MCG10% apresentou pH 3,6, sendo este o menor valor encontrado dentre todas as amostras da FFS da torta de mamona.



**Figura 14. Avaliação de pH durante a FFS de MCG e MSG**

Para a fermentação de torta de mamona, a amostra MSG20% apresentou o menor registro de pH (3,7) em 96 h de incubação.

Assim como discutido anteriormente na FFS de torta de tungue, as considerações feitas por Kareem et. al.<sup>56</sup> referente ao início da produção de ácido cítrico após 24 horas de incubação e por Pastore et. al.<sup>72</sup> que indicam o melhor valor de pH para produção de ácido cítrico, também podem ser consideradas na FFS da torta de mamona.

Considerando-se os valores de pH durante a FFS de torta de mamona observa-se que o pH do meio de fermentação apresentou diminuição significativa nos valores, porem não se reverteu em rendimento em ácido cítrico em relação os resultados observados na torta de tungue. Isto pode ser explicado considerando que a torta de mamona apresentou maior teor de metais, particularmente ferro (vide Tabela 5), o que pode ter induzido alterações na biossíntese de outros ácido como ácido oxálico e glicônico em detrimento ao ácido cítrico sendo este um parâmetro importante.<sup>76</sup>

#### 4.4.4 Análise da atividade lipase

Analisando o gráfico da Figura 15, verifica-se que as amostras MCG10% e MCG20% possuem comportamentos semelhantes por praticamente todo o período de incubação, onde chegam ao máximo de atividade em 96 h com valores de  $54 \text{ UI g}^{-1}$  e  $50 \text{ UI g}^{-1}$  respectivamente, onde ocorrem oscilações terminado o ciclo de incubação em  $40 \text{ UI g}^{-1}$  e  $44 \text{ UI g}^{-1}$ .

No tempo de 72 h houve aumento linear na atividade lipase da amostra MCG0% e pode ser observado o maior valor  $47 \text{ UI g}^{-1}$ , após nota-se queda acentuada na atividade até o penúltimo dia de incubação, em seguida volta a aumentar até  $30 \text{ UI g}^{-1}$  até o último dia de incubação.

A amostra MCG40% possui o menor pico de atividade lipase dentre as amostras da FFS da torta de tungue. O máximo de atividade é encontrado após 96 horas de incubação ( $44 \text{ UI g}^{-1}$ ), observando-se oscilações até o final do ciclo fermentativo onde o valor de atividade foi de  $39 \text{ UI g}^{-1}$ .

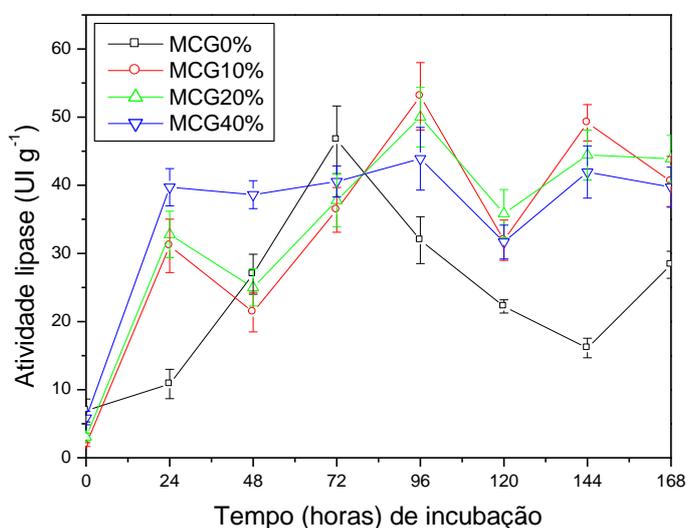


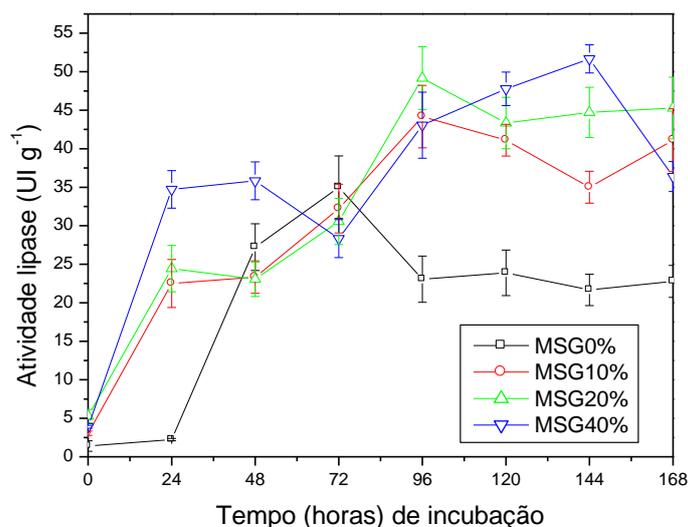
Figura 15. Curva de atividade lipase em MCG

De acordo com a Figura 16 observa-se que a maioria das amostras apresentou elevação da atividade lipase em 72 h de incubação, ocorrendo a partir desse momento oscilações nas atividades até o último dia do processo fermentativo. A amostra MCG40% apresentou maior valor ( $52 \text{ UI g}^{-1}$ ) da

atividade lipase em 144 h de incubação e no último dia de incubação este valor reduziu à 35 UI g<sup>-1</sup>.

As amostras MSG10% e MSG20% possuem comportamentos semelhantes no perfil de atividade lipase até 96 h de incubação onde chegam ao pico máximo com valores de 45 e 50 UI g<sup>-1</sup> respectivamente. Após a atividade da amostra MSG10% decresce até 35 UI g<sup>-1</sup> no tempo de 144 h e volta a crescer terminando o ciclo fermentativo em 41 UI g<sup>-1</sup>. Já os valores da atividade lipase da amostra MSG20% decrescem a 44 UI g<sup>-1</sup> no tempo de 120 h fechando o ciclo fermentativo em 45 UI g<sup>-1</sup>.

Com valores menores que as demais, a amostra MSG0% alcançou o pico de máxima atividade lipase em 35 UI g<sup>-1</sup> com 72 h de incubação, reduzindo para 24 UI g<sup>-1</sup> em 96 h, onde este valor permanecendo estável até o final da incubação.



**Figura 16. Curva de atividade lipase em MSG**

Através dos gráficos obtidos pode-se observar que o melhor desempenho da atividade de lipase ocorreu nas tortas (tungue e mamona) com gordura residual. Segundo Castilho et. al.<sup>73</sup>, isto é devido à ação indutora da expressão enzimática pela presença de óleo residual. Um aumento da atividade lipase é obtido quando a concentração do substrato atinge o limite de solubilidade e ocorre a separação da fase lipídica da fase aquosa.<sup>74,75</sup>

Em suma, com a determinação da atividade lipase pode-se constatar que durante a fermentação, a cepa de *A. niger* USP 898 se adaptou bem as

tortas de tungue e mamona, isto porque tais substratos atuam como fonte de nutrientes e como suporte fisiológico.<sup>76</sup> As curvas demonstram uma atividade inicial lenta, principalmente até o 3º dia de incubação e um pico mais intenso de atividade no 6º dia de incubação.

Pode-se também observar que o valor de gordura residual decresceu gradativamente com a produção de lipase. A partir da análise dos gráficos é possível notar, que no tempo de 72 e 96 h de incubação há um consumo maior no glicerol e nas tortas onde há gordura residual pelo *A. niger* USP 898. Nos gráficos nota-se que o consumo de glicerol e gordura pelo *A. niger* USP 898 e o aumento da atividade de lipase ocorrem principalmente no penúltimo dia de incubação.

Comparando-se os resultados aqui apresentados com os de outros estudos que utilizaram torta de mamona como substrato para produção de lipase de *A. niger* USP 898 por FFS<sup>77, 78</sup> verifica-se que a correção da torta de mamona com glicerol melhora a produtividade em lipase por *A. niger*. Além disso o crescimento de *A. niger* durante o bioprocessamento pode auxiliar na detoxificação da ricinina.

#### **4.5 Aplicação de FT-IR associada a quimiometria para quantificação de ácido cítrico supervisionada por HPLC**

O objetivo desta etapa do trabalho foi propor um método inovador baseado em FT-IR para quantificação de ácido cítrico em virtude da simplicidade, rapidez, baixa geração de resíduos e baixo custo da análise espectrométrica. Esta proposta se justifica pelo método referência utilizado (HPLC) ser demorado, alto custo de análise e principalmente gera grande quantidade de resíduos de fase móvel.

Para tanto, as mesmas amostras dos extratos aquosos dosados em HPLC foram utilizadas para quantificações por FT-IR, tanto para a FFS em torta de tungue como para a torta de mamona.

Por se tratar de extratos aquosos de matrizes biológicas complexas, é necessário conhecer as principais bandas de absorção na região do infravermelho médio que podem caracterizar grupos funcionais de biomoléculas ou modificações químicas em matriz desta natureza. A tabela a seguir apresenta um resumo destas absorções.

**Tabela 6. Bandas do espectro de infravermelho médio atribuídas a grupos funcionais**

<b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
3000-2800	$\nu$ C-H da saturação CH e ácidos graxos
3300-2500	OH provenientes de ácidos carboxílicos
~1740	$\nu$ C=O de grupo éster, essencialmente a partir de lipídios de ácidos graxos
~1650	$\nu$ C=O de amidas (proteínas), quitina
~1600	$\nu_{as}$ (COO <sup>-</sup> ) carboximetil
~1540	$\delta$ N-H de amidas (proteínas), quitina
~1455	$\delta_{as}$ CH <sub>3</sub> e $\delta_{as}$ CH <sub>2</sub> de proteínas
~1398	$\delta_s$ CH <sub>3</sub> e $\delta_s$ CH <sub>2</sub> de proteínas, e $\nu_s$ C-O do grupo COO <sup>-</sup>
~1250-1230	$\nu_{as}$ P=O de grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e fosfolipídios
~1200-900	$\nu$ C-O-C de polissacarídeos
~1160	$\nu$ (COC), $\nu$ (CC) $\beta$ Glc
~1150	$\nu$ (COC), $\nu$ (CC) $\alpha$ Glc
890	$\delta$ CH (C-1-H), $\beta$ Glc
850	$\delta$ CH (C-1-H), $\alpha$ Glc

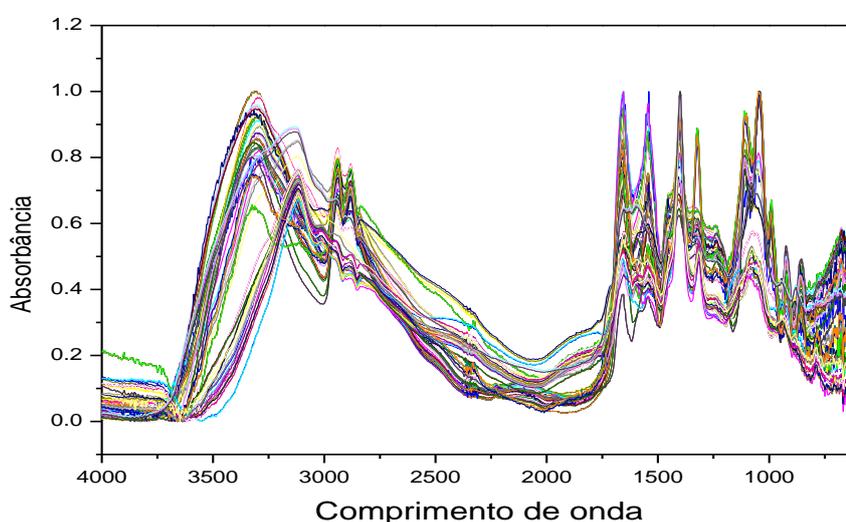
$\nu_{as}$  estiramento assimétrico;  $\nu_s$  estiramento simétrico;  $\delta_{as}$  deformação assimétrica;  $\delta_s$  deformação simétrica

Fonte: Giordano et al.<sup>79</sup> & Sandula et. al.<sup>64</sup>

A seguir serão apresentados as descrições do conjunto de espectros obtidos para os extratos aquosos da FFS de tungue e mamona corrigidos por glicerol em diferentes tempos de cultivo com *A. niger* USP 898.

Por fim serão apresentados os resultados referentes aos modelos quimiométricos de previsão da concentração de ácido cítrico com base no algoritmo PLS e as respectivas figuras de mérito associadas.

As Figuras 17, 18, 19 e 20 a seguir apresentam os conjuntos de espectros DRIFTS sobrepostos das diferentes matrizes (torta de tungue, torta de mamona) com as diferentes concentrações de glicerol para os sete dias de incubação.



**Figura 17. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de *A. niger* USP 898 da torta de tungue com gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .**

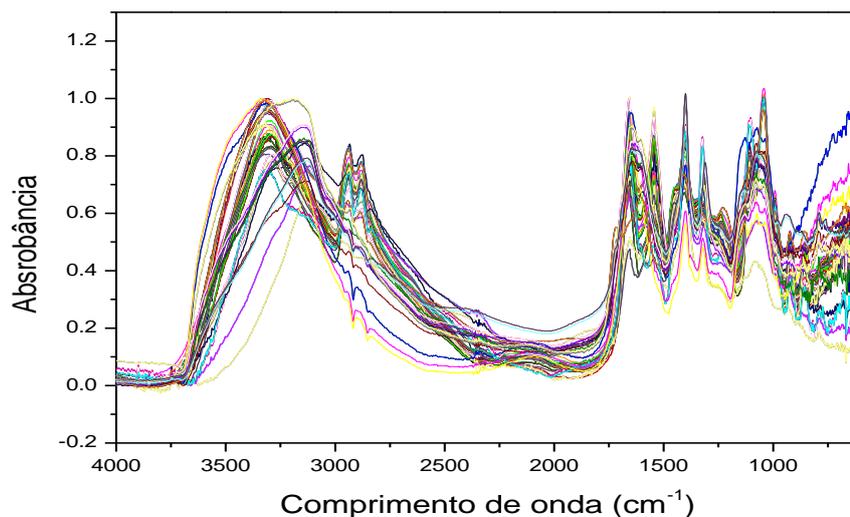


Figura 18. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de *A. niger* USP 898 da torta de tungue sem gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .

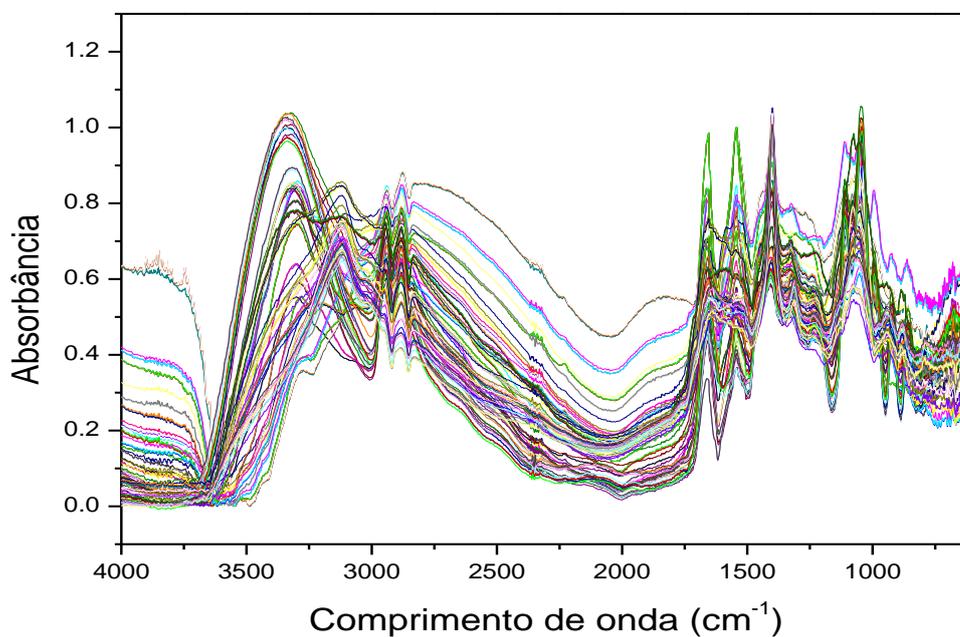


Figura 19. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de *A. niger* USP 898 da torta de mamona com gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol .

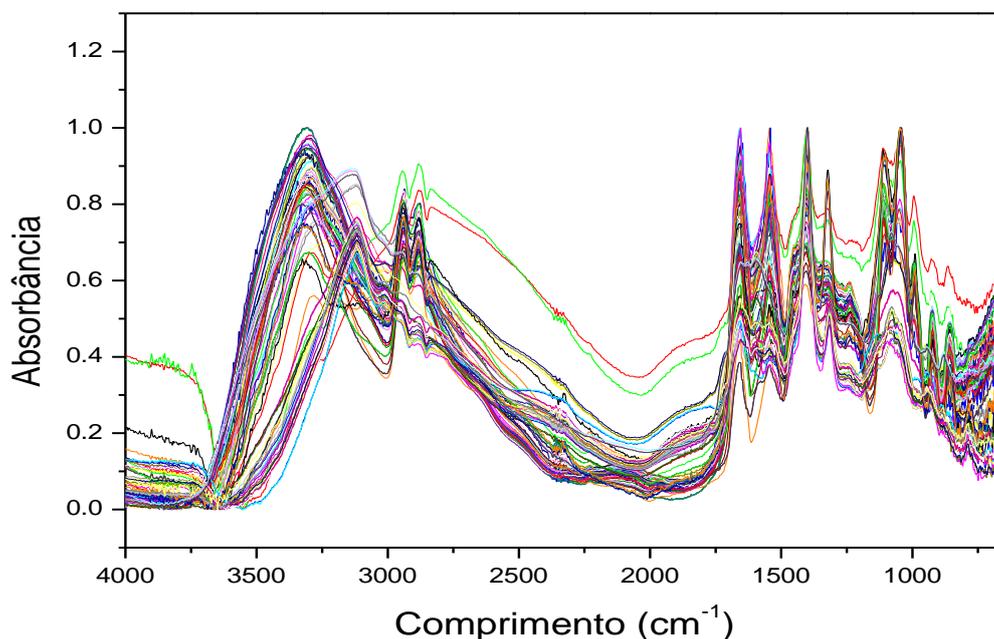


Figura 20. Conjunto de espectros de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de extratos aquosos de sete dias de FFS de *A. niger* USP 898 da torta de mamona sem gordura acrescida de 0, 10, 20, 40% de glicerol.

Os espectros de FT-IR, mostram bandas de absorção características da amida, nas regiões de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $\nu\text{C}=\text{O}$ , conhecida como banda de amida I (proteínas);  $1560\text{ cm}^{-1}$  deformação  $\delta\text{N-H}$  de amidas (proteínas),  $1310\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação CONH e ao grupo  $\text{CH}_2$ , que acontecem à mesma frequência.<sup>80</sup>

Essa última banda tem sido denominada banda de amida III, devido à deformação do grupo CO-NH. A banda aguda a  $1370\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação simétrica do  $\text{CH}_3$ . A banda em  $3270\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento N-H, e a observada a  $3460\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento O-H.

Outra região evidente é  $1450\text{ cm}^{-1}$ , onde  $\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$  e  $\delta_{\text{as}}\text{CH}_2$  de proteínas são observadas.

Na região de absorção de  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , caracterização das estruturas de ácidos graxos, com o passar dos dias de incubação nota-se a diminuição da intensidade desta banda, isto pode estar associado ao consumo deste pelo

fungo. Em 3300-2500  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se OH provenientes de ácidos carboxílicos, também nesta região pode ser caracterizada por apresentar bandas intensas de lipídeos.<sup>81</sup>

Podem ser observadas bandas entre 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros e 1650-1620  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas a presença de quitina, um polissacarídeo presente na parede celular do fungo. Estas absorções são decorrentes de esporos que passaram pela membrana de filtração. Estes dados se confirmam pelo fato dos espectros apresentarem picos de absorção em aproximadamente 850  $\text{cm}^{-1}$  característicos das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3-D-glicanas, também pertencente a parede celular dos esporos.<sup>82</sup> Cabe ressaltar que, devido à presença de quitina, a estrutura molecular do glucano é alterada na região de 1150-750  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>83</sup> A confirmação adicional da presença do complexo quitina-glicano resulta em absorções observadas em 1650-1620  $\text{cm}^{-1}$ .

Através dos espectros pode-se observar algumas similaridades nas faixas espectrais de absorção, porém intensidade vibracionais diferentes, com as amostras da FFS de TCG e TSG.

A banda com absorção em 1650  $\text{cm}^{-1}$  possui uma intensidade vibracional menos intensa que a observada tanto na FFS da MSG quanto na FFS TCG e TSG.

Outra faixa espectral com diferente intensidade de vibração é a que compreende entre 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ , que caracteriza polissacarídeos (quitina), para a FFS a MSG0% e MCG40% possuem maiores intensidades vibracionais.

A faixa espectral de 1300  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à deformação CONH e ao grupo  $\text{CH}_2$ , é muito mais acentuada na FFS da MSG, com destaque para a amostra MSG0% que na FFS MCG, onde este sinal é menos intenso.

#### **4.5.1 Análise quimiométrica**

Os modelos de correlação entre espectros de FT-IR e áreas de HPLC referente a concentração de ácido cítrico para os diferentes condições de FFS encontram-se na Tabela 7.

Analisando a tabela, pode observar que foi possível para algumas situações obter modelos de previsão da concentração de ácido cítrico pó FT-IR

com boa qualidade estatística. É o caso, por exemplo, das fermentações realizadas com as matrizes MCG e MSG, obtendo-se valores de  $R^2$  de 0,996 e 0,998 respectivamente.

Por outro lado, as matrizes relacionadas à torta de tungue apresentaram qualidade estatística inferior com  $R^2$  de 0,899 e 0,902 para as matrizes TCG e TSG respectivamente. Esta diminuição nos valores de  $R^2$  para estas matrizes implicou em aumento considerável do RMSECV em relação aos modelos obtidos para MCG e MSG.

As associações dos espectros das matrizes com e sem gordura tanto para o tungue quanto para a mamona promoveu uma redução nos valores de  $R^2$  (mais evidente para a mamona), com conseqüente elevação de RMSECV. Entretanto no modelo MCG+MSG ainda se mostrou com melhor qualidade estatística com  $R^2$  de 0,984 e com valor de RMSECV de 54452 u.a.

A tentativa de associar os espectros das quatro matrizes biológicas mostrou-se insatisfatório, pois apresentaram  $R^2$  de 0,786 e 88559 u.a. de RMSECV.

Outro aspecto relevante a ser considerado para as qualidades dos modelos apresentados refere-se à natureza de entrada dos dados, se com as triplicatas das medidas ou com as respectivas médias. Para algumas matrizes observa-se que os melhores valores de  $R^2$  são encontrados considerando as triplicatas, porem em outras matrizes os melhores valores de  $R^2$  foram encontrados considerando as médias dos espectros.

**Tabela 7. Figuras de mérito referentes aos diferentes modelos PLS-DRIFTS de previsão de concentração de ácido cítrico supervisionada por HPLC**

Matriz biológica	R <sup>2</sup>	RMSECV	VRA (%)	VL
TCG	0,570	120370	86,8	5
	0,600	115971	86,2	5
	0,899	63758	98,9	10
TSG	0,628	114843	94,7	7
	0,902	625485	97,4	9
	0,551	132439	78,0	4
TCG + TSG	0,726	99667	98,0	10
	0,845	84154	97,8	10
	0,899	63301	97,3	9
MCG	-	-	-	-
	0,996	13109	99,2	10
	0,903	63044	99,3	10
MSG	0,492	489820	97,1	10
	0,854	74184	90,0	5
	0,998	23597	93,7	7
MCG + MSG	0,330	381759	60,0	2
	0,873	9624	86,2	8
	0,984	54452	98,7	10
TCG + TSG +	0,318	288529	38,2	1
MCG + MSG	0,786	88559	98,1	10
	0,631	175843	52,3	1

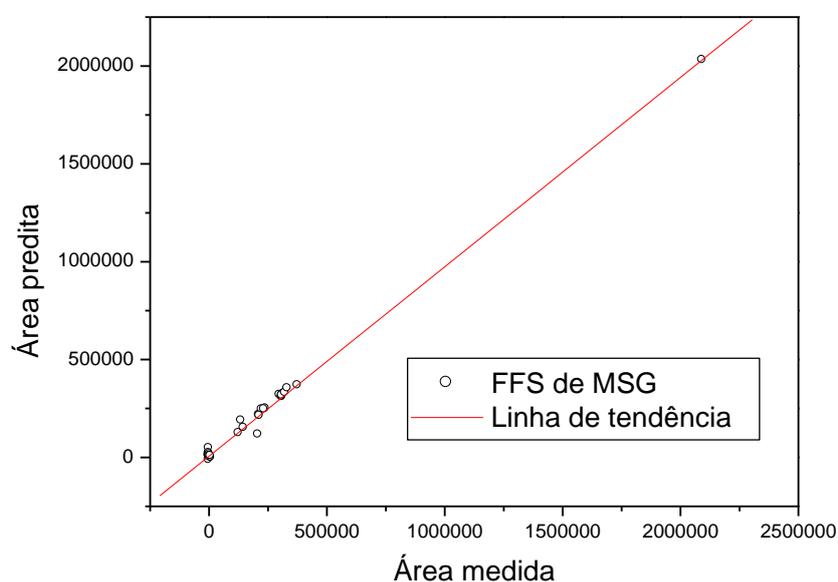
R<sup>2</sup> = Coeficiente de correlação de validação cruzada; VRA = Variância relativa acumulada; RMSECV = Raiz quadrado do erro médio padrão de validação cruzada (em unidades de área); VL = Número de variáveis latentes. Para cada substrato as figuras de mérito são apresentadas na ordem: 1º) triplicatas sem exclusão de amostras anômalas; 2º) triplicatas com exclusão de amostras anômalas; 3º) médias sem exclusão de amostras anômalas.

Com o intuito de agregar alternativas de melhorar a qualidade dos modelos, fez-se a exclusão das amostras anômalas, com esta tentativa os valores de R<sup>2</sup> aumentaram para todas as matrizes, sendo mais efetivo nas matrizes TSG que aumentou de 0,628 para 0,902 e para a associação MCG+MSG onde o valor de R<sup>2</sup> com a presença de amostras anômalas aumentou de 0,300 para 0,870 após a exclusão.

Com a seleção de variáveis foi possível encontrar um modelo otimizado que utilizado o tratamento quimiométrico através do algoritmo *PLS*, constituído pelas regiões espectrais dos espectros do Infravermelho e as áreas dos picos da HPLC. Ao realizar a seleção da região espectral tem-se como benefício a estabilidade do modelo em relação a linearidade e também a previsão de

estimativa de rendimento de produto a partir da correlação entre região espectrais e áreas dos picos obtidos.<sup>84</sup>

Após os tratamentos de melhorias dos modelos, verificou-se que a matriz MSG onde foram consideradas as médias das triplicatas sem exclusão de amostras anômalas apresentou  $R^2$  de 0,998, sendo este valor o maior em relação às demais amostras, assim a Figura 21 demonstra a alta correlação de previsão para esta matriz e é possível observar ausência de tendências sistemáticas na distribuição de resíduos, mostrando o seu comportamento aleatório.



**Figura 21. Correlação entre espectros de FT-IR e áreas de HPLC referente a previsão de concentração de ácido cítrico para FFS de MSG.**

Winder et. al. relataram a importância da utilização de FT-IR associada à análise estatística multivariada como objeto de estudo com matrizes biológicas e processos biotecnológicos tais como, quantificação de concentração de moléculas em fermentação microbiana.<sup>85</sup>

Alguns estudos já foram desenvolvidos para estimar a concentração de produção considerando diferentes métodos analíticos, Stehfeste et. al<sup>86</sup> correlacionaram HPLC e Infravermelho para determinar a quantidade de ácido

rosmarínico em culturas em suspensão de *Lavandula officinalis*, e obtiveram resultados satisfatórios.

Não há registros de estudos que envolvam a associação de FT-IR e HPLC para previsão de estimar a concentração de ácido cítrico por FFS utilizando *A. niger* USP 898. Os estudos já descritos envolvem o monitoramento por espectroscopia de absorção molecular no visível, HPLC ou respirometria acoplada à cromatografia gasosa (CO<sub>2</sub> emitido). Os resultados obtidos com relação a modelagem PLS-DRIFTS supervisionada por HPLC mostram que há possibilidade de utilização do método para algumas matrizes biológicas de FFS para obtenção de ácido cítrico por *A. niger*.<sup>87,88</sup>

Entretanto algumas otimizações podem ser realizadas para melhorar a robustez do método. Para tanto podem ser investigadas seleção de faixas no MIR, bem como propor a fragmentação dos modelos em função de diferentes faixas de concentração de ácido cítrico.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os subprodutos empregados na biotransformação apresentam grande potencial de conversão.

- O *Aspergillus niger* 898 mostrou-se eficiente às condições de fermentação que foi submetido para produção de ácido cítrico.

- As técnicas analíticas utilizadas nas caracterizações da biotransformação são eficientes para evidenciar a produção de ácido cítrico.

- Através das caracterizações realizadas nas amostras há evidência da conversão do produto desejado.

- Pode-se afirmar que a Fermentação em Fase Sólida da torta com *Aspergillus Níger* 898 é uma grande alternativa para produção de ácido cítrico.

- Os rendimentos obtidos nas fermentações estão de acordo com os das literaturas consultadas.

- A utilização do modelo quimiométrica para prever a estimativa de produção de ácido cítrico considerando áreas da HPLC e bandas de Infravermelho, mostrou-se satisfatório.

- Assim as duas ferramentas analíticas utilizadas neste trabalho aliadas a análise multivariada apresentam resultados racionais, robustos e otimizados.

## **6 SUGETÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Testar outras cepas de micro-organismos para FFS em torta de tungue e mamona;
- Realizar a fermentação em maior escala;
- Investigar produção de outros ácidos orgânicos produzidos;
- Determinar o percentual de glicerol não convertido (remanescente) durante a fermentação;
- Aperfeiçoar métodos analíticos de quantificação;
- Caracterização do ácido cítrico obtido pela precipitação do citrato de cálcio;

## 7 REFERÊNCIAS

---

1.MOTA, C. J. A.,SILVA, C. X. A, GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. Rio de Janeiro.*Quim. Nova*, v. 32, p. 639-648, 2009.

2.GHASSAN, T. A.; MOHAMAD I. AL-WIDYAN, B.; ALI O, A. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. *Appl. Thermal Eng.*, v.23, p.285-293, 2003.

3.MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim.*, v. 3, p. 416-425, 2011.

4.REGULY, J. C. Biotecnologia dos Produtos Industriais – Fermentações Industriais, Biomassa Celular. v. 2, Editora Gráfica Universitária – UFPel, Pelotas-PR, 1998.

5.BORZANI, W. et al. Biotecnologia Industrial v.4: Biotecnologia na produção de alimentos.São Paulo: Edgard Blücher, p. 451-452, 2001.

6.LIN, L, CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D.; Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*. v. 88. p. 1020–1031, 2011.

7.SILVA, P. MACK, M. CONTIERO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology *Biotechnology Advances*. v. 27, p. 30–39, 2009.

8.PELIZER, L., H.; PONTIERI, M., H.; MORAES, I., O. Utilização de resíduos agroindustriais em J processos biotecnológicos como perspectiva de redução do Impacto Ambiental. . *Technol. Manag. Innov.* v. 2, 2011.

---

9.RIVALDI, J.D.; SARROUH.,B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37, p. 44-51, 2007.

10 MOTA, S. *Introdução à Engenharia Ambiental*. Rio de Janeiro: ABES – v. 3, p. 416, 2003.

11.Centro Nacional de Tecnologias Limpas SENAI – RS/UNIDO /UNEP, *Implementação de Programas de Produção mais Limpa – Porto Alegre 2003*

12.BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 573–606, 2000.

13.CANHOS, V., P; MANFIO, G., P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Campinas (SP). Disponível em:[http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct\\_recursos\\_biologicos.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf). Acesso em: 20/07/12

14.SHANG, Q.; JIANG, W.; LU, H.; LIANG, B. Properties of tung oil biodiesel and blends with diesel. *Bioresource Technology*.p. 101, 826, 2001.

15.YAZDANI, S. S., & R. GONZALEZ. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 18, p. 213-219, 2007.

16.RYWINSKA, A.; RYMOWICZ, W.; AROWSKA, B.; SKRZYPINSKI, A. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.26, p. 1217–1224, 2010.

---

17.SILVA, P. MACK, M. CONTIERO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology *Biotechnology Advances*. v. 27, p. 30–39. 2009.

18.DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P; W.R. SUTTERLIN, G.J. SUPPES.. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General*. v. 281, p. 225-231. (2005)

19.ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. ; Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. p. 837-189, 2005.

20.KARINEN, R.S., KRAUSE, A.O.I. New biocomponents from glycerol, *Applied Catalysis A: General*,v. 306, p. 128-133, 2006.

21.YONG, K.C.; OOI, T.L; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H.; J. Refining of crude glycerol recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. *J.Oil Palm Res*,v. 13, p. 39, 2001.

22.RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Curitiba:Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação de Mestrado.

23 UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. Morphology of Medically Important Fungi, San Francisco, 2000. Disponível em: [http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung\\_morph/homepage1.html](http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung_morph/homepage1.html). Consultado em 05 de outubro de 2012.

24.DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. *TIBTECH JANUARY*. v. 18. 2000

---

25.CORRREA, L. S.; ROCHA, C. P.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica 2009. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

26.PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*. v.13, p. 81-84, 2003.

27.UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipase by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v.37, p. 637-641, 2002.

28.MACIEL, G.M. Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

29.MITCHELL, D. A.; BEROVIC M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v.68, p. 61-138, 2000.

30.RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, p. 3, 1998.

31.MONTIEL-GONZÁLEZ, A., M.; VINIEGRA-GONZALÉZ, G.; FERNANDES, F., J.; LOERA, O. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 2085–2090, 2004.

32.ROCHA, C., P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus Níger* em fermentação em estado sólido. Uberlândia – MG. Dissertação de Mestrado

---

do Programa de Pós-graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. 2010

33.BOLING-FRANKENBACH, S. D.; SNOW, J. L.; PARSONS, C. M.; BAKER, D. H. The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets. *Poultry Science*, v.80, p. 783-788, 2001.

34.TSILOYIANNIS, V. K.; KYRIAKIS, S. C.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, v.70, p. 287-293, 2001.

35.LU, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 392-397, 1997.

36.TRAN, C.T.; SLY, L.I.; MITCHELL, D.A. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 399-404, 1998.

37.OLIVEIRA, L.B.; MUYLAERT, M.S., ; ROSA, L.P.; BARATA, M.; ROVERE, E. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2006

38.VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000.

39.DHILLON, G.; S.; BRAR, S., K.; KAUR, K.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*. v. 41, p. 78– 84, 2011.

---

40.PAGAGGIANI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*. v. 25, p. 244–263, 2004.

41.SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 10080–10084, 2011.

42.KUMAR, S.; KATIYAR, N.; INGLE, P.; NEGI, S. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 4909–4912, 2011

43.WANG, Q.; WANG, X.; WANG, Ma. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*. v. 43, p. 280–286, 2008.

44.FERNANDES, K., V.; GODOY, M., G.; GUIMARÃES, Z.; NASCIMENTO, V., V. Detoxicação da torta de mamona e produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, PB – 2010

45.INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1:Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 3, 1985.

46.HERMES, N.; TORRES, J., P., M. *Análise de manganês nos alimentos produzidos em canteiros de mudas de tabacos na bacia hidrográfica do Rio Pardinho*. Teno-lóg. Santa Cruz do Sul, v.7, n.2, p.97-106, 2003.

---

47.CHEN, G., C.; JOHNSON, B., R. Improved Colorimetric Determination of Cell Wall Chitin in Wood Decay Fungi., Applied and environmental microbiologic. p. 13-16, 1983

48.CHENG, Y.; LABAVICHT, J.; VANDERGHEYNST, J., S. High-throughput analysis of hexosamine using a colorimetric method. Analytical Biochemistry. v. 408, p. 160–162, 2011.

49.ASTERIOU, T.; DESCHREVEL, B.; DELPECH, B.; BERTRAND, P.; BULTELLE, F.; MERAI, C.; VINCENT, J. An Improved Assay for the *N*-Acetyl-D-glucosamine Reducing Ends of Polysaccharides in the Presence of Proteins. Analytical Biochemistry. v. 293, p. 53–59, 2001.

50.DHILLON, G., S.; BRAR, S., K.; KAUR, K.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. Industrial Crops and Products. v. 41, p. 78– 84, 2013.

51.LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. Citric acid production by *Aspergillus niger* in solid substrate fermentation. Bioresource Technology. v. 54, p. 235-239, 1995.

52.ANDREA, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITISA, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. Industrial Crops and Products. v. 31, p. 407–416, 2010.

53.GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 85-101, 2003.

54.NOPHARATANA, M; MITCHELL, D.A.; HOWES, T. Use of Confocal Microscopy to Follow the Development of Penetrative Hyphae During Growth

---

of *Rhizopus oligosporus* in an Artificial Solid-State Fermentation System. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 81, p. 438-447, 2003.

55.ZAMANI, A.; JEIHANIPOUR, A.; EDEBO, L.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls, *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 8314–8318, 2008.

56.EL-SAHARTY, Y., S.; BARY, A., A. High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. *Analytical Biochemistry*. v. 322, p. 257–263, 2003.

57.CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A .; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*. v. 36, p. 1097-1108, 2011.

58.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.

59.KAREEM, S. O.; AKPAN, I.;ALEBIOWU, O. O. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 6, 2010, p. 161-165, 2011.

60.OLIVEIRA, L.B.; MUYLEAERT , M.S., ; ROSA, L.P.; BARATA, M.; ROVERE, E. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2006

61.VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 175-178, 2000.

---

62.ANGUMEENAL, A.R.;VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 2012.

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

64.MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.38, p. 715-721, 2002.

65.KAMINI, R.; MALA. J.G.S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*. v. 33, p. 505-511, 1998

66.FALONY, G.; ARMAS, J., C.; MENDOZ, J., C., D.;HERNÁNDEZ, J., L., M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* v. 44, p. 235–240, 2006.

67.MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.38, p. 715-721, 2002.

68.GOMBERT, A.K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, v.35, p. 85-90, 1999.

69.VENKATA, R.P.; JAYARAMAN K.; LAKSHMANAN, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 1: determination of significant process variables. *Process Biochemistry*, v.28, p.385-389, 1993.

70.DOMÍNGUEZ, A. et al. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, v.25, p. 1225-1229, 2003.

---

71.KELLER, N.P; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*. v. 3, p. 937-47, 2005.

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

73.CASTILHO, L.R.; ALVES, T.L.M; MEDRONHO, R.A. Production and extration of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues wich *Aspergillus niger*. *Biosource Technology*, v.71, p.45-50, 2000.

74.HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, New York, v. 27, p. 782-798, 2009.

75.REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

76.PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.

77.DANTAS, É. M.; AQUINO, L., C., L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para obtenção de lípase microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010

78 Fernandes, K., V.; Godoy, M., G., Guimarães, Z.; Nascimento, V., V.; Melo, E., J., T.; Freire, D., M., G.; Machado, O., L., T. **DESTOXIFICAÇÃO DA TORTA DE MAMONA E PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO *Aspergillus niger*. IV Congresso**

---

*Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*, p. 1876, João Pessoa, PB, 2010.

79. GIORDANO, M. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, v. 37, p. 271-279, 2001.

80. CANELLA, K, M, N., C.; GARCIA, R., B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim. Nova*, v. 24, p. 13-17, 2001.

81. NAUMANN, D. *Infrared Spectroscopy in Microbiology*. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: R.A. Meyers, 2000

82. WANG, T.; DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- $\alpha$ -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 67, n. 1, p. 133–137, 2007.

83. SANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURAKOVA, M.; MACHOVA, E. Microbial (1-3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, v. 38, p. 247–253, 1999.

84. BORIN, A.; POPPI, R. Application of mid infrared spectroscopy and PLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vibrational Spectroscopy*, v. 37, p. 27-32, 2005.

85. WINDER, C., L.; CORNMELL, R.; SCHULER, S.; JARVIS, R., M.; STEHENS, G., M.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting as a tool to monitor whole-cell biotransformations. *Anal Bioanal Chem*, v. 399, p. 387-401, 2011

---

86. STEHFEST, K.; BOESE, M.; KERNS, G.; PIRY, A.; WILHELM, C. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *J. Plant Physiol.* v. 161. p. 151–156, 2004.

87. PINTADO, J.; LONSANE, B., K.; GAIME-PERRAUD, I.; ROUSSOS, S. On-line monitoring of citric production in solid-state culture by respirometry, *Process Biochemistry.* v. 33, p. 513-518, 1998.

88. PRADO, F., C.; VANDENBERGHE, L., P., S.; SOCCOL, C., R. Relation between Citric Acid Production by Solid-State Fermentation from Cassava Bagasse and Respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in Semi-Pilot Scale. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY.* v.48, p. 29-36, 2005.