

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

JULIANA APARECIDA FRADE SANTOS

**Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja
para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido**

**Lorena – SP
2008**

JULIANA APARECIDA FRADE SANTOS

**Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja
para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Industrial.

Área de Concentração: Conversão de biomassa

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

**Lorena – SP
2008**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Assessoria de Informação e Documentação da Escola de
Engenharia de Lorena EEL/USP

Santos, Juliana Aparecida Frade.

Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de
laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por
fermentação em estado sólido / Juliana Aparecida Frade
Santos; orientador Arnaldo Márcio Ramalho Prata.-- Lorena,
2008.

102f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial – Área de concentração: Conversão de
Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São
Paulo.

1. Resíduos Industriais 2. Ácido cítrico 3. Fermentação em
estado sólido I. Título.

CDU 663.1

Dedico esta dissertação à minha querida filha,
Maria Luisa, aos meus pais, Fátima e Benedito,
ao meu marido, Felipe e aos meus irmãos,
Mariana e Júlio, pelo amor, apoio e incentivo
constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar o meu caminho.

Ao orientador, Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pelo aprendizado, confiança, paciência e principalmente pela grande amizade.

A EEL, pela oportunidade de realizar este mestrado.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

À Cutrale e à microrcervaria da EEL, pela doação dos resíduos.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Biotecnologia, que contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Adriana, Cláudia, Rodrigo, Viviane, Wesley, Juan, Dani Cortez e Fernanda pelo companheirismo e incansável ajuda.

À minha filha, Maria Luisa e ao meu marido Felipe, pela compreensão da minha ausência.

Aos meus pais, Fátima e Benedito, e aos meus irmãos, Júlio e Mariana, pelo amor e apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Aos meus familiares: Ana Lara, Adriana, Luciano, Cacá, Bina, Osmar, Guto, Gabriela, Rafael, Guilherme, Ivone e Naza, pelo incentivo e carinho.

RESUMO

SANTOS, J. A. F. **Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido.** 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

O ácido cítrico é um composto orgânico amplamente empregado nas indústrias alimentícias e de bebidas, assim como em fármacos e cosméticos. A produção comercial deste ácido é realizada por via fermentativa, empregando-se principalmente o fungo *Aspergillus niger*. Sob o ponto de vista do aproveitamento de resíduos industriais destaca-se o processo de fermentação em estado sólido, o qual vem sendo bastante estudado. O Brasil, como o maior produtor mundial de suco de laranja e quarto maior produtor mundial de cerveja, é responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos de laranja e de malte de cevada, os quais podem ser utilizados em processos de bioconversão para se obter produtos de elevado valor agregado. Visando a obtenção de um produto de interesse comercial a partir de substratos alternativos, o presente projeto consistiu da avaliação do potencial dos resíduos de laranja e cevada como suporte e fonte de substrato para a produção do ácido cítrico por *Aspergillus niger*, via fermentação em estado sólido, realizada em frascos. Primeiramente foi realizada a caracterização dos respectivos resíduos, determinando-se seus teores de açúcares solúveis. Em seguida, os resíduos foram desidratados, para ajuste do tamanho da partícula e, antes de cada ensaio, foram umedecidos conforme o teor de umidade pré-estabelecido. A partir de dados da literatura, foram realizados experimentos em escala de laboratório a fim de se avaliar o efeito das variáveis: tamanho da partícula, teor de umidade e porcentagem de metanol, de acordo com um planejamento estatístico. Os dois resíduos mostraram-se adequados para a obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido empregando-se o fungo *Aspergillus niger*, mesmo sem a sua suplementação com nutrientes. A máxima produção de ácido cítrico com o resíduo de laranja (66,6 g / kg de resíduo seco) foi obtida com uma umidade de 65%, teor de metanol de 5% e tamanho de partícula de 0,92 mm ao passo que o maior valor de $Y_{P/S}$ (0,60 g/g) foi obtido com tamanho de partícula de 1,44 mm, 80% de umidade e 7% de metanol. Para o resíduo de cevada tanto a produção máxima (21,5 g / kg de resíduo seco) quanto o maior valor de $Y_{P/S}$ foram obtidos com 65% de umidade, 5% de metanol e tamanho de partícula de 0,50 mm.

Palavras-chave: Resíduos industriais, Ácido cítrico, Fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

SANTOS, J. A. F. **Evaluation of the wastes from orange juice and beer manufacturing for citric acid production in solid state fermentation.** 2008. 102f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

The citric acid is an organic compound thoroughly used in the food and beverages industries, as well as in pharmaceuticals and cosmetics. The commercial production of this acid is accomplished by fermentative process, using mainly the fungus *Aspergillus niger*. Concerning the use of industrial wastes, it can be mentioned the solid state fermentation process, which has been quite studied. Brazil, as the largest world producer of orange juice and fourth larger world producer of beer, is responsible for the generation of great amount of wastes from orange and barley malt, that can be used in bioconversion processes to obtain high value-added products. Seeking the obtaining of a product of commercial interest from alternative raw materials, the present project consisted of the evaluation of the potential of orange and barley wastes as support and substrate source for the production of citric acid by *Asperillus niger*, through solid state fermentation, carried out in flasks. Firstly, the characterization of the respective wastes was accomplished, being determined their levels of reducing and total soluble sugars. Afterwards, the wastes were dehydrated, for size particle adjustment and, before each assay, water were added to reach pre-established moisture levels. Considering literature data, experiments were accomplished in laboratory scale in order to evaluate the effect of the variables: particle size, moisture level and methanol percentage, according to a statistical design. The two wastes showed to be appropriate for the citric acid production by solid state fermentation using the fungus *Aspergillus niger*, even without nutrient supply. The maxim citric acid production with the orange residue (66,6 g / kg of dry residue) was obtained with a moisture of 65%, methanol level of 5% and particle size of 0,92 mm, while the largest value of $Y_{P/S}$ (0,60 g/g) was obtained with particle size of 1,44 mm, 80% of moisture and 7% of methanol. For the barley residue even the maximum production (21,5 g / kg of dry residue) as the largest value of $Y_{P/S}$ were obtained with 65% of moisture, 5% of methanol and particle size of 0,50 mm.

Keywords: Industrial wastes, Citric acid, Solid state fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 Esquema generalizado do fluxo de carbono até citrato em <i>Aspergillus niger</i> . (A) via glicolítica; (B) Descarboxilação oxidativa e carboxilação do piruvato; (C) Ciclo de Krebs (adaptado de KUBICEK e ROHR, 1986).	21
Figura 4.1 Resíduo de laranja.	35
Figura 4.2 Resíduo de cevada.	36
Figura 4.3 Disposição das bandejas na estufa (A) e alturas dos resíduos distribuídos em cada bandeja (B).	36
Figura 4.4 Vedação com gaze (A) e vedação com gaze e algodão (B).	43
Figura 4.5 Vedação com papel alumínio.	45
Figura 5.1 Perfil da secagem do resíduo de laranja empregando a altura de 0,5 cm.	50
Figura 5.2 Perfil da secagem do resíduo de laranja empregando a altura de 1,0 cm.	51
Figura 5.3 Perfil da secagem do resíduo cevada empregando a altura de 0,5 cm.	51
Figura 5.4 Perfil da secagem do resíduo cevada empregando a altura de 1,0 cm.	52
Figura 5.5 Aspecto do resíduo de laranja após moagem e peneiramento.	54
Figura 5.6 Aspecto do resíduo de cevada após moagem e peneiramento.	55
Figura 5.7 Aspectos do meio durante a fermentação teste 1 do resíduo de laranja.	56
Figura 5.8 Aspectos do meio durante a fermentação teste 1 do resíduo de cevada.	56
Figura 5.9 Aspectos do meio durante a fermentação teste 2 do resíduo de laranja.	62
Figura 5.10 Aspectos do meio durante a fermentação teste 2 do resíduo de cevada.	62
Figura 5.11 Aspectos do meio durante a fermentação teste 3 do resíduo de laranja.	63
Figura 5.12 Aspectos do meio durante a fermentação teste 3 do resíduo de cevada.	63
Figura 5.13 Variação da quantidade de substrato e de produto, por quilograma de resíduo seco, durante as FES, referente aos ensaios do planejamento, para o resíduo de laranja.	67
Figura 5.14 Variação da quantidade de substrato e de produto, por quilograma de resíduo seco, durante as FES, referente aos ensaios do planejamento, para o resíduo de cevada.	69

Figura 5.15 Aspecto do meio de fermentação correspondente ao resíduo de laranja, nas condições referentes ao planejamento estatístico: (A) vista da superfície do meio, (B) ampliação da vista da superfície, (C) vista do fundo do frasco e (D) ampliação da vista do fundo do frasco.....	76
Figura 5.16 Aspecto do meio de fermentação correspondente ao resíduo de cevada, nas condições referentes ao planejamento estatístico: (A) vista da superfície do meio, (B) ampliação da vista da superfície, (C) vista do fundo do frasco e (D) ampliação da vista do fundo do frasco.....	79
Figura 5.17 Gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja.	82
Figura 5.18 Gráfico de Pareto da variável resposta $Y_{P/S}$ para o resíduo de laranja.....	82
Figura 5.19 Gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada.	83
Figura 5.20 Gráfico de Pareto da variável resposta $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada.....	83
Figura 5.21 Diagrama de cubo da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja.	90
Figura 5.22 Diagrama de cubo da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada.	90
Figura 5.23 Diagrama de cubo da variável resposta concentração $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada.....	91
Figura 5.24 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona teor de umidade com o teor de metanol, representando o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Características do ácido cítrico.....	15
Tabela 2.2 Aplicações do ácido cítrico.....	16
Tabela 2.3 Microrganismos produtores de ácido cítrico.	19
Tabela 2.4 Matérias-primas utilizadas na produção de ácido cítrico.	25
Tabela 2.5 Aplicações, microrganismos e substratos empregados na FES.	32
Tabela 4.1 Valores do tamanho de partícula dos resíduos de laranja e cevada correspondentes aos níveis definidos para o planejamento estatístico.....	37
Tabela 4.2 Metodologias empregadas para a determinação dos açúcares solúveis redutores e açúcares solúveis totais dos resíduos de laranja e cevada.....	38
Tabela 4.3 Valores dos fatores estudados, de acordo com os níveis do planejamento fatorial completo 2^3 , para o resíduo de laranja.	45
Tabela 4.4 Valores dos fatores estudados, de acordo com os níveis do planejamento fatorial completo 2^3 , para o resíduo de cevada.	46
Tabela 4.5 Matriz de planejamento experimental fatorial 2^3 completo.....	46
Tabela 5.1 Concentrações de açúcares solúveis, totais e redutores, dos resíduos de laranja e cevada determinadas por diferentes metodologias.....	53
Tabela 5.2 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 1.....	57
Tabela 5.3 Consumo de açúcares totais, produção de ácido cítrico e fator de conversão de substrato em produto durante o teste de fermentação 1.	57
Tabela 5.4 Teor de umidade dos resíduos após esterilização, em frascos com as vedações V1 e V2.....	58
Tabela 5.5 Teor de umidade dos resíduos durante o período de incubação, em frascos com as vedações V1 e V2.....	59
Tabela 5.6 Teor de umidade dos resíduos, durante o período de incubação, em frascos com a vedação V1.....	60
Tabela 5.7 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 2.....	62

Tabela 5.8 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 3.....	64
Tabela 5.9 Valores reais dos fatores e parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, para o resíduo de laranja.	73
Tabela 5.10 Valores reais dos fatores e parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central para o resíduo de cevada.	73
Tabela 5.11 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja considerando curvatura.	85
Tabela 5.12 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja considerando curvatura.	85
Tabela 5.13 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada considerando curvatura.	86
Tabela 5.14 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de cevada considerando curvatura.	86
Tabela 5.15 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja desconsiderando curvatura.	87
Tabela 5.16 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja desconsiderando curvatura.	88
Tabela 5.17 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada desconsiderando curvatura.	88
Tabela 5.18 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de cevada desconsiderando curvatura.	89
Tabela 5.19 Análise de variância da regressão que representa o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja.	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ÁCIDO CÍTRICO	14
2.1.1 <i>Características e Aplicações</i>	<i>14</i>
2.1.2 <i>Evolução histórica</i>	<i>17</i>
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	18
2.2.1 <i>Microrganismo</i>	<i>18</i>
2.2.2 <i>Mecanismo bioquímico</i>	<i>20</i>
2.2.3 <i>Fatores que influenciam a produção de ácido cítrico</i>	<i>20</i>
2.2.4 <i>Matéria-prima</i>	<i>23</i>
2.2.5 <i>Formas de condução do processo</i>	<i>25</i>
2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	27
2.3.1 <i>Características</i>	<i>27</i>
2.3.2 <i>Matérias-primas, microrganismos e aplicações</i>	<i>29</i>
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 PREPARO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	34
4.1.1 <i>Secagem</i>	<i>34</i>
4.1.2 <i>Ajuste de tamanho de partícula</i>	<i>36</i>
4.1.3 <i>Caracterização</i>	<i>37</i>
4.2 PROCESSO FERMENTATIVO	40
4.2.1 <i>Fungo</i>	<i>40</i>
4.2.2 <i>Preparo do inóculo</i>	<i>40</i>
4.2.3 <i>Meio de fermentação</i>	<i>41</i>
4.2.4 <i>Condições de fermentação</i>	<i>41</i>
4.2.5 <i>Ensaio preliminares de fermentação</i>	<i>41</i>
4.2.6 <i>Estudo das variáveis do processo</i>	<i>45</i>
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	47
4.3.1 <i>Determinação dos teores de umidade dos resíduos</i>	<i>47</i>

4.3.2 Extração dos açúcares e do produto	47
4.3.3 Determinação da concentração de açúcares totais solúveis durante o processo fermentativo.....	47
4.3.4 Determinação da concentração de ácido cítrico	48
4.3.5 Determinação da proporção de esporos	48
4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	48
4.4.1 Produção de ácido cítrico	48
4.4.2 Fator de conversão de substrato em produto.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 SECAGEM DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	50
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS.....	53
5.3 AJUSTE DO TAMANHO DE PARTÍCULA	54
5.4 TESTES DE FERMENTAÇÃO	55
5.4.1 Teste de fermentação 1.....	55
5.4.2 Influência da esterilização e do tempo de incubação no teor de umidade dos meios.....	58
5.4.3 Influência da umidificação do ambiente sobre os teores de umidade dos meios durante a incubação	60
5.4.4 Teste de fermentação 2.....	61
5.4.5 Teste de fermentação 3.....	63
5.5 INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA PARTÍCULA, DO TEOR DE UMIDADE E DA PORCENTAGEM DE METANOL NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO.....	64
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DOS PLANEJAMENTOS	81
6 CONCLUSÕES.....	94
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXO.....	102

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico, ácido orgânico mais versátil, em função de suas propriedades acidulante, tamponante, atoxicidade e palatabilidade, é extensivamente empregado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. No entanto, é no segmento das bebidas não alcoólicas que encontra no Brasil, a maior demanda. Dados estatísticos mostram que a demanda por este ácido, inclusive em âmbito mundial, aumenta 3-5% anualmente.

Após a descoberta de seu potencial, a produção comercial de ácido cítrico tornou-se objetivo de muitas empresas, que desenvolveram métodos de extração e síntese. Porém, a obtenção pelo método fermentativo mostrou-se mais viável, sendo responsável por quase toda a produção do ácido cítrico utilizado atualmente no mundo. Neste caso, a fermentação cítrica por fungos é o método mais empregado, sendo utilizado, sobretudo, o processo submerso. Muitos fungos são produtores de ácido cítrico, porém, o mais usado é *Aspergillus niger*, por apresentar elevado rendimento, uma das características fundamentais para os processos industriais. Nas últimas décadas vem aumentando o uso da fermentação em estado sólido (FES), processo adequado para o aproveitamento de resíduos industriais sólidos, como alternativa à fermentação submersa. Consiste de um processo fermentativo que ocorre num meio com água suficiente para permitir o desenvolvimento do microrganismo, porém que não escorre do suporte. Emprega-se um meio sólido natural com o substrato fermentescível ou um meio sólido que serve apenas como suporte inerte, e que é impregnado com uma solução contendo substrato.

No processo microbiológico submerso de produção de ácido cítrico utiliza-se principalmente a sacarose como substrato, na forma comercial ou contida no melaço de beterraba ou no caldo de cana-de-açúcar. Contudo, vários trabalhos estão sendo efetuados

com o intuito de viabilizar o emprego de matérias-primas alternativas, utilizando-se fontes de substrato mais baratas, e, por outro lado, contribuir para uma disposição mais adequada dos resíduos industriais. Como exemplo, tem-se os hidrolisados de materiais lignocelulósicos e o soro de queijo.

O Brasil, como grande produtor mundial de suco de laranja e de cerveja, produz anualmente cerca de 1,4 e 2,0 milhões de toneladas de resíduos provenientes destes processamentos, respectivamente, os quais, em sua maioria, são empregados para alimentação animal. Devido suas características, tais resíduos podem ser utilizados em processos de bioconversão, uma vez que apresentam em sua composição açúcares fermentescíveis. O resíduo de laranja, por exemplo, foi estudado como meio para a produção de enzimas microbianas (pectinases e amilases).

Considerando o aspecto positivo de obtenção de um produto de interesse comercial, a disponibilidade de matéria-prima e a redução do impacto negativo no ambiente, causado pelos resíduos industriais, o trabalho desenvolvido teve por finalidade avaliar os resíduos de laranja e de cevada como meios para FES com o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. O estudo foi realizado visando estabelecer condições apropriadas para a condução do processo, assim como estudar algumas das variáveis importantes para a obtenção de ácido cítrico por FES. Para isto, foram definidas algumas condições de preparo da matéria-prima como secagem e redução de tamanho, estabelecidas as condições adequadas para a fermentação dos resíduos e, finalmente, estudados os efeitos das variáveis: tamanho de partícula, teor de umidade e teor de mentanol, por planejamento estatístico fatorial 2^3 completo, com três repetições do ponto central, para cada um dos resíduos em estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido cítrico

2.1.1 Características e Aplicações

O ácido cítrico, sólido translúcido ou branco à temperatura ambiente, é um ácido fraco encontrado principalmente como constituinte natural de muitas frutas cítricas como: abacaxi, pêra, pêssego e figo (GREWAL e KALRA, 1995; OXIDIAL, 2007). Além disso, participa do metabolismo de plantas e animais como intermediário do ciclo de Krebs (PAPAGIANNI, 2007).

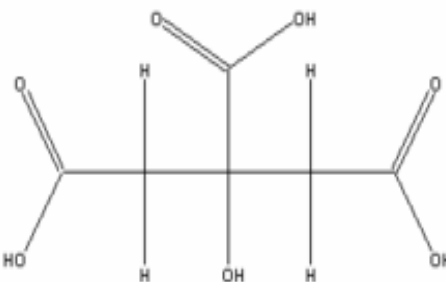
Este composto orgânico é produzido e comercializado tanto na forma anidra como monohidratada, sendo a temperatura de transição entre as duas fases igual a 36,6 °C. A forma anidra é obtida por cristalização da solução aquosa quente, enquanto a obtenção da forma monohidratada se dá por cristalização a temperaturas abaixo de 36,6 °C (MAGNUSON; LASURE, 2004; MILSON; MEERS, 1985).

A acidez do ácido cítrico está relacionada com seus três grupos carboxilas, podendo perder próton em soluções formando o íon citrato, o qual é um bom controlador de pH de soluções ácidas. Algumas características do ácido cítrico estão apresentadas na Tabela 2.1 (WIKIPÉDIA, 2007).

Devido às propriedades acidulante, palatabilidade, atoxicidade, facilidade de assimilação pelo organismo humano, tamponamento e sequestramento de íons, o ácido cítrico apresenta uma série de aplicações industriais (KUBICEK; ROHR, 1986; MILSON; MEERS,

1985; SODECK et al., 1981). Cerca de 70% da produção deste ácido é utilizada pela indústria de alimentos, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias (PRADO; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2005). Algumas propriedades do ácido cítrico estão apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 Características do ácido cítrico.

Geral	
	
Nome usual	Ácido cítrico
Fórmula química	$C_6H_8O_7$
Massa molecular	192,13 g/mol
Nome oficial	Ácido 2-Hidroxi-1, 2,3-propanotricarboxílico
Comportamento de fase	
Ponto de fusão	426 K (153 °C)
Temperatura de decomposição térmica	448 K (175 °C)
Propriedades ácido-base	
pKa ₁	3,15
pKa ₂	4,77
pKa ₃	5,19
Propriedades sólidas	
Entalpia padrão de formação (ΔH_f°)	-1543,8 kJ/mol
Entropia absoluta a 25 °C e 1,0 atm (S°)	252,1 J/mol.K
Calor específico (C_p)	226,5 J/mol.K
Densidade	1665 kg/m ³

Fonte: WIKIPÉDIA, 2007.

Tabela 2.2 Aplicações do ácido cítrico.

Aplicações	Indústrias	Funções	Referência
Bebidas	Refrigerantes e xaropes	Estimula o sabor natural da fruta. Atua como acidulante em bebidas a base de carbonato e sacarose.	SOCCOL et al., 2006
	Vinhos e cidras	Previne a turbidez de vinhos e cidras e o amarelamento de vinhos brancos. Efetua o ajuste de pH e inibe a oxidação.	GREWAL; KALRA, 1995
Alimentos	Congelamento de frutas	Protege o ácido ascórbico por inativação de traços de metais.	SOCCOL et al., 2006
	Produtos lácteos	Atua como emulsificante em sorvetes e no processamento de queijos. Atua como agente acidificante em queijos e também como antioxidante.	GREWAL; KALRA, 1995
	Ração animal	Utilizado como complementação alimentar.	SOCCOL et al., 2006
Agricultura		Determina o valor de micronutrientes em fertilizantes. Aumenta a disponibilidade de fósforo nas plantas.	SOCCOL et al., 2006
Farmacêutica	Cosméticos	Atua como agente tamponante e no ajuste de pH.	SOCCOL et al., 2006
	Remédios	Age como efervescente ao combinar-se com bicarbonatos, antioxidante nas preparações de vitaminas, anticoagulante entre outras aplicações.	GREWAL; KALRA, 1995
Outros	Limpeza de metal	Remove óxidos metálicos da superfície de metais ferrosos e não ferrosos, para operação de limpeza de óxidos de cobre e ferro.	SOCCOL et al., 2006
	Óleos e gorduras	Atua como estabilizante através da complexação com metais pesados como o ferro e o cobre.	GREWAL; KALRA, 1995
	Limpeza química de membrana de osmose e equipamentos de diálise	Ação desincrustrante	OXIDIAL, 2007

Os sais de citrato, como citrato trissódico e citrato tripotássico são usados na medicina para evitar a coagulação do sangue e na indústria alimentícia como emulsificante para fabricação de certos produtos como queijo e iogurte (MICROBIOLOGIA ..., 2007).

Ésteres de ácido cítrico, em particular trietil, tributiril e acetilbutiril, são amplamente utilizados como plastificantes não tóxicos nas películas plásticas de embalagens de alimentos (MATTEY; KRISTIANSEN, 1999; MILSON; MEERS, 1985).

2.1.2 Evolução histórica

O primeiro relato de isolamento e cristalização do ácido cítrico ocorreu em 1784 por Scheele, empregando suco de limão. A produção comercial deste composto teve início na Inglaterra por volta de 1826, a partir do citrato de cálcio italiano derivado do suco de limão, porém o comércio era monopolizado por um cartel italiano com preço elevado. Em 1880, Grimoux e Adams sintetizaram ácido cítrico a partir do glicerol e, mais tarde, a partir da dicloroacetona. Vários outros métodos de síntese foram estudados, utilizando-se diversos tipos de reações e substâncias, porém limitações técnicas e econômicas comprovaram a inviabilidade destes processos (MILSON; MEERS, 1985). Em 1893, Wehmer descobre que uma espécie fúngica de *Citromyces* (atualmente denominada *Penicillium*) acumulava ácido cítrico em meio contendo açúcar e sais orgânicos (MATTEY; KRISTIANSEN, 1999; PENNA, 2001). No entanto, este processo industrial não teve êxito devido aos problemas de contaminação e longo período de fermentação. Currie constata, em 1916, que algumas linhagens de *Aspergillus niger* excretavam quantidades significativas de ácido cítrico quando

cultivadas em meio com alta concentração de açúcar, sais minerais e pH de 2,5 a 3,5. Este estudo foi a base para o sucesso da produção industrial deste ácido (SOCCOL et al., 2006).

Atualmente predomina a síntese do ácido cítrico por via fermentativa, principalmente o processo submerso, a partir de melaços de cana-de-açúcar e de beterraba empregando o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Este processo é responsável por mais de 90% da produção, uma vez que é mais econômico e simples que a via química (GRAF, 2007; SOCCOL et al., 2006; YIGITOGLU, 1992).

O ácido cítrico é o mais importante ácido orgânico produzido por fermentação em termos quantitativos, apresentando em 2004 uma produção global de cerca de 1,4 milhões de toneladas, sendo que a demanda por este produto cresce cerca de 3-5% a cada ano (GRAF, 2007; SOCCOL et al., 2006).

A fim de atender a demanda do mercado consumidor latino-americano, a CARGILL inaugurou no Brasil em 2000, no complexo industrial de Uberlândia (MG), uma unidade para produção de ácido cítrico, com capacidade de 35 mil toneladas/ano. Assim, abastece o mercado nacional e exporta o excedente (ADTP, 2006).

2.2 Produção de ácido cítrico

2.2.1 Microrganismo

Ao longo dos anos um grande número de microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias, têm sido utilizados para a produção de ácido cítrico. Alguns destes estão apresentados na Tabela 2.3 (GREWAL; KALRA, 1995).

As bactérias *Anthrobacter paraffinens* e *Corynebacterium ssp* são capazes de acumular ácido cítrico em meio contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono (MILSON; MEERS, 1985).

Entre as várias espécies de leveduras produtoras de ácido cítrico, *Candida lipolytica* é a mais estudada, principalmente quando se utilizam hidrocarbonetos como substrato (MARCHAL; METCHE; VANDECASTEELE, 1980). O fator limitante do emprego deste microrganismo na fermentação cítrica é a formação simultânea de ácido isocítrico, o qual é indesejável para o processo (SOCCOL et al., 2006).

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é o agente mais empregado na produção de ácido cítrico, devido sua capacidade de fermentar uma larga variedade de materiais de baixo custo e proporcionar altos rendimentos (YIGITOGU, 1992). Um estudo de melhoramento genético de *A. niger* foi realizado no Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), resultando em um aumento na produção de ácido cítrico de até 30% em relação ao original (ARAÚJO, 2007).

Tabela 2.3 Microrganismos produtores de ácido cítrico.

Fungos	Leveduras	Bactérias
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Candida lypolitica</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Anthrobacter paraffinens</i>
<i>A. aculeatus</i>	<i>C. oleophila</i>	<i>Corynebacterium ssp</i>
<i>A. awamori</i>	<i>C. guilliermondii</i>	
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>C. citroformas</i>	
	<i>Hansenula anamola</i>	

Fonte: GREWAL; KALRA, 1995.

2.2.2 Mecanismo bioquímico

A bioprodução de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é resultado de uma operação defeituosa que ocorre no ciclo do ácido tricarboxílico (STANIER; ADELBERG; INGRAHAN, 1976). Este metabolismo pode ser dividido em três etapas principais: (1) a quebra das hexoses em piruvato e CO₂ na via glicolítica, (2) a formação do oxaloacetato a partir de piruvato e CO₂, por via anaplerótica e (3) o acúmulo de ácido cítrico com o ciclo de Krebs (KUBICEK; ROHR, 1986). Um esquema do balanço de carbono representando estas três etapas está apresentado na Figura 2.1.

Sob o ponto de vista morfológico a fermentação com fungo filamentoso apresenta duas fases distintas que são a tropofase, fase de crescimento (que corresponde desde a germinação dos esporos até a formação do micélio com as características adequadas), e a idiofase, fase de formação de produto propriamente dita. De acordo com Crueger e Crueger (1990) a estrutura do micélio formado na tropofase durante a fermentação cítrica submersa, define o sucesso do processo de produção.

O fenômeno bioquímico que determina o início do acúmulo de ácido cítrico ainda não está esclarecido. Algumas propostas são encontradas na literatura, baseadas na inibição das enzimas aconitase e isocitrato desidrogenase quando o meio é deficiente de alguns íons metálicos, por exemplo, manganês, ferro e cobre (WOLSCHEK; KUBICECK, 1999).

2.2.3 Fatores que influenciam a produção de ácido cítrico

A produção de ácido cítrico é significativamente afetada pela fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, elementos-traços, aeração, temperatura e pH (PAPAGIANNI, 2007).

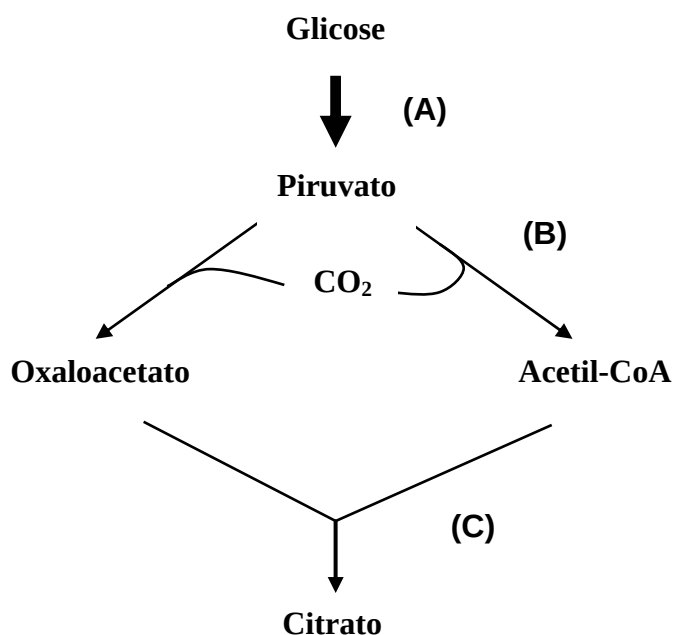


Figura 2.1 Esquema generalizado do fluxo de carbono até citrato em *Aspergillus niger*. (A) via glicolítica; (B) Descarboxilação oxidativa e carboxilação do piruvato; (C) Ciclo de Krebs (adaptado de KUBICEK; ROHR, 1986).

A concentração e o tipo de fonte de carbono são importantes para o acúmulo de ácido cítrico. Os carboidratos mais empregados são: glicose, frutose e sacarose, devido à rápida assimilação dos mesmos pelos fungos (YIGITOGU, 1992). Em fermentação submersa a faixa ótima de concentração de sacarose é 10 a 14%, sendo que abaixo de 2,5% não há produção de ácido cítrico (XU et al., 1989a, XU et al., 1989b). Segundo Penna (2001) as baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, e, conseqüentemente, diminuem a produção de ácido cítrico.

A fermentação cítrica submersa requer uma concentração de fonte de nitrogênio de 0,1 a 0,4 g/L. Em elevada quantidade, este composto propicia o crescimento fúngico e o consumo de substrato, diminuindo o acúmulo de ácido cítrico (SOCCOL et al., 2006). Os componentes de amônio ácidos (sulfato de amônio e nitrato de amônio) são os mais empregados, pois ao serem consumidos, diminuem o pH do meio, o que é essencial para obtenção de ácido cítrico (YIGITOGU, 1992).

A presença de fósforo na faixa de 0,5 a 5 g/L no meio de fermentação submersa tem um efeito positivo sobre a produção do ácido. A fonte de fosfato mais utilizada é o dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4). Este composto, quando presente em excesso promove maior crescimento do fungo *A. niger* e menor produção de ácido (GREWAL; KALRA, 1995).

O fungo filamentoso *A. niger* requer certos metais para seu crescimento, porém uma limitação destes elementos é essencial para a produção de ácido cítrico, também denominados elementos traços. Os principais cátions que afetam o acúmulo de ácido cítrico por *A. niger* são: Zn^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} e Mg^{+2} . De acordo com Papagianni (2007), quando estes cátions bivalentes limitam o crescimento, ocorre acúmulo de ácido cítrico. A composição em elementos traços é variável tanto em termos dos íons utilizados como de suas concentrações. Um meio amplamente empregado em fermentação cítrica submersa é o proposto por Shu e Johnson (1948 apud PRATA, 1989), contendo: 140 g/L de sacarose, 2,5 g/L de NH_4NO_3 , 1,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,4 ppm de Zn^{+2} , 0,34 ppm de Cu^{+2} , 0,8 ppm de Fe^{+2} . Prata (1989) constatou o efeito positivo dos íons Fe^{+2} , Zn^{+2} e Cu^{+2} , sobre a produção de ácido cítrico em hidrolisado celulósico de bagaço de cana, em sistema submerso.

A adição de metanol, n-propanol ou isopropanol em meio proveniente de materiais impuros, geralmente na quantidade de 1 a 5%, neutraliza o efeito negativo dos metais, resultando um aumento da produção de ácido cítrico (KUBICEK; ROHR, 1986). O mecanismo pelo qual o álcool atua não está esclarecido na literatura, no entanto, segundo Maddox, Hossain e Brooks (1986 apud ROUKAS, 1999), este composto têm mostrado atuar principalmente na permeabilidade da membrana celular, permitindo a excreção do citrato.

O processo de fermentação cítrica requer oxigênio tanto na fase de crescimento celular quanto durante o acúmulo de ácido.

SHU, P.; JOHNSON, M. J. Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *A. niger* in submerged culture. **Journal of Bacteriology**, v. 54, p. 161-167, 1947.

MADDOX, I. S.; HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D. the effect of methanol on citric acid production from galactose by *A. niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 203-205, 1986

Uma interrupção no fornecimento de oxigênio altera completamente a velocidade de produção (KUBICEK; ROHR, 1986). As taxas máximas de produção na fermentação cítrica foram observadas em altos valores de oxigênio dissolvido (90 % de saturação) em sistema descontínuo alimentado (DAWSON et al., 1988).

O pH do meio é importante em duas diferentes fases da fermentação. Primeiramente, os esporos requerem um pH acima de 5,0 para germinação e crescimento. Posteriormente, o pH para produção de ácido cítrico precisa ser baixo (cerca de 2,0). O baixo pH reduz o risco de contaminação da fermentação por outros microrganismos, além de inibir a produção de ácidos orgânicos indesejáveis (glicônico e oxálico) e facilitar a recuperação do ácido cítrico do meio (PAPAGIANNI, 2007). De acordo com Roukas (2000), que estudou a fermentação cítrica em estado sólido, empregando figo como matéria-prima, em um intervalo de pH inicial de 4,0 a 8,0, a maior produção de ácido ocorreu em pH inicial de 7,0.

A produção de ácido cítrico por *A. niger* deve ser realizada a temperaturas em torno de 30 °C, sendo que acima de 33 °C ocorre formação de ácido oxálico, e, abaixo de 28 °C ocorre diminuição da produção de ácido cítrico (SODECK et al., 1981).

2.2.4 Matéria-prima

Uma variedade de matérias-primas tais como hidrocarbonetos, melaços e materiais amiláceos, pode ser empregada como fonte de substrato para produção de ácido cítrico por processo submerso. A produção industrial é realizada utilizando principalmente melaços de cana-de-açúcar e beterraba (SOCCOL et al., 2006).

Atualmente, vários trabalhos estão sendo relatados nos quais se utilizam resíduos e subprodutos agroindústrias como matéria-prima para produção de ácido cítrico por

fermentação em estado sólido. Na Tabela 2.4 estão apresentadas algumas matérias-primas empregadas com este objetivo (GREWAL; KALRA, 1995; SOCCOL et al., 2006).

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos de mercado. Assim, inúmeros órgãos governamentais e industriais estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza, causados pela disposição inadequada de resíduos. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois quando acumulado, constitui potenciais problemas ambientais, exigindo investimentos significativos com tratamentos para controlar a poluição (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

A indústria de alimentos produz uma série de resíduos de alto valor para utilização em bioprocessos, como o de produção de ácido cítrico, entre os quais destacam-se os provenientes das cervejarias (bagaço de cevada) e das fábricas de suco de laranja (bagaço, semente, casca e resto de polpa).

O Brasil, como o quarto maior produtor mundial de cerveja (CERVESIA, 2007), gerou em 2007 cerca de 2.000.000 toneladas de bagaço de cevada (CABRERA, 2007), principal subproduto da indústria cervejeira. Apesar de ser produzido em grandes quantidades, as indústrias não utilizam este material, apenas o comercializam para ser empregado como ração animal (MELLO; PAWLOWSLY, 2007).

O país é também um grande produtor de suco de laranja, e, juntamente com os Estados Unidos, supre aproximadamente 90% da demanda mundial. No entanto, o processo de produção resulta grandes quantidades de resíduos, como casca e “core” (bagaço, semente e resto de polpa de fruta), que representam aproximadamente 50% da massa da fruta (ABECITRUS, 2007; ARAÚJO; MACIEL, 2006; ÍTAVO et al., 2000). No Brasil, em 2007, foi gerado cerca de 1,4 milhões de toneladas de resíduo de laranja (NATURAL..., 2007). Este material, rico em pectina, ácido ascórbico e fibras, tem sido utilizado para elaboração de

polpa cítrica em *pellets*, a qual é empregada como ingrediente de ração para bovinos (GODOY et al., 2005). Além disso, atualmente esse resíduo vem sendo aproveitado para fins mais nobres, como a produção das enzimas microbianas pectinases e amilases, entre outras (DAKHMOUCHE; AOULMI; BENNAMOUN, 2006; MARTINS et al., 2002).

Tabela 2.4 Matérias-primas utilizadas na produção de ácido cítrico.

Matéria-prima	Tipo de fermentação	Rendimento (%)
Resíduo de algodão	Superfície	-
Açúcar da alfarrobeira	Superfície	40-60 ^a
Resíduo de cervejaria	Superfície e Submerso	78,5 ^a e 42-58 ^a
Hemicelulose de madeira	Submerso	-
Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	Submerso	60 ^a
Polpa de maçã	Estado sólido	88 ^a
Polpa de uva	Estado sólido	60 ^a
Casca de kiwi	Estado sólido	60 ^a
Resíduo de abacaxi	Estado sólido	50-60 ^b

a- baseado no açúcar consumido

b- baseado no açúcar total

Fonte: GREWAL; KALRA, 1995.

2.2.5 Formas de condução do processo

A produção de ácido cítrico pode ser realizada por três tipos de fermentação: superfície, submersa e estado sólido (ADHAM, 2002; COUTO; SANROMAN, 2006; SANTOS, 2005;).

O processo de superfície em meio líquido foi o primeiro método empregado para obtenção biotecnológica de ácido cítrico em grande escala (GREWAL; KALRA, 1995). Neste caso, o micélio cresce como uma esteira na superfície do meio, que se encontra em bandejas de alumínio de elevada pureza contendo uma camada de meio de 5 a 20 cm de altura. Estas

bandejas são colocadas em câmaras ventiladas, onde há circulação de ar esterilizado, o qual é responsável pelo fornecimento de oxigênio assim como pela retirada do calor produzido durante o processo fermentativo e a temperatura é mantida entre 28 e 30 °C (GREWAL; KALRA, 1995; MATTEY; KRISTIANSEN, 1999; MILSON; MEERS, 1985).

A fermentação submersa é a técnica mais empregada para produção de ácido cítrico (CROLLA; KENNEDY, 2001; DEMIREL; YAYKASLI; YASAR, 2005; LEVINSON; KURTZMAN; KUO, 2007; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1997; YAYKASLI; DEMIREL; YASAR, 2005), pois proporciona elevados valores de produtividade e rendimento. Em geral, é utilizado por fábricas de grande porte, pois requer instalações sofisticadas e controle rigoroso (SOCCOL et al., 2006). Neste caso, o fungo se desenvolve inteiramente submerso no meio de cultura líquido sob agitação e aeração, garantindo a homogeneidade na distribuição dos micélios e dos nutrientes (PENNA, 2001). Esta fermentação foi estudada empregando-se diversos tipos de meios tais como: resíduo da cervejaria (HANG et al., 1977), hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar (PRATA, 1989) e hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto (SANTOS, 2005), entre outros.

A fermentação em estado sólido, originalmente desenvolvida no Japão, consiste de uma bioconversão em meio sólido empregando-se geralmente farelo de arroz ou resíduos de frutas, que, após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos (KUBICECK e ROHR, 1986). Este é um método simples e promissor de produção de ácido cítrico que vem sendo estudado como uma técnica alternativa para a bioutilização de resíduos agroindustriais (KIM et al., 2006; KUMAR et al., 2003a; KUMAR et al., 2003b; MAIORANO et al., 1992; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; RAIMBAULT, 1998; ROUKAS, 1999, 2000; SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002; VANDENBERGHE et al., 2000; XIE; WEST, 2006).

2.3 Fermentação em estado sólido

2.3.1 Características

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo no qual ocorre o crescimento do microrganismo sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (fonte de substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (fonte de substrato ou meio umidificante) ligado a esta matriz está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegura o crescimento e o metabolismo das células e, por outro, não excede a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001; HERMANN et al., 2003).

O processo de FES apresenta algumas vantagens e desvantagens em relação ao submerso, as quais foram listadas por Guerra et al. (2003).

As vantagens são:

- Apresenta fator de conversão de substrato em produto similar ou maior do que o obtido pelo processo submerso.
- A baixa disponibilidade de água reduz a possibilidade de contaminação por bactérias e leveduras.
- Condições ambientais similares ao *habitat* natural do fungo, o qual constitui o principal grupo de microrganismos usado em FES.
- Meio de cultura é freqüentemente simples. Geralmente o substrato contém todos os nutrientes necessários para o crescimento.
- Utiliza reatores simples.

- Requer pouca energia (em alguns casos tratamento a vapor, agitações mecânicas e aeração não são necessários).
- A baixa umidade pode favorecer a produção de componentes específicos que não são produzidos pela fermentação submersa.

As desvantagens são:

- Apenas os microrganismos que crescem em baixo teor de umidade podem ser usados.
- Geralmente os substratos precisam de pré-tratamento (redução do tamanho, hidrólise ou tratamento a vapor).
- Dificuldade na determinação da biomassa.
- A natureza sólida do substrato causa problemas no monitoramento dos parâmetros do processo (pH, teor de umidade, consumo de substrato, concentração de oxigênio e biomassa).
- A remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano é mais difícil.

Apesar das dificuldades encontradas com o aumento de escala, remoção do calor gerado e reprodutibilidade dos resultados, devido à heterogeneidade dos meios, a FES vem ocupando lugar de destaque nos últimos anos, uma vez que oferece numerosas oportunidades para a bioutilização de resíduos agroindustriais em processos que resultam baixo custo de energia e geram pouco resíduo líquido (HOLKER; LENZ, 2005; PANDEY, 2003).

As perspectivas promissoras quanto ao emprego desta técnica são confirmadas em diversos estudos realizados nos últimos anos (COUTO; SANROMAN, 2006; GUERRA et al., 2003; KUMAR et al. 2003a, KUMAR et al. 2003b; LU; BROOKS; MADDOX, 1997; MARTINS et al. 2002, MEDEIROS et al., 2003; NAGEL et al., 1999; ROUKAS, 1999; SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002; VANDENBERGHE et al., 2000).

Segundo Soccol e Vandenberghe (2003), a previsão é que em um futuro próximo o Brasil será capaz de desenvolver bioprocessos industriais baseados na fermentação em estado sólido para produção de enzimas, pigmentos, aromatizantes, bio-pesticidas, ácidos orgânicos, etc, utilizando resíduos agroindustriais.

2.3.2 *Matérias-primas, microrganismos e aplicações*

Os meios empregados para a fermentação em estado sólido são, em geral, resíduos e subprodutos da agroindústria, os quais representam recursos naturais renováveis e abundantes. Os principais componentes estruturais desses materiais são: celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteína, sendo extremamente heterogêneos (PANDEY, 2003).

Na fermentação em estado sólido, dois tipos de processos podem ser distinguidos, dependendo da natureza da fase sólida. No primeiro caso, o mais usado, o sólido serve como suporte e fonte de carbono. Estes sólidos são materiais heterogêneos e insolúveis em água provenientes da agricultura ou subprodutos da indústria alimentícia, os quais tem natureza amilácea ou lignocelulósica (cereais e subprodutos de cereais, mandioca, batata, feijão e polpa de beterraba).

No segundo caso, um suporte inerte (bagaço de cana-de-açúcar, fibra inerte e resinas) é impregnado com um meio líquido, que contém todos os nutrientes (açúcar, lipídeos, ácidos orgânicos, etc) necessários para a atuação do agente fermentador. De acordo com Guerra et al. (2003) e Santa et al. (2005) esta estratégia é a menos utilizada, mas apresenta algumas vantagens. O uso de um meio líquido definido e um suporte inerte com uma estrutura física

homogênea melhora o controle e o monitoramento do processo e a reprodução das fermentações.

Em alguns casos, a matéria-prima necessita de um tratamento para se adequar às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos, tais como: moagem, para ajustar o tamanho da partícula desejado e umedecimento, para ajustar o teor de umidade inicial de acordo com as necessidades do microrganismo. A redução do tamanho de partícula promove um aumento na área superficial, facilitando o crescimento do microrganismo e a transferência de massa e calor durante a FES. No entanto, existe uma faixa de tamanho de partícula adequada, pois partículas muito finas podem resultar em compactação do meio (PANDEY et al., 2001). Kumar et al. (2003b) avaliaram o efeito do tamanho da partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de ácido cítrico por FES, por *Aspergillus niger* DS1, sendo obtido o maior acúmulo de ácido na faixa de 1,2-1,6 mm.

O teor de umidade da matéria-prima é um fator crítico no processo de FES, pois está relacionado com a dissolução e a transferência de massa de nutrientes e oxigênio. Geralmente o teor de umidade do meio oscila de 18 a 85%, variando em função do poder de absorção do meio (BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001). A escassez de umidade dificulta a difusão de nutrientes causando a esporulação dos microrganismos, enquanto o excesso de umidade limita a transferência de oxigênio e aumenta o risco de contaminação por bactéria (GUERRA et al., 2003). Roukas (2000) estudou a influência do teor de umidade do figo, variando de 60 a 80%, na bioprodução de ácido cítrico por FES com *A. niger* ATCC 10577, e verificou que com 75% de umidade atingiu-se a produção máxima de 64 g de produto/kg de resíduo seco.

A habilidade dos microrganismos de crescer em um substrato sólido está relacionado com sua atividade de água requerida, capacidade de aderência e penetração no meio e habilidade em assimilar misturas de diferentes fontes de carbono, devido à natureza dos meios utilizados, que geralmente são complexos (GUERRA et al., 2003).

Bactérias, leveduras e fungos podem ser empregados no processo de FES. Entretanto são os fungos filamentosos os que melhor se adaptam a esta técnica, devido suas propriedades fisiológicas e seu crescimento em forma de hifa (MITCHELL, 1992). A hifa proporciona ao fungo filamentoso a força para penetrar no meio sólido. Além disso, sua habilidade em crescer em baixa atividade de água e alta pressão osmótica (alta concentração de sólidos solúveis) faz dos fungos agentes eficientes para bioconversão em meio sólido (GUERRA et al., 2003).

Apesar de fungos crescerem em meios sólidos, quando em condições ambientais desfavoráveis como: exaustão de nutrientes e água, pH e temperatura inadequados, o crescimento vegetativo dos mesmos é cessado, ocorrendo a formação de esporos, que são formas latentes metabolicamente inativas (CARLIE; WATKINSON, 1996). A fim de evitar a esporulação do fungo *Aspergillus niger* e, conseqüentemente, aumentar a produção de ácido cítrico por FES, alguns estudos têm sido realizados tais como: a aeração do meio com ar umedecido, para remover o calor gerado e manter a umidade do meio (LU; BROOKS; MADDOX, 1997; ROJAS et al., 1995; SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002), o ajuste do tamanho da partícula e do teor de umidade inicial do meio, a fim de garantir a difusão dos nutrientes (ROUKAS, 1999), e a otimização da concentração inicial de nutrientes, do pH e da temperatura (KIM et al., 2006; KUMAR et al., 2000b; LU; BROOKS; MADDOX, 1997; ROUKAS, 1999, 2000).

Algumas aplicações da fermentação em estado sólido, assim como os respectivos microrganismos e matérias-primas empregados estão apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Aplicações, microrganismos e substratos empregados na FES.

Produtos/ Processos	Microrganismo	Substrato
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Glicoamilase e xilanase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Bagaço de mandioca
Lipase	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu e complementos
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Aromas	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Borra de café
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikoroii</i>	Farelo de trigo
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar
Biodegradação da madeira	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Cavacos de eucalipto
Deslignificação	<i>Trichoderma ssp.</i>	Resíduo da produção de óleo de oliva
Destoxificação	<i>Aspergillus niger</i>	Borra de café
Enriquecimento nutricional de ração animal	<i>Penicillium decumbens</i>	Palha de milho

Fonte: PALMA (2003).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a viabilidade técnica de se empregar os resíduos das indústrias de suco de laranja e cervejeira como meios para a produção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido. Para tanto, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Preparar os resíduos de laranja e de cevada, a partir de suas características físicas originais, de forma a possibilitar sua utilização em um processo de fermentação em estado sólido;
- Verificar a capacidade do fungo filamentoso *Aspergillus niger* de se desenvolver nos resíduos mencionados;
- Avaliar a influência do tamanho de partícula, do teor de umidade e da proporção de metanol sobre o crescimento e a produção de ácido cítrico pelo fungo, empregando os referidos resíduos como meio de fermentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL), em Lorena - SP.

4.1 Preparo das matérias-primas

Os resíduos provenientes do processamento de suco de laranja (bagaço, semente, casca e resto da polpa) e de cerveja (bagaço de malte de cevada) foram doados pela indústria de suco Cutrale S.A. (Araraquara - SP) e pela Microcervejaria da Escola de Engenharia de Lorena, respectivamente, e o aspecto dos mesmos está apresentado nas Figuras 4.1 e 4.2.

4.1.1 Secagem

Anteriormente ao processo de secagem do resíduo de laranja, para seu uso nos ensaios de fermentação, este foi pré-moído em liquidificador semi-industrial (Filizola) para se obter partículas com dimensões aproximadas de 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm. Esta pré-moagem foi necessária porque, em um teste preliminar para secar este resíduo em sua forma original, foi verificado que o tempo de secagem era o dobro do previsto na literatura (KUMAR et al.,

2003a) e o material não secava de forma homogênea, em função da heterogeneidade da sua estrutura física. Tal procedimento não foi necessário para o resíduo de cevada, pois a estrutura original deste não apresentou o mesmo problema. Por outro lado, ao ser colocado o resíduo de cevada na estufa em bandejas contendo o material a aproximadamente 3,0 cm de altura, o tempo de secagem se prolongou a ponto de ocorrer o crescimento de fungos em sua superfície. Com isto, constatou-se, também, a necessidade de se estudar a altura do material para o processo de secagem.

Os resíduos foram secados em bandejas de alumínio (dimensão: 45x32 cm) a 60 °C (KUMAR et al., 2003a) até atingirem um teor de umidade compatível com o processo de moagem. Foram estudadas duas quantidades de resíduo colocado nas bandejas, sendo uma quantidade correspondente a uma altura de 0,5 cm de material e outra correspondente a uma altura de 1,0 cm de material. Na Figura 4.3 está apresentado um esquema que representa a distribuição dos resíduos nas bandejas, conforme mencionado acima. Este estudo foi realizado para cada resíduo separadamente.

As secagens foram acompanhadas por medição do teor de umidade. Para a altura de 0,5 cm foram retiradas amostras a cada 3 h nas primeiras 12 h e de hora em hora até o final do processo, e para a altura de 1,0 cm foram retiradas amostras a cada 3 h nas primeiras 24 h e de hora em hora até o final do processo.



Figura 4.1 Resíduo de laranja.



Figura 4.2 Resíduo de cevada.

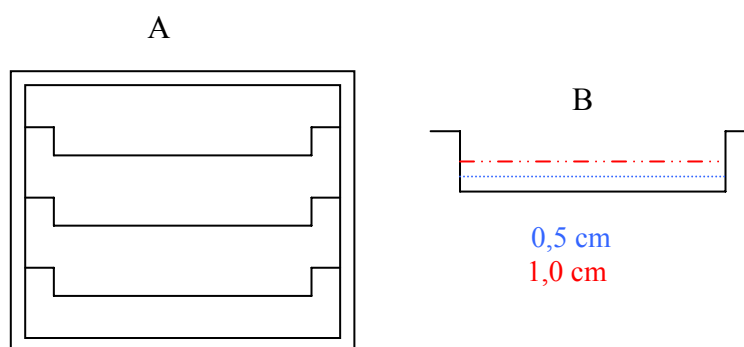


Figura 4.3 Disposição das bandejas na estufa (A) e alturas dos resíduos distribuídos em cada bandeja (B).

Após a secagem, os resíduos foram acondicionados em sacos plásticos e estocados em câmara fria, para a realização de todos os ensaios.

4.1.2 Ajuste de tamanho de partícula

Os resíduos de laranja e cevada foram submetidos ao processo de moagem utilizando um moinho de facas (Manesco & Ranieri). Em seguida, estes materiais foram peneirados em

peneiras (Granutest) acopladas a um agitador de peneiras (Fobras), a fim de se obter os tamanhos de partícula apresentados na Tabela 4.1, as quais correspondem aos valores definidos para o planejamento fatorial proposto para o estudo do processo, para cada um dos resíduos. Os níveis de tamanho estudados para o resíduo de cevada foram definidos em função do processamento cervejeiro, uma vez que, após a secagem, o maior tamanho de partícula obtido é de 0,72 mm. O resíduo de laranja, fornecido de forma integral pela indústria do processamento de suco, foi pré-moido para a secagem, conforme mencionado no item 4.1.1. Apesar disso, durante o processo de moagem, empregando-se uma peneira de 2,0 mm acoplada à saída do moinho de facas, o tamanho máximo de partícula obtido foi de 1,44 mm, fazendo com que este valor fosse o nível máximo de tamanho de partícula estudado, para este resíduo.

Tabela 4.1 Valores do tamanho de partícula dos resíduos de laranja e cevada correspondentes aos níveis definidos para o planejamento estatístico.

Resíduos	Tamanho da partícula (mm)		
	-1	0	+1
Laranja	0,38	0,92	1,44
Cevada	0,28	0,50	0,72

Nível superior: +1; Nível inferior: -1; Nível central: 0

4.1.3 Caracterização

Em um béquer de 250 mL foram pesados aproximadamente 5 g do resíduo seco e adicionados 50 mL de água destilada, sendo o mesmo agitado em *shaker* de movimento circular (New Brunswick Scientific) por 30 min a 250 rpm e 30 °C (ROUKAS, 1999). Em seguida, o conteúdo do béquer foi filtrado a vácuo em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi

então utilizado para a determinação dos açúcares solúveis, sendo testados três métodos, conforme apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Metodologias empregadas para a determinação dos açúcares solúveis redutores e açúcares solúveis totais dos resíduos de laranja e cevada.

Açúcares solúveis	Metodologia
Redutores	Método colorimétrico de Nelson (1944)
Totais	Método empregado por Molina (1995) associado ao método colorimétrico de Nelson (1944) – MI.
	Método colorimétrico de Dubois et al. (1956) – MII.
	Beer Analyzer DAS 500 (Anton-Paar).

Foram empregadas três metodologias, pois, como são resíduos diferentes, apresentam características e possivelmente interferentes diferentes.

No método colorimétrico de Nelson (1944) os glicídeos são aquecidos em meio alcalino e transformam-se em enodióis, que reduzem o íon cúprico a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz o arsênio-molibídico a óxido de molibidênio, de coloração azul, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcares redutores existentes na amostra. Para a realização do método construiu-se uma curva padrão (0,02 a 0,1 g/L) utilizando a glicose como açúcar de referência. Distribuiu-se 1 mL das amostras diluídas (de acordo com os limites da curva padrão) em cada tubo Folin-Wu. Foi preparada uma solução com os reagentes A + B (volumes pré-determinados) e adicionou-se 1 mL dessa solução aos tubos. Os tubos permaneceram em banho-maria fervente por 20 minutos, sendo então esfriados e adicionou-se em cada um 1 mL do reagente C. A composição dos reagentes A, B e C está apresentada em Anexo. O conteúdo dos tubos foi agitado para expulsar o dióxido de carbono formado. Completou-se o volume do tubo (25 mL) com água destilada e, após

homogeneização, fez-se a leitura da absorbância (espectrofotômetro Beckman Du 640B) da solução utilizando um comprimento de onda igual a 540 nm, tendo-se como referência o conteúdo de um tubo em que ao invés de amostra adicionou-se água destilada.

O método empregado por Molina (1995) consiste da hidrólise dos açúcares totais, adicionando-se à amostra 2 mL de HCl 2 N e incubando-se a mistura em banho-maria termostatizado a 60-70 °C por 15 min. Em seguida, neutraliza-se com 2 mL de NaOH 2 N. Os açúcares redutores foram dosados conforme o método de Nelson (1944).

O método de Dubois et al. (1956) consiste da determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados, incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. Para este método construiu-se uma curva padrão (0,02 a 0,1 g/L) utilizando a glicose como açúcar de referência. Foi adicionado 0,5 mL das amostras previamente diluídas (de acordo com os limites da curva padrão) em tubos de ensaio. Em seguida, acrescentaram-se aos tubos, 0,5 mL da solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram agitados e colocados em repouso à temperatura ambiente durante 20 min. Após este tempo, fez-se a leitura da absorbância (espectrofotômetro Beckman Du 640B) dos conteúdos dos tubos utilizando um comprimento de onda igual a 490 nm, tendo-se como referência o conteúdo de um tubo em que ao invés de amostra adicionou-se água destilada.

Os teores de açúcares totais foram determinados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490 nm, utilizando-se uma curva padrão de glicose.

O Beer Analyzer é um equipamento que mede a concentração de extrato aparente (sólidos solúveis), podendo ser uma estimativa da concentração de açúcares totais presentes nos resíduos.

4.2 Processo fermentativo

4.2.1 Fungo

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* NRRL3, proveniente do Northern Regional Research Laboratory (USA), foi utilizado em todos os ensaios de fermentação. Primeiramente foi cultivado em placas de Petri com ágar nutriente (1% glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne e 2% de ágar-ágar) a 30 °C por um período de oito dias. Em seguida foi repicado e mantido em ágar inclinado em tubos de ensaio (0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne e 2% de ágar-ágar) sob refrigeração, a 4 °C.

4.2.2 Preparo do inóculo

Uma suspensão de esporos não germinados, obtida de uma cultura cultivada em ágar inclinado, por um período de oito dias, a 30 °C, foi utilizada como inóculo. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de TWEEN 80 0,8% (v/v) ao tubo contendo a cultura esporulada e, após agitação, o conteúdo foi transferido para outro tubo esterilizado. Este procedimento foi repetido por duas vezes e a suspensão obtida foi agitada vigorosamente para a destruição de aglomerados de esporos. Após contagem dos esporos em câmara de Neubauer, procedeu-se a diluição da suspensão. Cada béquer de 250 mL, contendo meio sólido (item 4.2.3), foi inoculado com 1 mL da suspensão, a qual continha uma proporção inicial de aproximadamente 2×10^7 esporos/mL, de acordo com Kumar et al. (2003a).

4.2.3 Meio de fermentação

Para cada ensaio foi empregada uma massa de 5 g de resíduo seco. Os resíduos de laranja e cevada com tamanho de partícula ajustada, foram umedecidos com água destilada (pH=7,0) até atingirem o teor de umidade desejado e autoclavados a 121 °C por 30 min. Após resfriamento, foi adicionado metanol aos resíduos nas proporções definidas pelo planejamento estatístico. O material preparado desta forma correspondeu ao meio de fermentação.

4.2.4 Condições de fermentação

Os ensaios foram conduzidos em béquer de vidro de 250 mL, contendo meio sólido preparado conforme descrito no item 4.2.3. As fermentações foram realizadas em estufa (Olidfcz) a 30 °C, em estado estacionário. O número de frascos inoculados foi sempre igual ao número de amostras a serem retiradas. Foi retirada uma amostra por dia, sendo cada uma correspondente ao conteúdo total de um frasco. O tempo de fermentação foi de três dias para os testes preliminares e de seis dias para os ensaios do planejamento estatístico.

4.2.5 Ensaios preliminares de fermentação

Testes preliminares foram realizados com vistas a verificar se haveria crescimento do fungo nos resíduos, tanto por se tratar de uma linhagem diferente das citadas em trabalhos da

literatura quanto por se tratar de resíduos ainda não pesquisados para este fim. Visou-se também testar o sistema de fermentação definido, ou seja, massa de resíduo no frasco, vedação do frasco, distribuição dos frascos na estufa, necessidade de umedecimento, etc. Os testes foram realizados empregando-se tamanho de partícula, teor de umidade e porcentagem de metanol correspondentes aos valores do ponto central do planejamento fatorial (Tabelas 4.3 e 4.4, para os resíduos de laranja e cevada, respectivamente).

4.2.5.1 Teste de fermentação 1

Este primeiro ensaio de fermentação teve como objetivo verificar o comportamento do fungo nos resíduos em estudo. Foi realizado empregando-se como vedação do frasco de fermentação seis camadas de gaze (conforme ilustrado na Figura 4.4 A) e sem umedecimento do ambiente.

4.2.5.2 Avaliação dos teores de umidade após a esterilização e durante o tempo de incubação dos resíduos

Em função dos resultados obtidos no teste 1 de fermentação, foram estudados os possíveis processos envolvidos na perda de água por evaporação, tais como, vedação dos frascos, esterilização e tempo de incubação, para cada resíduo. Foram avaliados dois tipos de vedação do béquer:

- seis camadas de gaze – V1 (Figura 4.4 A).
- uma camada de algodão envolvida por duas camadas de gaze - V2 (Figura 4.4 B).

Para este experimento foram pesados 5 g de cada resíduo seco em béqueres de 250 mL, os quais tiveram o teor de umidade ajustado para 65%. Em seguida, os frascos foram tampados com os dois tipos de vedação citados anteriormente e autoclavados a 121 °C por 30 min. Foram preparados quatorze frascos de cada resíduo (sete com a vedação V1 e os outros sete com a vedação V2), sendo destinados dois para análise do teor de umidade após a esterilização e doze para avaliar a perda de umidade durante o período de incubação.

Para avaliar o efeito do tempo de incubação, os frascos foram colocados em estufa (Olidefcz) a 30 °C, sendo retirados dois frascos de cada resíduo com vedações diferentes a cada 24 h para análise do teor de umidade.

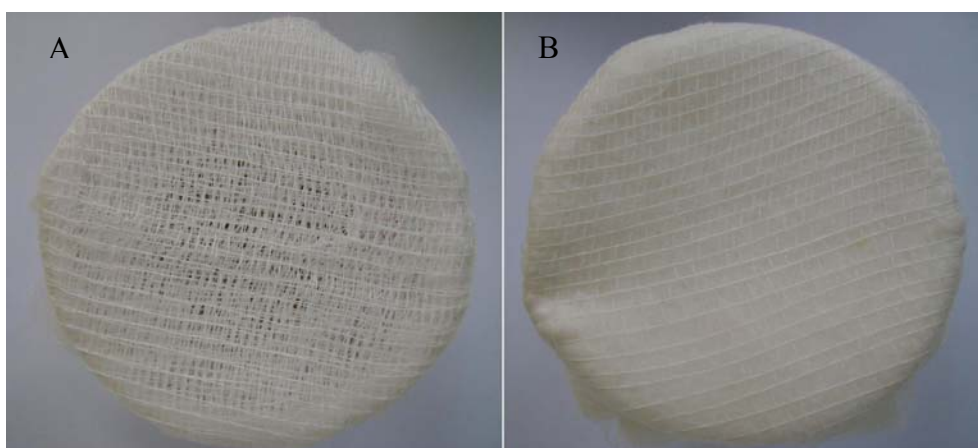


Figura 4.4 Vedação com gaze (A) e vedação com gaze e algodão (B).

4.2.5.3 Avaliação dos teores de umidade dos resíduos no período de incubação empregando umedecimento do ambiente

A partir dos resultados obtidos com os ensaios do item 4.2.5.2, foi estudado o perfil do teor de umidade durante o período de incubação com ambiente umedecido, para cada resíduo, empregando-se as mesmas condições descritas no item anterior, porém utilizando-se apenas a

vedação V1. A umidificação do ambiente correspondeu à colocação de uma placa de Petri contendo água destilada em cada bandeja dentro da estufa.

Para analisar o teor de umidade foi retirado um frasco de cada resíduo a cada 24 h.

4.2.5.4 Teste de fermentação 2

Em virtude dos resultados obtidos com os ensaios do item 4.2.5.3, realizou-se um segundo teste de fermentação utilizando a vedação com seis camadas de gaze (Figura 4.4 A) e umedecimento do ambiente com placas de Petri contendo água destilada.

4.2.5.5 Teste de fermentação 3

Conforme constatado no item anterior, o umedecimento do ambiente e a vedação com gaze não foram suficientes para evitar a perda de água causada pelo calor metabólico liberado durante o processo fermentativo. Tal fato conduziu à realização de um novo teste de fermentação (Teste 3). Neste experimento a vedação utilizada foi uma camada de algodão envolvida por duas camadas de papel alumínio, contendo uma abertura no meio para as trocas gasosas (Figura 4.5).



Figura 4.5 Vedação com papel alumínio.

4.2.6 Estudo das variáveis do processo

Foi avaliada a influência do tamanho de partícula, do teor de umidade e da porcentagem de metanol, assim como as possíveis interações entre eles, sobre o bioprocesso de fermentação cítrica em estado sólido a partir dos resíduos em questão. Este estudo foi feito de acordo com um planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central. Os níveis codificados e reais dos fatores estudados para os resíduos de laranja e cevada estão apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente. Na Tabela 4.5 está apresentada a matriz experimental dos planejamentos citados.

Tabela 4.3 Valores dos fatores estudados, de acordo com os níveis do planejamento fatorial completo 2^3 , para o resíduo de laranja.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tamanho da partícula (mm)	0,38	0,92	1,44
Teor de umidade (%)	50	65	80
Teor de metanol (g /100 g de meio)	3	5	7

Nível superior: +1; Nível inferior: -1; Nível central: 0

Tabela 4.4 Valores dos fatores estudados, de acordo com os níveis do planejamento fatorial completo 2^3 , para o resíduo de cevada.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tamanho da partícula (mm)	0,28	0,50	0,72
Teor de umidade (%)	50	65	80
Teor de metanol (g / 100 g de meio)	3	5	7

Nível superior: +1; Nível inferior: -1; Nível central: 0

Tabela 4.5 Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo.

Experimentos	Tamanho da partícula	Teor de umidade	Teor de metanol
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Para a análise estatística dos resultados foram utilizadas como variáveis resposta a produção de ácido cítrico, expressa pela quantidade de ácido cítrico produzida em relação à massa de resíduo seco (g ácido cítrico/ kg de resíduo seco) e o fator de conversão de substrato em produto, baseado no consumo de açúcar, (g/g).

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Determinação dos teores de umidade dos resíduos

Amostras de aproximadamente 1,0 g de cada resíduo foram colocadas em uma balança de secagem por ação de raios infravermelhos (Denver instrument IR-30). As amostras foram mantidas a 100 °C até se obter massa constante, e a umidade foi determinada pela diferença de massa antes e após o aquecimento, pelo próprio equipamento.

4.3.2 Extração dos açúcares e do produto

Em cada béquer retirado como amostra foram adicionados 50 mL de água destilada, e a mistura foi agitada em *shaker* (New Brunswick Scientific, Co) por 30 min a 250 rpm e 30 °C. Em seguida, o conteúdo do béquer foi filtrado a vácuo, e a fração líquida foi utilizada para determinação das concentrações de açúcares solúveis totais e de ácido cítrico.

4.3.3 Determinação da concentração de açúcares totais solúveis durante o processo fermentativo

A concentração de açúcares totais nos filtrados foi determinada pelo método de Dubois et al. (1956), empregando espectrofotômetro computadorizado (Beckman Du 640B).

4.3.4 Determinação da concentração de ácido cítrico

A concentração de ácido cítrico dos filtrados foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters, Milford, MA), empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45 °C, eluente solução de ácido sulfúrico 0,01 N, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pack C18 (Millipore) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana Hawp 0,45 µm (Millipore) e em seguida degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

4.3.5 Determinação da proporção de esporos

A contagem de esporos em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer (1/400 mm²) após a devida diluição da suspensão e foi expressa em esporos/mL.

4.4 Metodologia de análise dos resultados

4.4.1 Produção de ácido cítrico

A produção de ácido cítrico, expressa em g de ácido cítrico/ kg de resíduo seco, foi determinada pela Equação 4.1.

$$C = (P_f - P_i) / M_o \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde:

P_i e P_f correspondem às massas inicial e final de ácido cítrico (g)

M_o corresponde à massa inicial de resíduo seco (kg)

As massas de produto foram obtidas multiplicando-se as concentrações (em g/L) de ácido cítrico dos filtrados por 0,05 L, que é o volume de filtrado.

4.4.2 Fator de conversão de substrato em produto

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), expresso em g de ácido cítrico/ g de açúcar consumido, foi determinado pela Equação 4.2.

$$Y_{P/S} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad \text{(Equação 4.2)}$$

Onde:

P_i e P_f correspondem às massas inicial e final de ácido cítrico (g)

S_i e S_f correspondem às massas inicial e final de substrato (g)

As massas de substrato foram obtidas multiplicando-se as concentrações (em g/L) de açúcares solúveis dos filtrados por 0,05 L, que é o volume de filtrado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Secagem das matérias-primas

Os perfis de teor de umidade dos resíduos de laranja e cevada para as alturas de 0,5 cm e 1,0 cm estão representados nas Figuras 5.1 a 5.4. Os valores correspondem à média das massas de resíduo das 3 bandejas.

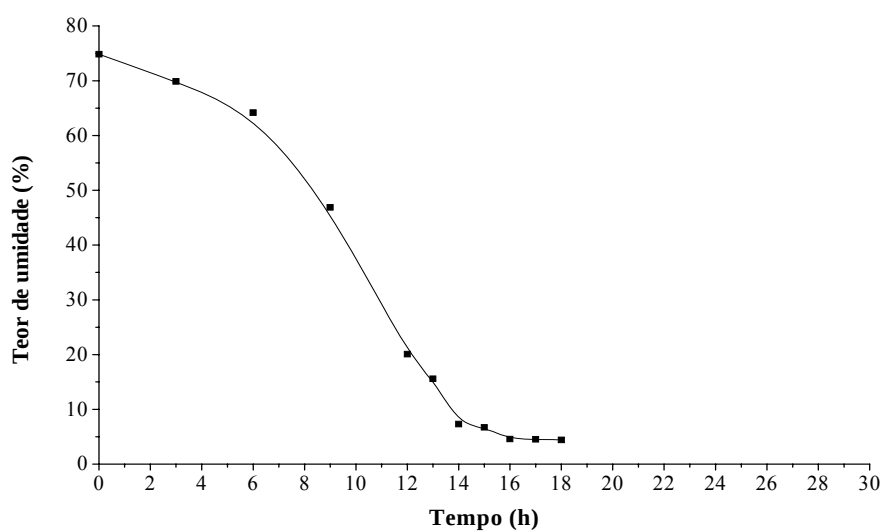


Figura 5.1 Perfil da secagem do resíduo de laranja empregando a altura de 0,5 cm.

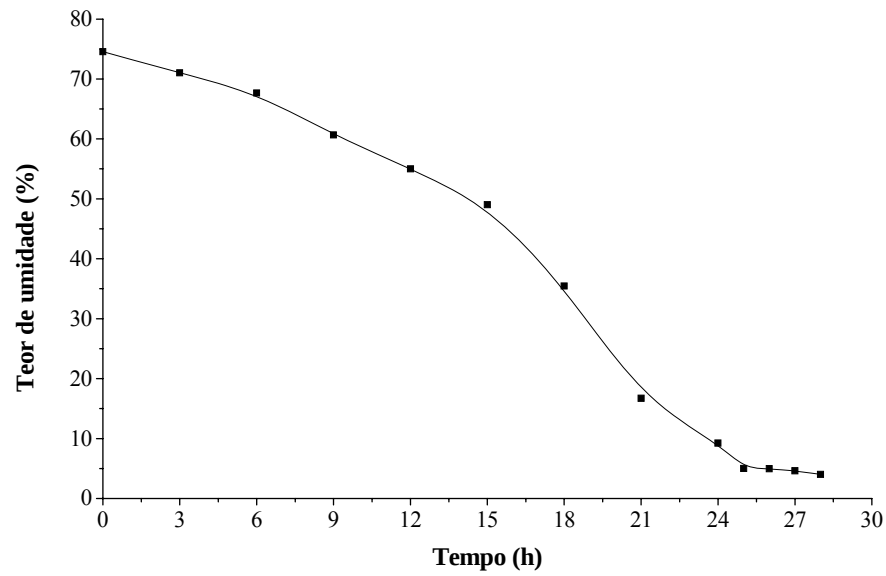


Figura 5.2 Perfil da secagem do resíduo de laranja empregando a altura de 1,0 cm.

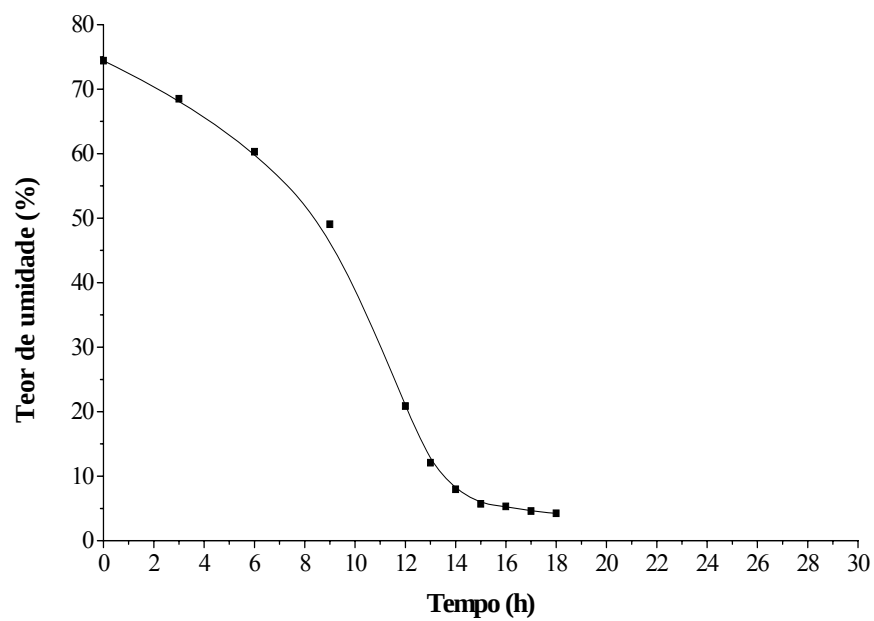


Figura 5.3 Perfil da secagem do resíduo cevada empregando a altura de 0,5 cm.

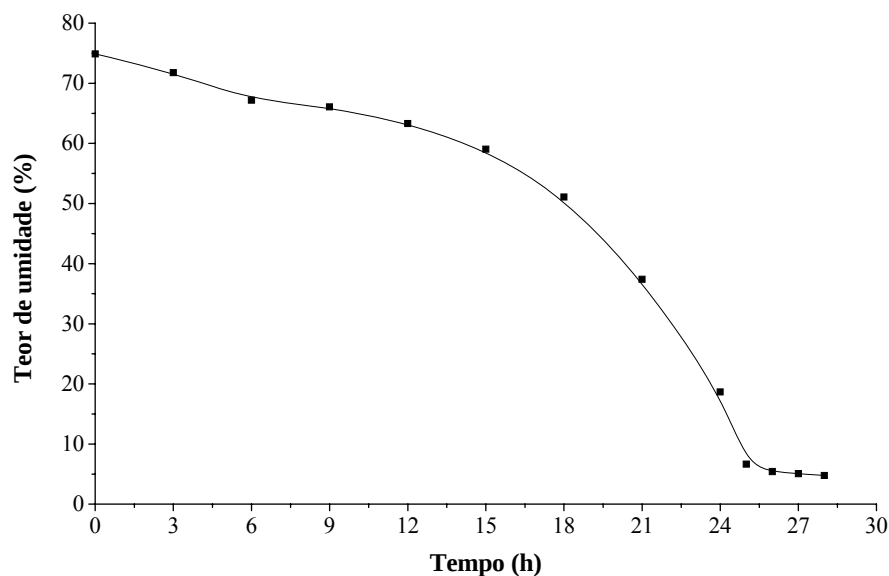


Figura 5.4 Perfil da secagem do resíduo cevada empregando a altura de 1,0 cm.

A partir dos gráficos apresentados, constata-se que o perfil de variação da umidade durante o processo de secagem dos resíduos de laranja e cevada com altura de 0,5 cm e 1,0 cm são semelhantes. Este fato indica que a pré-moagem do resíduo de laranja foi eficiente para resolver o problema da heterogeneidade do mesmo, obtendo-se um material seco homogêneo, para a moagem final. Além disso, não houve problema de contaminação por fungos durante o processo de secagem, para nenhum dos dois resíduos. Foi possível observar, para ambos os resíduos, que a partir de um teor de umidade em torno de 4-5% a evaporação não é mais significativa. Como a moagem para o ajuste de tamanho de partícula pode ser realizada com o material contendo um teor de umidade nesta faixa, o processo de secagem foi finalizado no tempo correspondente a esta faixa de umidade.

Analisando-se os gráficos das Figuras 5.1 a 5.4 verifica-se que os tempos necessários para secar os resíduos de laranja e cevada foram de 16 h para a altura de 0,5 cm e de 26 h para a de 1,0 cm. Como a quantidade de resíduo seco obtido a 1,0 cm é o dobro da quantidade obtida a 0,5 cm, concluiu-se que é mais conveniente secar a uma altura de 1,0 cm, uma vez

que se obtém mais resíduo seco em menos tempo em relação à altura de 0,5 cm. Exemplificando, ao secar o resíduo a uma altura de 1,0 cm obtém-se 220 g de material seco em 26 horas de processo. Para se obter a mesma quantidade de material secando-se a 0,5 cm seriam necessárias duas secagens de 16 horas, ou seja, 32 horas de funcionamento da estufa. Além de maior consumo de energia, seria gasto maior tempo de mão-de-obra.

5.2 Caracterização dos resíduos

As concentrações de açúcares solúveis totais e redutores dos resíduos de laranja e cevada determinadas empregando-se as diferentes metodologias estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Concentrações de açúcares solúveis, totais e redutores, dos resíduos de laranja e cevada determinadas por diferentes metodologias.

Metodologia	Concentração (g/L) *		
	Laranja	Cevada	
Nelson (1944)	20,31	5,96	Açúcares Redutores
Molina (1995) + Nelson (1944) - MI	16,44	4,63	Açúcares Totais
Dubois et al. (1956)- MII	33,85	17,70	
Beer Analyzer	43,60	22,90	

*Concentração da fração líquida após extração dos açúcares (item 4.13).

Pelos dados desta tabela constata-se que, para ambos os resíduos, a quantificação de açúcares totais pelo método MII resultou valores maiores que a concentração de açúcares redutores. Tal resultado era esperado, pois a quantidade de açúcar redutor é uma parcela dos açúcares totais. Porém, em relação ao obtido pelo equipamento Beer Analyzer, estes valores

são inferiores, o que se deve ao fato de o aparelho medir sólidos solúveis, podendo haver sólidos solúveis que não são açúcares. Pelo método MI foram obtidas concentrações de açúcares totais inferiores às encontradas para açúcares redutores, descartando-se, portanto, o emprego deste método. Neste caso, pode estar havendo degradação de açúcares pelos reagentes e/ou condições de análise pelo método. Assim, como a concentração de açúcares totais encontrada pelo método MII é coerente com a quantidade de açúcares redutores e próxima à encontrada pelo Beer Analyzer, concluiu-se que este método (MII) é o mais adequado para dosar os açúcares solúveis totais presentes nos resíduos em estudo.

A quantidade de açúcares totais obtida para o resíduo de laranja (33,85%) está coerente com a caracterização feita por Dakhmouche, Aoulmi e Bennamoun (2005), que encontraram 44,6% para o resíduo de laranja.

5.3 Ajuste do tamanho de partícula

Os aspectos dos resíduos de laranja e cevada, após serem submetidos ao processo de moagem e peneiramento, estão ilustrados nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente.

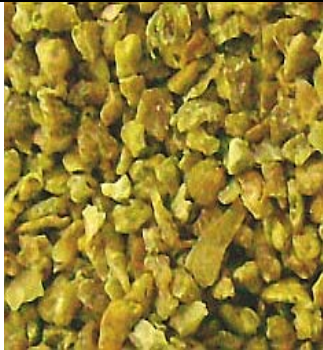
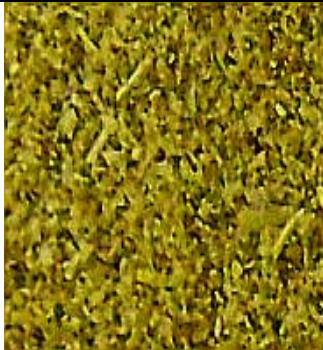
		
Tamanho médio da partícula: 1,44 mm	Tamanho médio da partícula: 0,92 mm	Tamanho médio da partícula: 0,38 mm

Figura 5.5 Aspecto do resíduo de laranja após moagem e peneiramento.

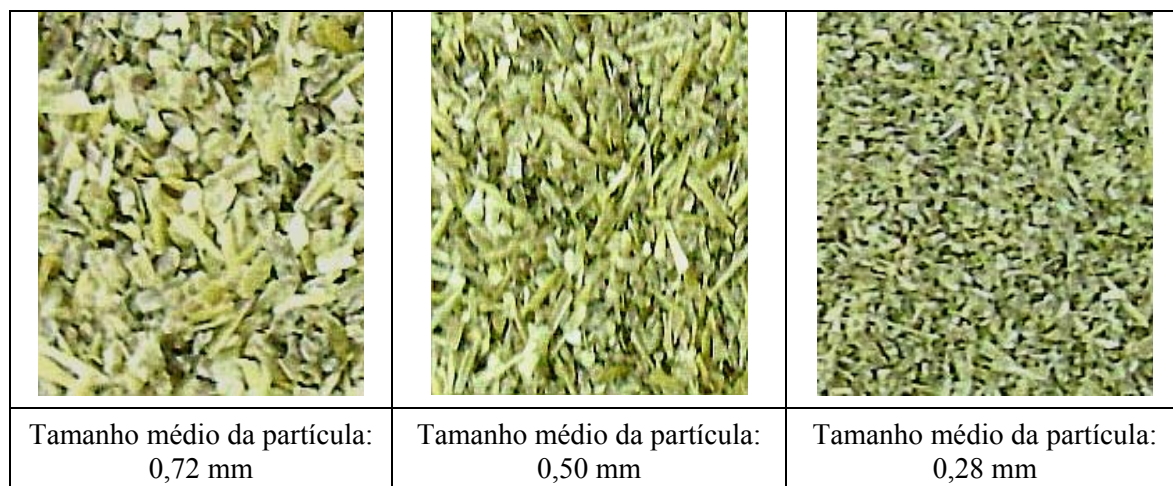


Figura 5.6 Aspecto do resíduo de cevada após moagem e peneiramento.

Observando-se estas figuras nota-se que as faixas de tamanho de partícula selecionadas, tanto para o resíduo de laranja como para o de cevada, apresentaram uma considerável variação da estrutura da partícula, permitindo avaliar a influência desta variável independente no processo de fermentação cítrica em estado sólido. Noutras palavras, assumiu-se que a diferença alcançada entre os três tamanhos médios de partícula era suficiente para testar a influência desta variável sobre o processo em estudo. Os tamanhos de partícula empregados em trabalhos encontrados na literatura variam de 0,6 a 5 mm. Sojaosadati e Babaeipour (2002) empregaram tamanho de partícula na faixa de 0,6 a 2,36 mm para a polpa de maçã, e Roukas (2000) na faixa de 3 a 5 mm para o figo.

5.4 Testes de fermentação

5.4.1 Teste de fermentação 1

Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão apresentados os aspectos do meio durante a fermentação referente ao teste 1 dos resíduos de laranja e cevada, respectivamente.

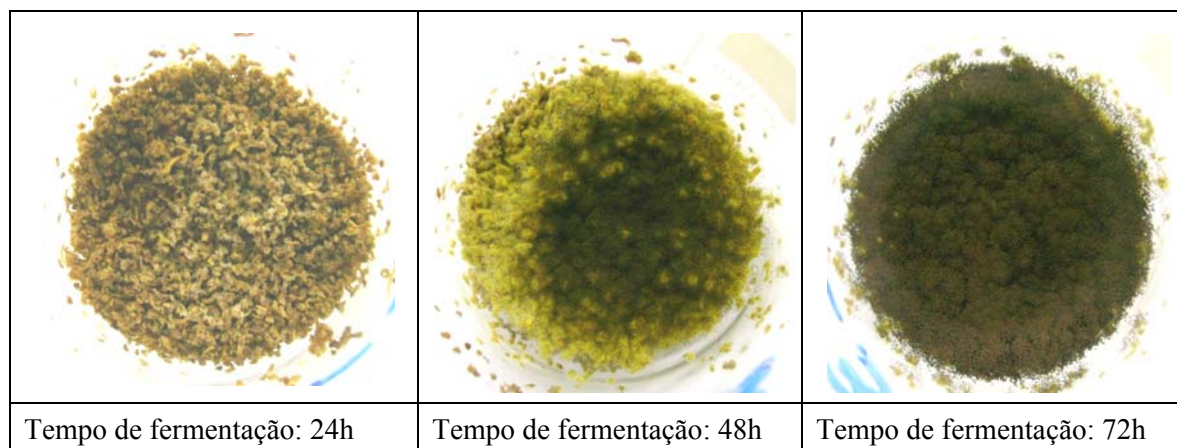


Figura 5.7 Aspectos do meio durante a fermentação teste 1 do resíduo de laranja.

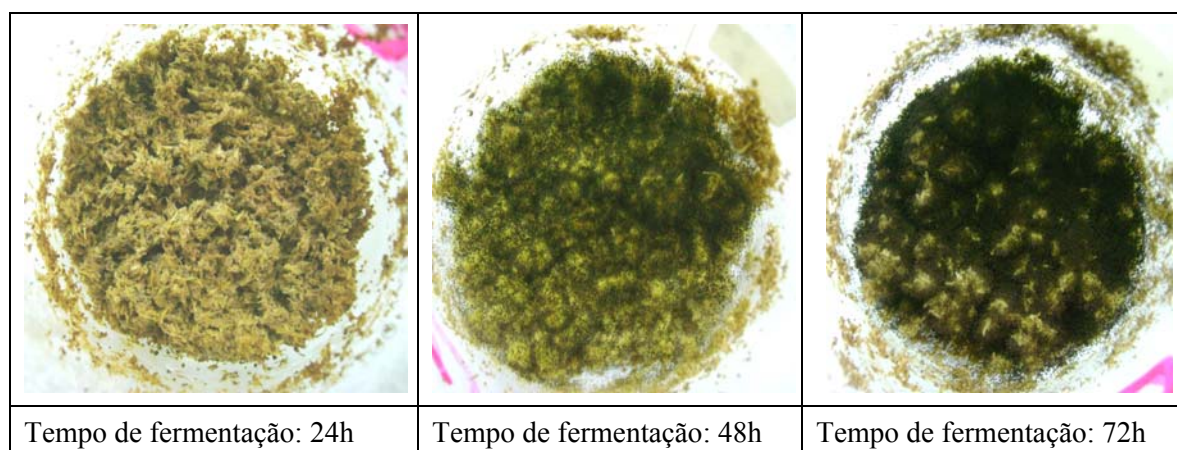


Figura 5.8 Aspectos do meio durante a fermentação teste 1 do resíduo de cevada.

Analisando-se visualmente os meios foi possível constatar que o fungo estava em processo de esporulação na superfície dos mesmos nas primeiras 48 h de fermentação. Esse fenômeno é comum, na medida em que as condições do meio se tornam desfavoráveis. Foi possível observar o aspecto ressecado dos resíduos, que era mais evidente a cada 24 h de fermentação. Em função do ocorrido, foi medido o teor de umidade das amostras, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 1.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)	
	Laranja	Cevada
0	65,00	65,00
24	46,70	45,00
48	38,79	38,57
72	28,31	28,38

Com os valores do teor de umidade ficou comprovada a evaporação, já nas primeiras 24 h de fermentação, em ambos os resíduos, ocasionando escassez de água no meio, a qual pode ter levado à formação dos esporos. Este comportamento foi relatado por Holker e Lenz (2005) em sua revisão sobre fermentação em estado sólido.

Devido ao problema encontrado, a fermentação foi interrompida no tempo de 72 h. Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados obtidos de produção de ácido e consumo de substrato durante o período mencionado.

Tabela 5.3 Consumo de açúcares totais, produção de ácido cítrico e fator de conversão de substrato em produto durante o teste de fermentação 1.

Resíduo	Tempo (h)	Consumo de açúcar (g)	Consumo de açúcar (%)	Ácido cítrico (g/kg)	$Y_{P/S}$ (g/g)
Laranja	24	27,8	8,7	-	-
	48	67,5	21,2	5,0	0,07
	72	68,6	27,6	3,7	0,05
Cevada	24	28,1	20,8	-	-
	48	62,2	46,0	5,3	0,08
	72	65,5	48,4	4,1	0,06

Constatou-se que, apesar do baixo teor de umidade do meio de fermentação, o fungo foi capaz de produzir ácido cítrico a partir de ambos os resíduos, porém, em proporções

nitidamente inferiores às encontradas em outros trabalhos da literatura, as quais variam de 96 a 264 g/kg de resíduo seco (KUMAR et al., 2003a; KUMAR et al., 2003b; ROUKAS, 1999, 2000; VANDENBERGHE et al., 2000; SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002). Nota-se, ainda, uma semelhança entre os resíduos em relação à capacidade do fungo de consumir e converter substrato em produto, nos mesmos, em função dos valores de $Y_{P/S}$ obtidos.

5.4.2 Influência da esterilização e do tempo de incubação sobre o teor de umidade dos meios

A fim de se verificar a(s) causa(s) do ressecamento do meio foi avaliado o efeito da esterilização e testadas duas formas de se vedar o frasco. Os frascos, com vedações diferentes, foram incubados para se avaliar o teor de umidade em função do tempo.

Os teores de umidade dos meios, com vedações dos frascos V1 (seis camadas de gaze) e V2 (duas camadas de gaze e uma de algodão), após serem autoclavados, estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Teor de umidade dos resíduos após esterilização, em frascos com as vedações V1 e V2.

Resíduo	Teor de umidade (%)
Laranja-V1	65,10
Laranja-V2	65,02
Cevada-V1	64,97
Cevada-V2	64,99

Analisando estes resultados conclui-se que o processo de esterilização não interfere no teor de umidade dos resíduos ajustados para a fermentação, pois, mesmo empregando vedações e resíduos diferentes o teor de umidade de ambos os meios permaneceu inalterado em relação ao valor ajustado antes da autoclavagem.

Os valores do teor de umidade dos resíduos de laranja e cevada, ambos com vedações dos frascos V1 e V2, durante período de incubação, estão apresentados na Tabela 5.5.

A partir destes dados, observa-se uma diminuição gradativa do teor de umidade de aproximadamente 1% a cada dia, para ambos os resíduos e vedações. Isto evidencia que o fator tempo de incubação influencia no processo de evaporação da água presente no meio. Porém, é possível observar que no meio inoculado (Tabela 5.2) a perda de umidade foi nitidamente mais acentuada, sendo que em 72 h de fermentação a umidade do meio foi reduzida pela metade em relação ao início, fato este que pode ser atribuído ao calor gerado pelo metabolismo microbiano.

Tabela 5.5 Teor de umidade dos resíduos durante o período de incubação, em frascos com as vedações V1 e V2.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)			
	Laranja-V1	Laranja-V2	Cevada-V1	Cevada-V2
0	65,00	65,00	65,00	65,00
24	64,10	64,26	64,11	64,08
48	63,14	63,30	63,05	63,31
72	62,03	62,10	62,24	62,15
96	61,74	61,90	61,06	61,10
120	61,24	61,77	60,69	60,98
144	60,80	60,80	60,45	60,54

Avaliando-se os resultados apresentados nas Tabelas 5.4 e 5.5, observa-se que os tipos de vedação empregados não afetaram os teores de umidade, tanto em relação à esterilização como em relação ao período de incubação, sugerindo que o fator vedação não influenciou na

secagem do meio, durante o procedimento experimental de fermentação referente ao teste 1 (Tabela 5.2).

5.4.3 Influência da umidificação do ambiente sobre os teores de umidade dos meios durante a incubação

Uma vez que o período de incubação influenciou na perda de água, procurou-se, para evitar o problema, umidificar o ambiente da estufa com água contida em Placa de Petri.

Os teores de umidade dos resíduos durante o período de incubação empregando-se umedecimento do ambiente estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 Teor de umidade dos resíduos, durante o período de incubação, em frascos com a vedação V1.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)	
	Laranja	Cevada
0	65,00	65,00
24	65,00	64,99
48	65,99	64,98
72	64,98	65,98
96	64,98	65,98
120	65,97	64,97
144	64,97	64,96

Analisando os dados apresentados, verifica-se que o processo de umedecimento utilizado foi eficaz, uma vez que os teores de umidade de ambos os resíduos permaneceram

praticamente constantes durante todo o período de incubação. Assim, esta técnica foi empregada no teste de fermentação 2.

5.4.4 Teste de fermentação 2

Considerando que o problema de perda de umidade foi contornado com a umidificação do ambiente, procedeu-se a um segundo teste de fermentação, visando estabelecer as condições para realização dos ensaios do planejamento.

O aspecto dos meios, durante o teste de fermentação 2 dos resíduos de laranja e cevada, no qual a vedação do frasco utilizada foi a de seis camadas de gaze, com umedecimento do ambiente, está apresentado nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente. Verifica-se intensa esporulação com 48 h, para os dois resíduos, semelhante ao ocorrido no teste 1 (Figuras 5.7 e 5.8).

A partir dos teores de umidade apresentados pelos resíduos durante a fermentação (Tabela 5.7), verifica-se a ocorrência de evaporação da água já nas primeiras 24 h. Este comportamento, embora tenha ocorrido com menor intensidade, foi similar ao ocorrido no teste de fermentação 1, permitindo concluir que o umedecimento do ambiente colocando-se placas de Petri com água na estufa foi insuficiente para manter a umidade do meio durante a fermentação, não sendo possível impedir a perda de água ocasionada pelo calor liberado em função da atividade metabólica do fungo.

Em virtude da perda de umidade verificada no teste 2, foi realizado um outro teste de fermentação empregando-se uma vedação com papel alumínio e algodão (item 4.2.5.5).

Tabela 5.7 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 2.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)	
	Laranja	Cevada
0	65,00	65,00
24	50,67	51,32
48	41,34	42,50
72	30,50	33,41

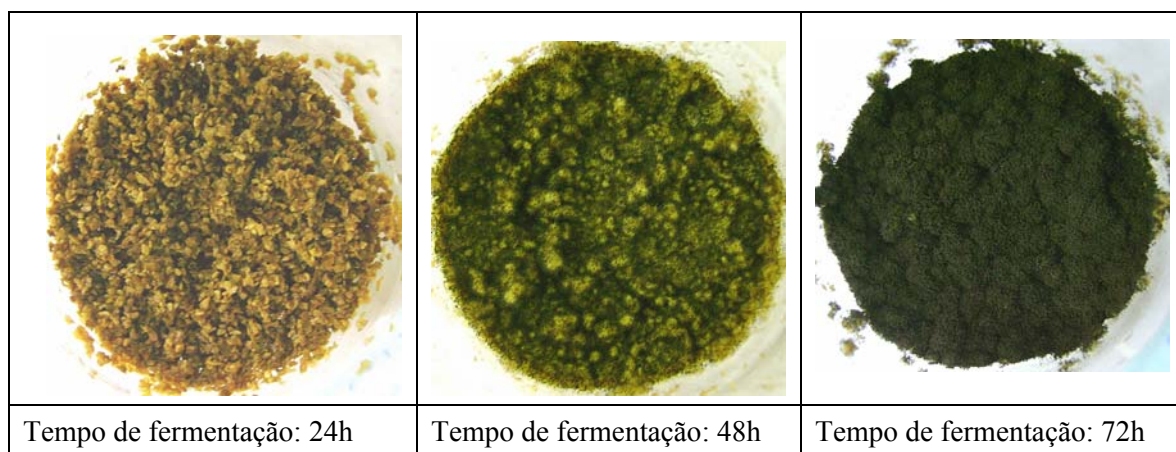


Figura 5.9 Aspectos do meio durante a fermentação teste 2 do resíduo de laranja.

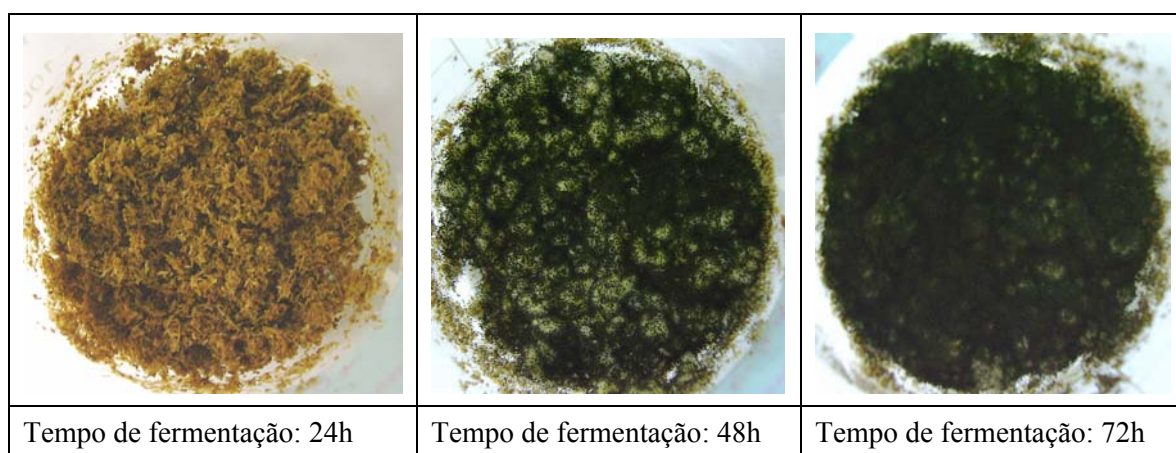


Figura 5.10 Aspectos do meio durante a fermentação teste 2 do resíduo de cevada.

5.4.5 Teste de fermentação 3

O aspecto dos meios, em decorrência do crescimento do fungo nos resíduos de laranja e cevada, durante o processo de fermentação empregando-se a vedação de papel alumínio com algodão e umidificação do ambiente da estufa com água em Placa de Petri, está ilustrado nas Figuras 5.11 e 5.12, respectivamente.



Figura 5.11 Aspectos do meio durante a fermentação teste 3 do resíduo de laranja.

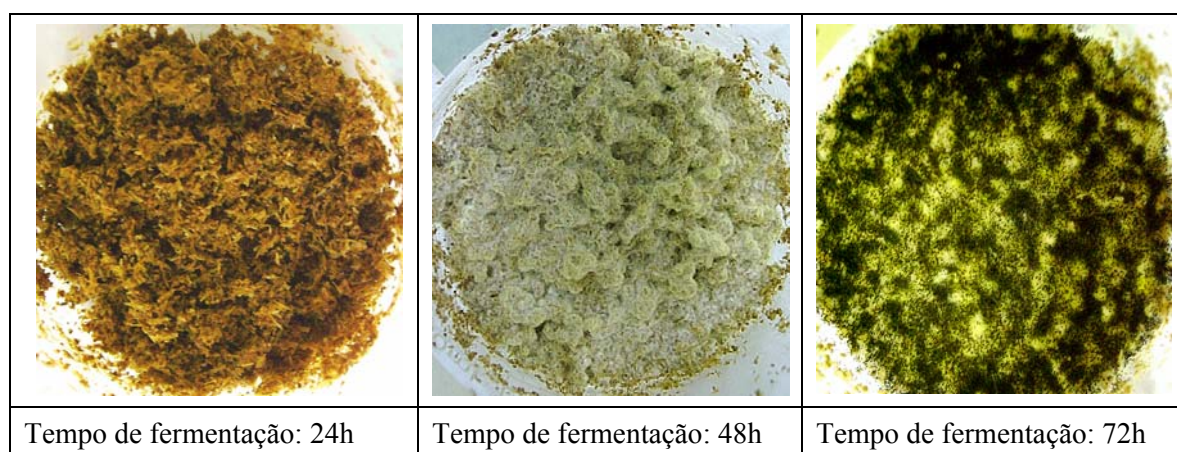


Figura 5.12 Aspectos do meio durante a fermentação teste 3 do resíduo de cevada.

Analisando-se os aspectos do meio nas figuras mencionadas constata-se o crescimento do fungo *A. niger* em sua forma vegetativa no período de tempo até 48 h, sendo que o

processo de esporulação se iniciou entre 48 e 72 h, possivelmente devido à exaustão de nutrientes do meio, e não à escassez de água, conforme observado nos testes 1 e 2. Esta hipótese pode ser confirmada pelos dados da Tabela 5.8, que apresenta os teores de umidade em função do tempo para estes ensaios. Neste caso, a vedação empregada conteve a perda de água, contornando-se os problemas observados anteriormente. Assim, nos ensaios de fermentação subseqüentes foi empregada esta forma de vedação dos frascos.

Tabela 5.8 Teor de umidade das amostras durante o período de fermentação do teste 3.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)	
	Resíduo	
	Laranja	Cevada
0	65,00	65,00
24	64,86	64,84
48	64,78	64,83
72	64,80	64,81

Este primeiro conjunto de experimentos, denominados ensaios preliminares, permitiu inferir que o fungo filamentoso *Aspergillus niger* NRRL3 é capaz de se desenvolver nos meios preparados com os resíduos de laranja e cevada, resíduos estes que ainda não foram avaliados com a finalidade de ser empregados para a FES. Uma vez que não foi utilizado nenhum tipo de tratamento específico para remoção de inibidores, pode-se considerar que tais resíduos não apresentam substâncias que impeçam o crescimento do referido fungo.

5.5 Influência do tamanho da partícula, do teor de umidade e da porcentagem de metanol na produção de ácido cítrico

A fim de avaliar a influência do tamanho de partícula (laranja: 0,38 a 1,44 mm e cevada: 0,28 a 0,72 mm), teor de umidade (50 a 80%) e porcentagem de metanol (3 a 7%) sobre os

parâmetros da fermentação: produção de ácido cítrico e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, para cada resíduo. As quantidades de substrato e de produto, por quilograma de resíduo seco, em função do tempo de todos os ensaios, para ambos os resíduos, estão apresentados em forma de gráfico nas Figuras 5.13 e 5.14.

A partir dos perfis apresentados, constata-se que o resíduo de laranja e o de cevada apresentam comportamentos semelhantes nas diferentes condições de fermentação. Em ambos os casos, o substrato é consumido acentuadamente após as primeiras 24 h, podendo o período inicial (de 0 a 24 h) ser considerado como a fase lag de crescimento. A máxima produção de ácido cítrico ocorreu no período de 2 a 4 dias (dependendo das condições experimentais) para o resíduo de cevada (Figura 5.14) e 2 dias para o resíduo de laranja, exceto o ensaio E3 (Figura 5.13). Em todos os casos houve diminuição da quantidade de produto no meio, apesar de estar havendo consumo de substrato. Este fato também foi observado por Roukas (1999) e Roukas (2000), os quais o atribuíram ao decréscimo da atividade do sistema enzimático responsável pela produção de ácido cítrico. Isto também pode ser atribuído ao abaixamento do pH durante o processo fermentativo, tornando-se este inadequado para a atividade do fungo e fazendo com que o mesmo necessitasse metabolizar o ácido cítrico como mecanismo de defesa, ou seja, para aumentar o pH.

As Tabelas 5.9 e 5.10 apresentam os níveis das variáveis independentes e as respostas avaliadas dos resíduos de laranja e cevada, respectivamente. Os valores constantes nas referidas Tabelas correspondem aos valores máximos dos parâmetros fermentativos obtidos para cada ensaio (Figuras 5.13 e 5.14).

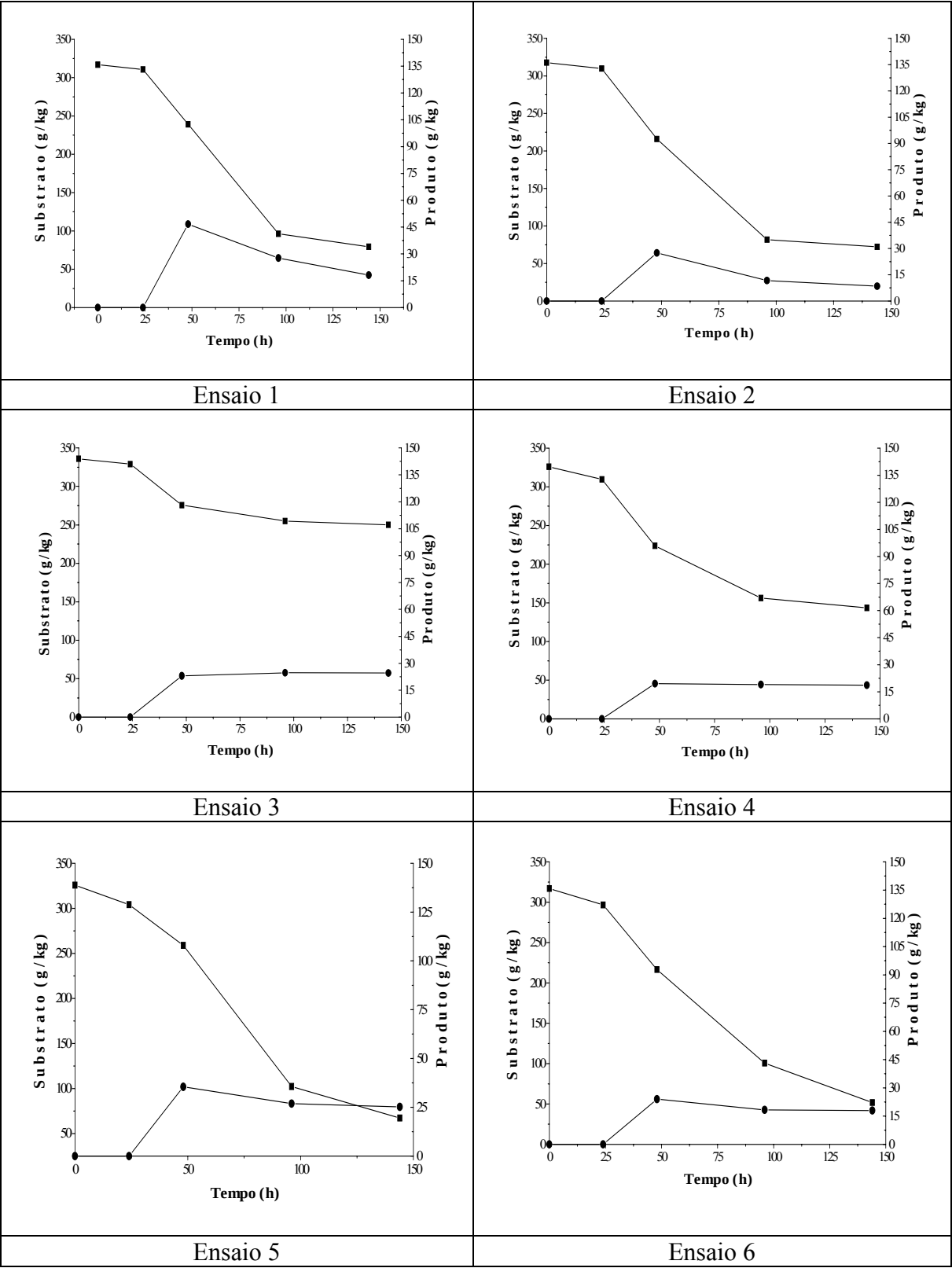


Figura 5.13 continua...

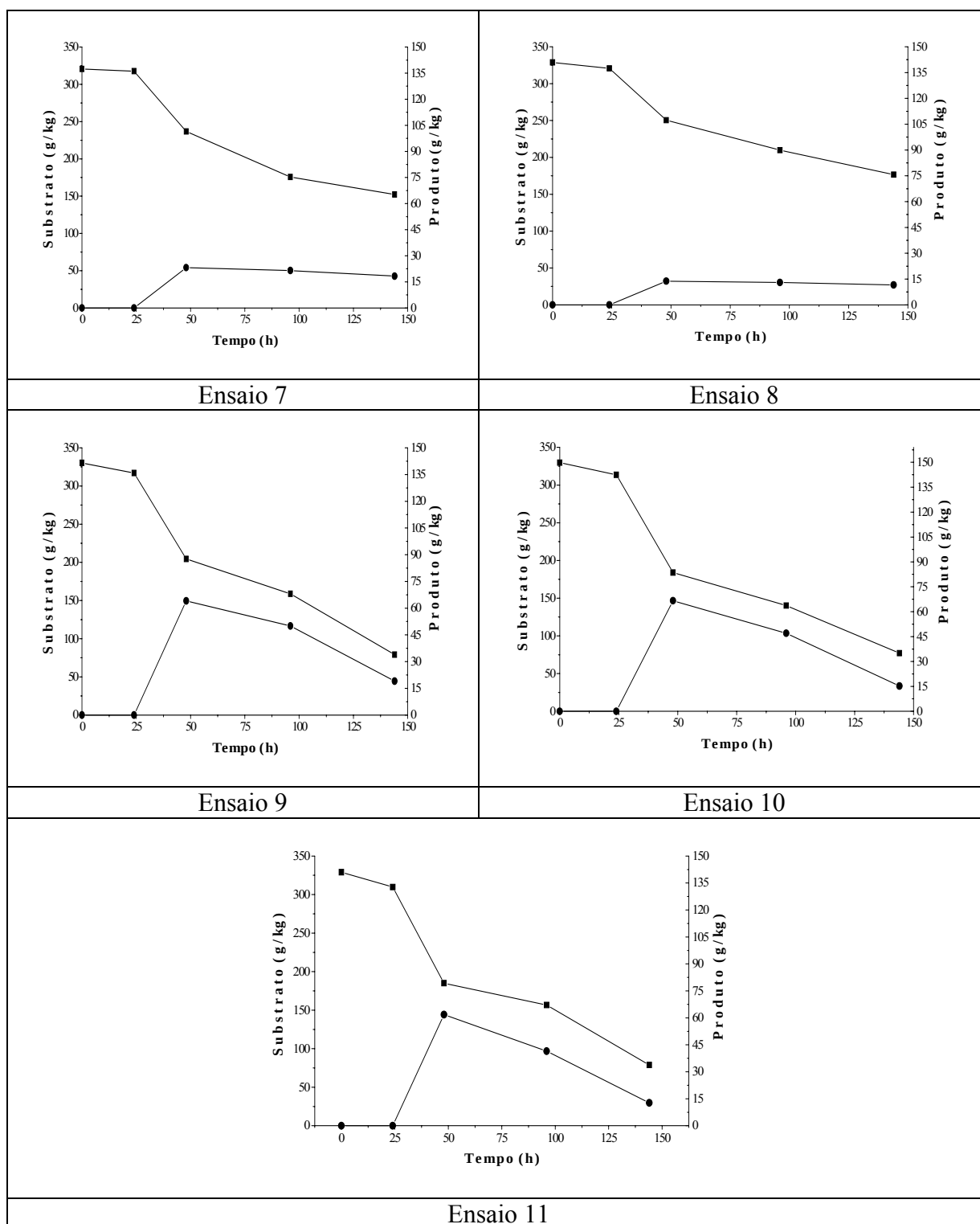


Figura 5.13 Variação da quantidade de substrato e de produto, por quilograma de resíduo seco, durante as FES, referente aos ensaios do planejamento, para o resíduo de laranja.

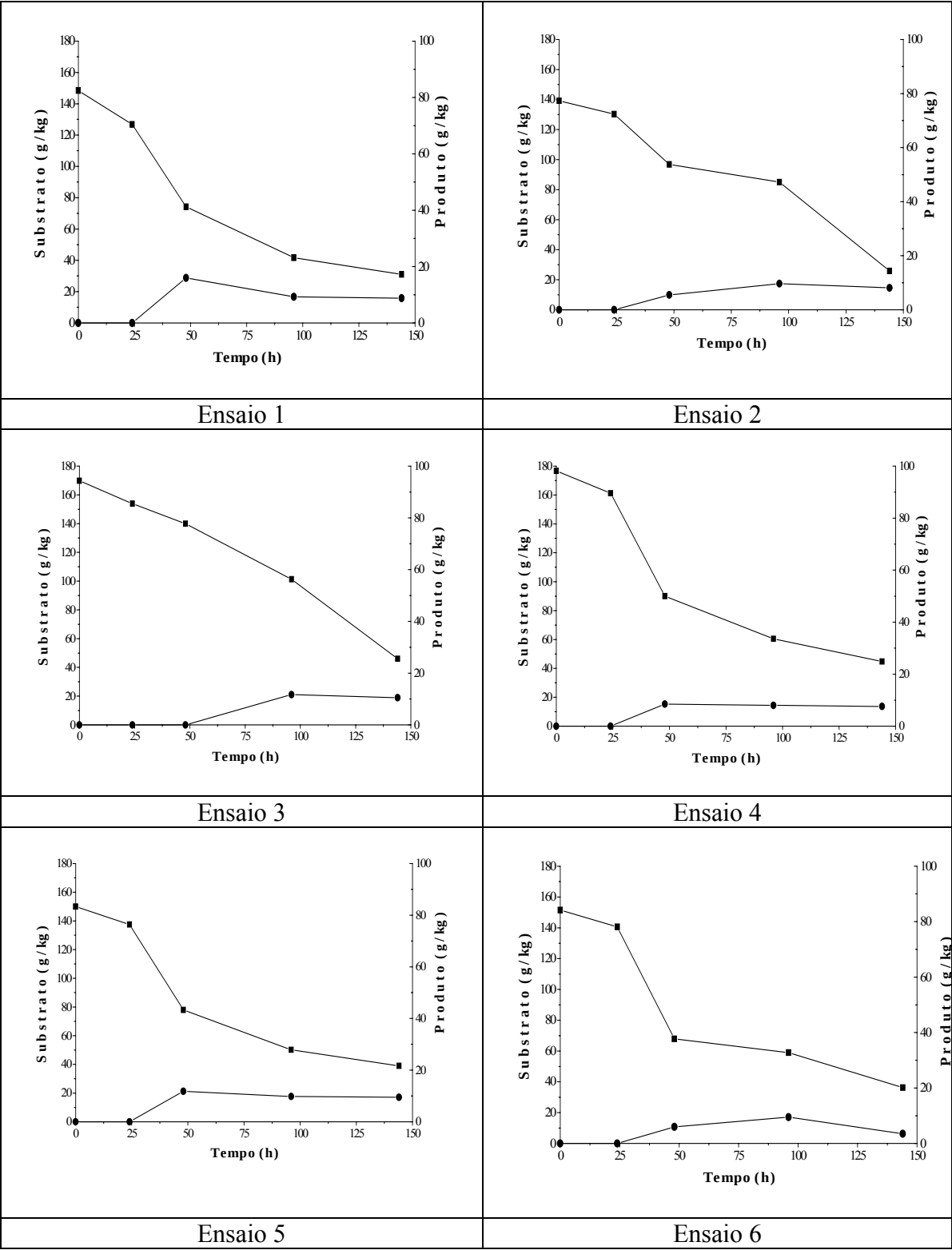


Figura 5.14 continua...

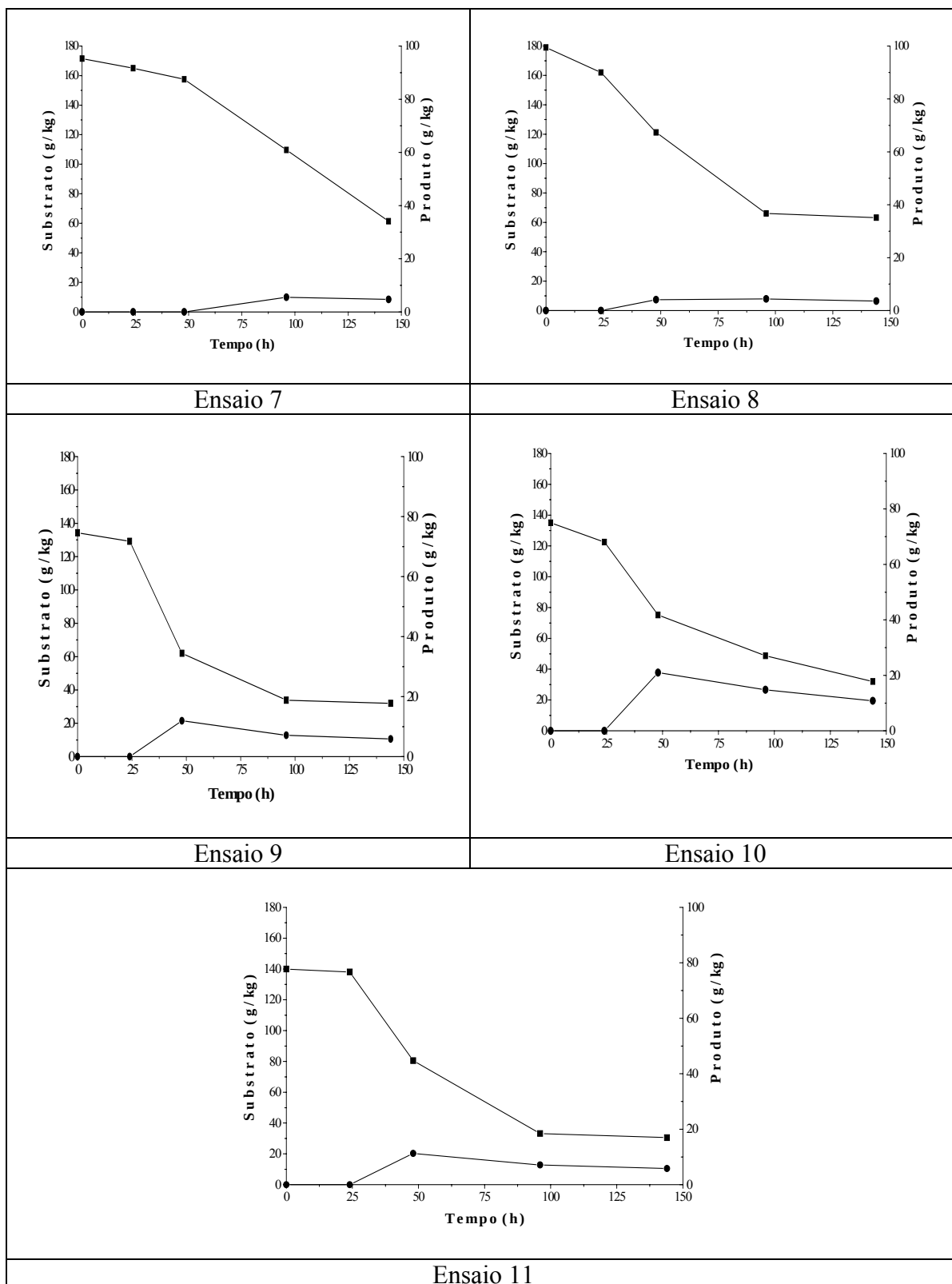


Figura 5.14 Variação da quantidade de substrato e de produto, por quilograma de resíduo seco, durante as FES, referente aos ensaios do planejamento, para o resíduo de cevada.

Em relação aos resultados obtidos nos diferentes resíduos, verifica-se que na laranja houve maior produção de ácido cítrico, o que pode ter ocorrido devido à maior quantidade de substrato existente neste resíduo e ao fato deste meio ser mais propício ao crescimento do fungo e à conversão de substrato em produto que o resíduo de cevada. Roukas (2000) avaliou a produção de ácido cítrico por FES a partir de figo, obtendo 96 g de ácido / kg de resíduo seco e $Y_{P/S}$ de 0,11 (g/g). As condições empregadas foram: 6% de metanol, 75% de umidade, tamanho de partícula de 3-5 mm, temperatura de 30 °C e pH inicial do meio igual a 7,0. Kumar et al. (2003a), empregando *A. niger* DS1, obtiveram 113 g de ácido / kg de resíduo seco e $Y_{P/S}$ de 0,54 g/g com o resíduo de abacaxi e 107 g de ácido / kg de resíduo seco e $Y_{P/S}$ de 0,46 g/g com mistura de frutas como meios de fermentação, ambos com 70% de umidade e 4% de metanol. Neste sentido, é importante salientar que os resultados obtidos no presente trabalho, em termos quantitativos, com o resíduo laranja, são promissores em relação aos encontrados na literatura, enfocando FES em frasco. No entanto, o potencial do resíduo de cevada não pode ser descartado, uma vez que o meio ainda apresenta açúcar solúvel disponível.

O perfil de variação da quantidade de substrato em função do tempo, para os dois resíduos e para a grande maioria das condições de fermentação empregadas sugere que tanto o consumo de substrato quanto a formação de produto podem ser melhorados adequando-se determinadas condições do processo, como, por exemplo, o controle do pH, em função das considerações anteriores. Além disso, fatores como suplementação nutricional, relação carbono/nitrogênio, cátions bivalentes, aeração, etc., poderão ser estudados visando a melhoria do desempenho do fungo e, conseqüentemente, melhorando a produção de ácido cítrico nos meios preparados com os resíduos de laranja e cevada.

O aspecto do crescimento do fungo nos resíduos de laranja e cevada em cada ensaio (1 a 11), no segundo dia de fermentação, está ilustrado nas Figuras 5.15 e 5.16, respectivamente.

Está mostrado o aspecto do meio na sua superfície (detalhe A), seguido de uma ampliação desta imagem (detalhe B), e no fundo do frasco de fermentação (detalhe C), podendo-se assim, visualizar o desenvolvimento do fungo no meio como um todo. Esta última imagem também foi ampliada (detalhe D).

Os resultados obtidos nos ensaios dos planejamentos (Tabelas 5.9 e 5.10 e Figuras 5.15 e 5.16) mostram que ambos os resíduos constituem meios adequados para o crescimento do fungo *A. niger* e para a produção de ácido cítrico pelo mesmo. Além disso, verifica-se que a combinação dos níveis das variáveis independentes provocou nítidas mudanças nas características do desenvolvimento do fungo, indicando que as variáveis estudadas constituem fatores importantes para o processo em questão.

Foi possível constatar visualmente que no nível inferior de umidade (ensaios E3, E4, E7 e E8), para os dois resíduos, o fungo permaneceu na forma vegetativa na superfície do meio por menos tempo, produzindo menos ácido cítrico e acelerando o processo de esporulação. Tal fato era esperado, uma vez que em condições ambientais desfavoráveis o microrganismo forma esporos tornando-se metabolicamente inativo. O comportamento observado está coerente com os resultados obtidos nos testes de fermentação 1 e 2 (itens 5.4.1 e 5.4.4), em que se verificou intensa esporulação do fungo com 24 h de fermentação, tempo este em que a umidade do meio estava abaixo de 50% (Tabela 5.2), que corresponde ao teor de umidade dos ensaios E3, E4, E7 e E8.

Nos ensaios E4, E7 e E8 (Figura 5.15) pode-se notar um crescimento micelar nitidamente distinto dos demais (detalhe A). Uma vez que os níveis dos três fatores são diferentes nestes três casos, o comportamento observado sugere que há uma interação entre os fatores em estudo, associada aos níveis empregados dos mesmos. Isto se refletiu, inclusive, na formação de produto, cujos valores foram os menores obtidos entre todos os experimentos com o resíduo de laranja (Tabela 5.9).

As máximas produções de ácido cítrico para os dois resíduos (66,6 g/kg de resíduo seco para laranja e 21,5 g/kg de resíduo seco para cevada), assim como o máximo fator de conversão de substrato em produto para a cevada (0,35 g/g), ocorreram nos ensaios ponto central. Nestes casos pode-se observar uma completa colonização do meio pelo fungo, permitindo a melhor utilização dos açúcares dos respectivos resíduos (Figuras 5.15 e 5.16, ensaios E9, E10 e E11). No entanto, o maior valor de $Y_{P/S}$ para o resíduo de laranja (0,60 g/g) foi obtido no nível superior de todas as variáveis independentes (ensaio E1, Tabela 5.9), indicando que esta condição é a mais favorável para a conversão de substrato em produto e que, estabelecendo-se as condições que impeçam o decréscimo de produto, causado provavelmente por seu consumo pelo fungo, poderia ser a melhor condição para a produção de ácido cítrico, nas faixas de valor das variáveis estudadas.

Analisando os ensaios em que se empregaram os mesmos teores de metanol e umidade, porém níveis diferentes de tamanho de partícula, no caso os ensaios E1-E5, E2-E6, E3-E7 e E4-E8, para ambos os resíduos, verifica-se que o aumento no tamanho de partícula de 0,38 mm para 1,44 mm (resíduo de laranja) e de 0,28 mm para 0,72 mm (resíduo de cevada), proporcionou um aumento tanto na produção de ácido cítrico como no fator de conversão de substrato em produto. Isto indica que partículas maiores, por proporcionarem maior porosidade ao meio, favorecem o desenvolvimento do fungo e a transferência de massa e calor, enquanto partículas pequenas são mais susceptíveis à compactação, prejudicando o processo. Com base nestes resultados pode-se considerar que o maior tamanho de partícula é mais adequado para condução do processo fermentativo em estudo, para ambos os resíduos. Neste aspecto, cabe salientar que o aumento do tamanho de partícula para o resíduo de cevada teve efeito nitidamente maior (0,16 para 0,22 g/g) que para o resíduo de laranja (0,53 para 0,60 g/g), considerando a variável resposta fator de conversão de substrato em produto. Tal

fato sugere que provavelmente, este fator não terá efeito significativo sobre esta variável resposta para o resíduo de laranja.

Tabela 5.9 Valores reais dos fatores e parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, para o resíduo de laranja.

Ensaio	Tamanho da partícula (mm)	Teor de umidade (%)	Teor de metanol (%)	Prod. Ac. cítrico (g/kg res. seco)	$Y_{P/S}$ (g/g)
1	1,44	80	7	46,7	0,60
2	1,44	80	3	27,5	0,27
3	1,44	50	7	24,7	0,38
4	1,44	50	3	19,5	0,19
5	0,38	80	7	35,5	0,53
6	0,38	80	3	24,0	0,24
7	0,38	50	7	23,2	0,28
8	0,38	50	3	13,8	0,18
9	0,92	65	5	64,1	0,51
10	0,92	65	5	66,6	0,46
11	0,92	65	5	61,8	0,43

Tabela 5.10 Valores reais dos fatores e parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central para o resíduo de cevada.

Ensaio	Tamanho da partícula (mm)	Teor de umidade (%)	Teor de metanol (%)	Prod. Ac. cítrico (g/kg res. seco)	$Y_{P/S}$ (g/g)
1	0,72	80	7	16,0	0,22
2	0,72	80	3	9,7	0,18
3	0,72	50	7	11,7	0,17
4	0,72	50	3	8,5	0,10
5	0,28	80	7	11,8	0,16
6	0,28	80	3	9,5	0,10
7	0,28	50	7	5,5	0,09
8	0,28	50	3	4,4	0,07
9	0,50	65	5	21,5	0,30
10	0,50	65	5	21,0	0,35
11	0,50	65	5	20,3	0,34

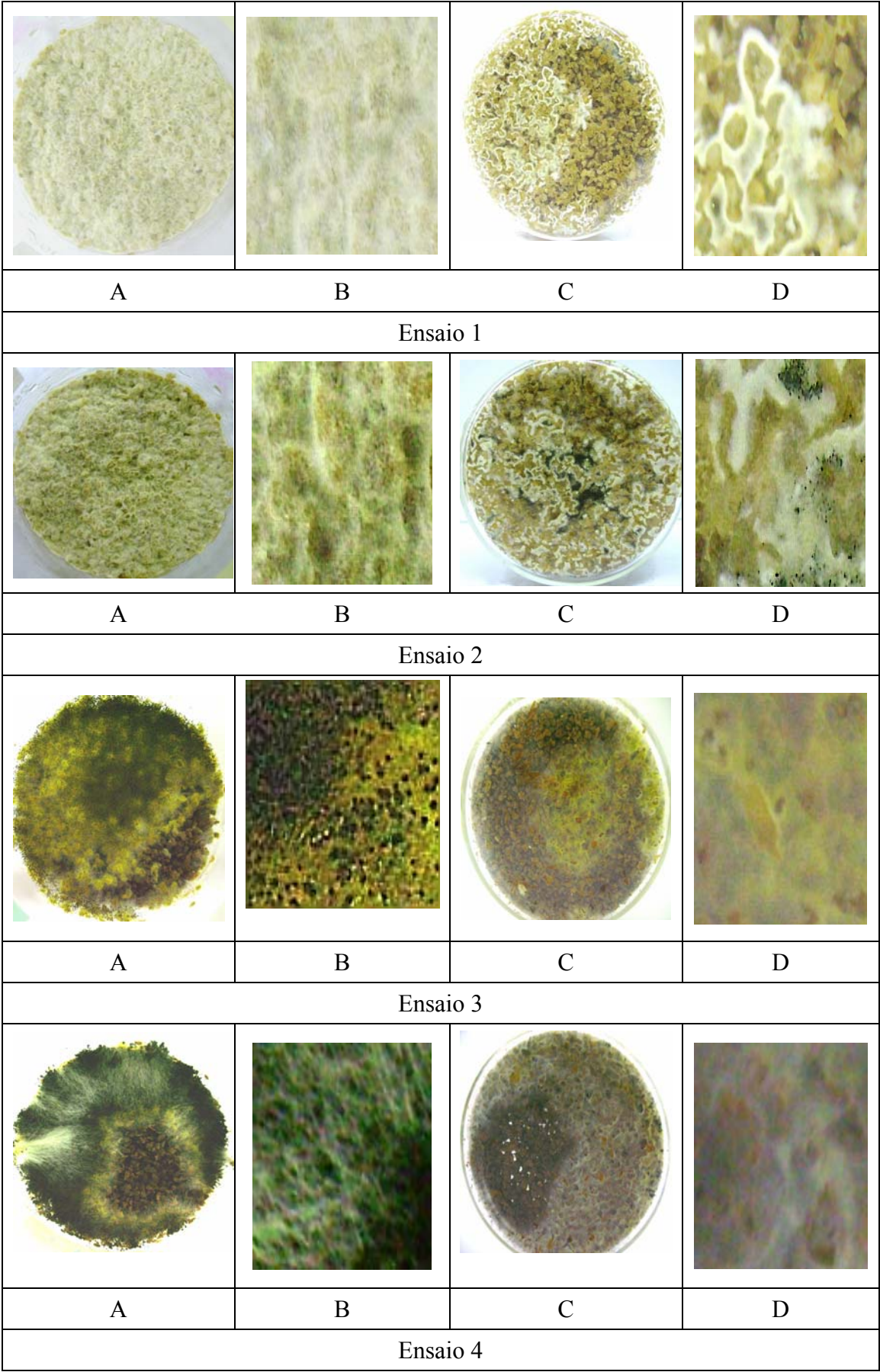


Figura 5.15 continua...

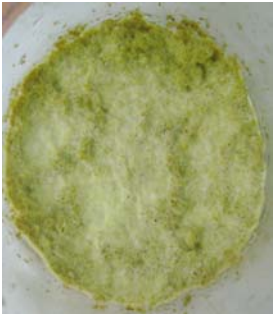
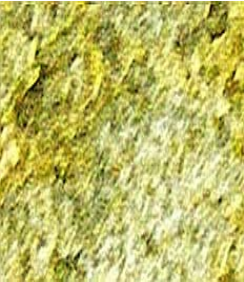
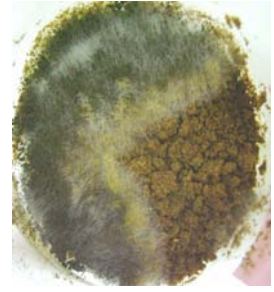
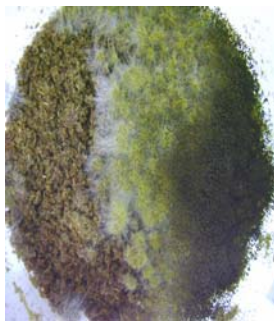
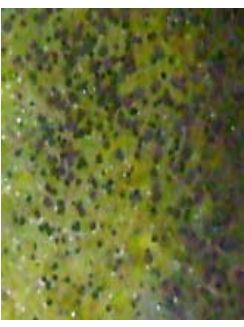
			
A	B	C	D
Ensaio 5			
			
A	B	C	D
Ensaio 6			
			
A	B	C	D
Ensaio 7			
			
A	B	C	D
Ensaio 8			

Figura 5.15 continuação...

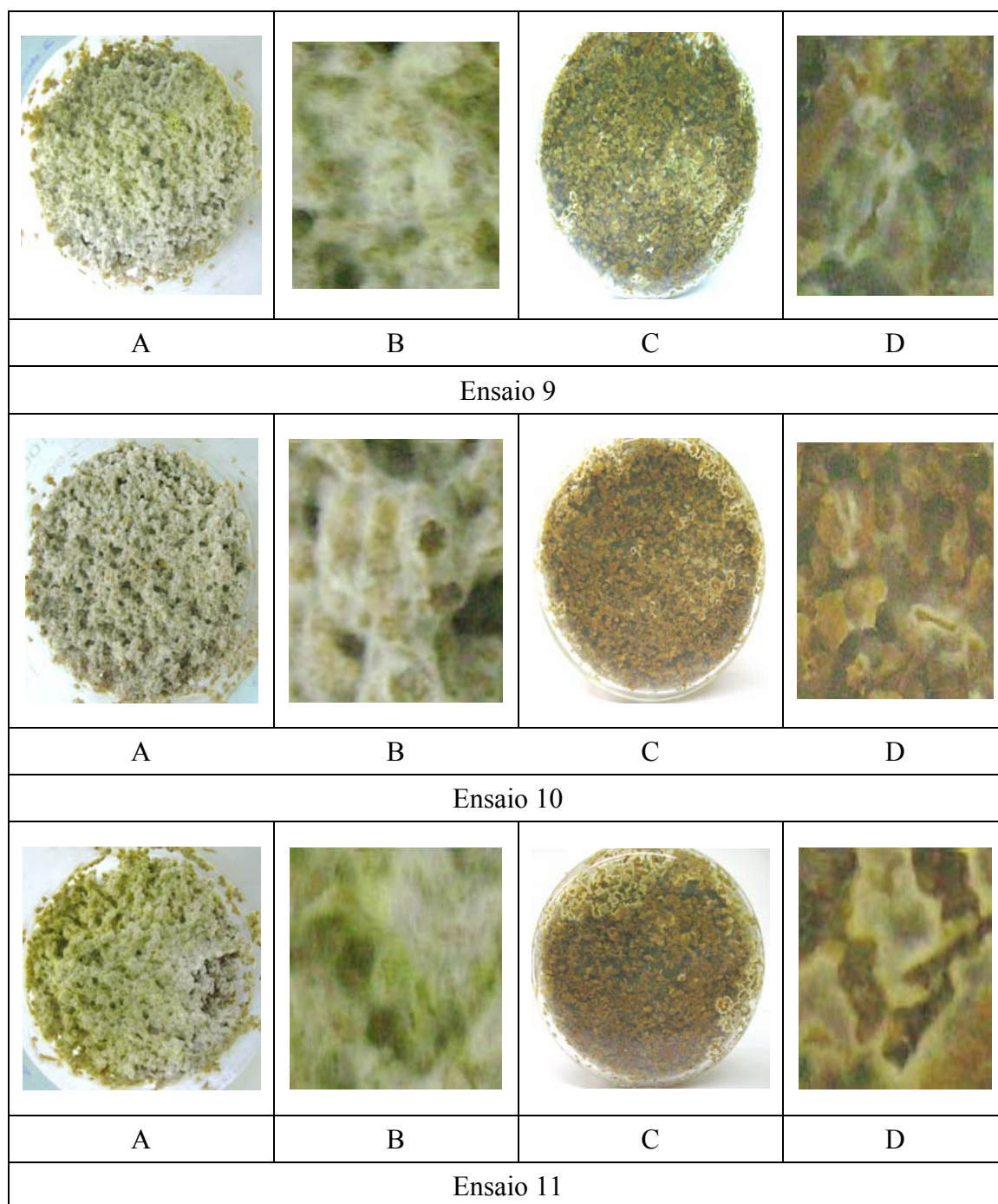


Figura 5.15 Aspecto do meio de fermentação correspondente ao resíduo de laranja, nas condições referentes ao planejamento estatístico: (A) vista da superfície do meio, (B) ampliação da vista da superfície, (C) vista do fundo do frasco e (D) ampliação da vista do fundo do frasco.

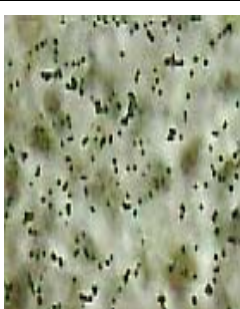
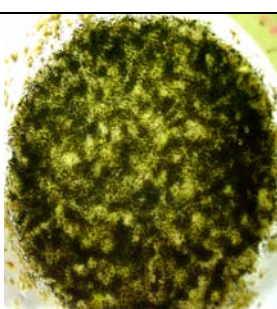
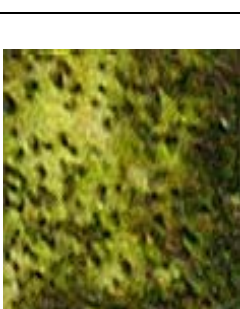
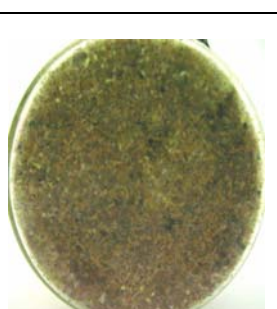
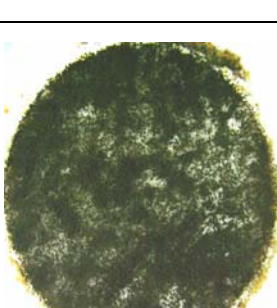
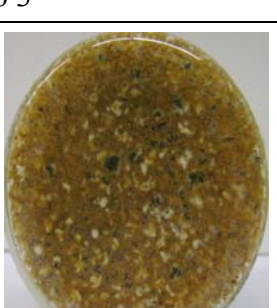
			
A	B	C	D
Ensaio 1			
			
A	B	C	D
Ensaio 2			
			
A	B	C	D
Ensaio 3			
			
A	B	C	D
Ensaio 4			

Figura 5.16 continua...

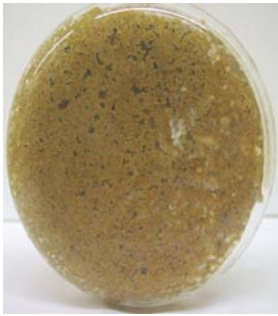
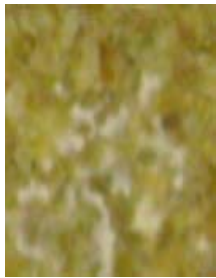
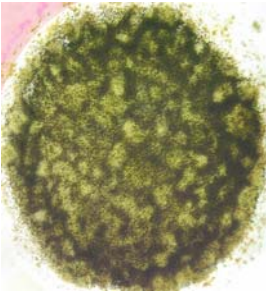
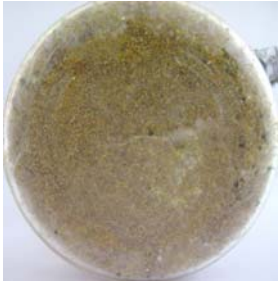
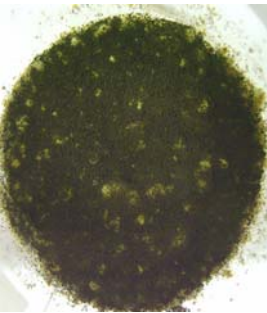
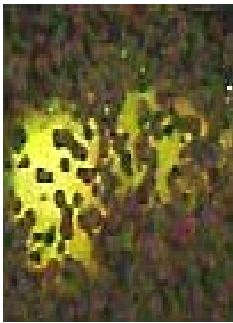
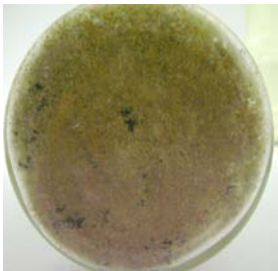
			
A	B	C	D
Ensaio 5			
			
A	B	C	D
Ensaio 6			
			
A	B	C	D
Ensaio 7			
			
A	B	C	D
Ensaio 8			

Figura 5.16 continuação...

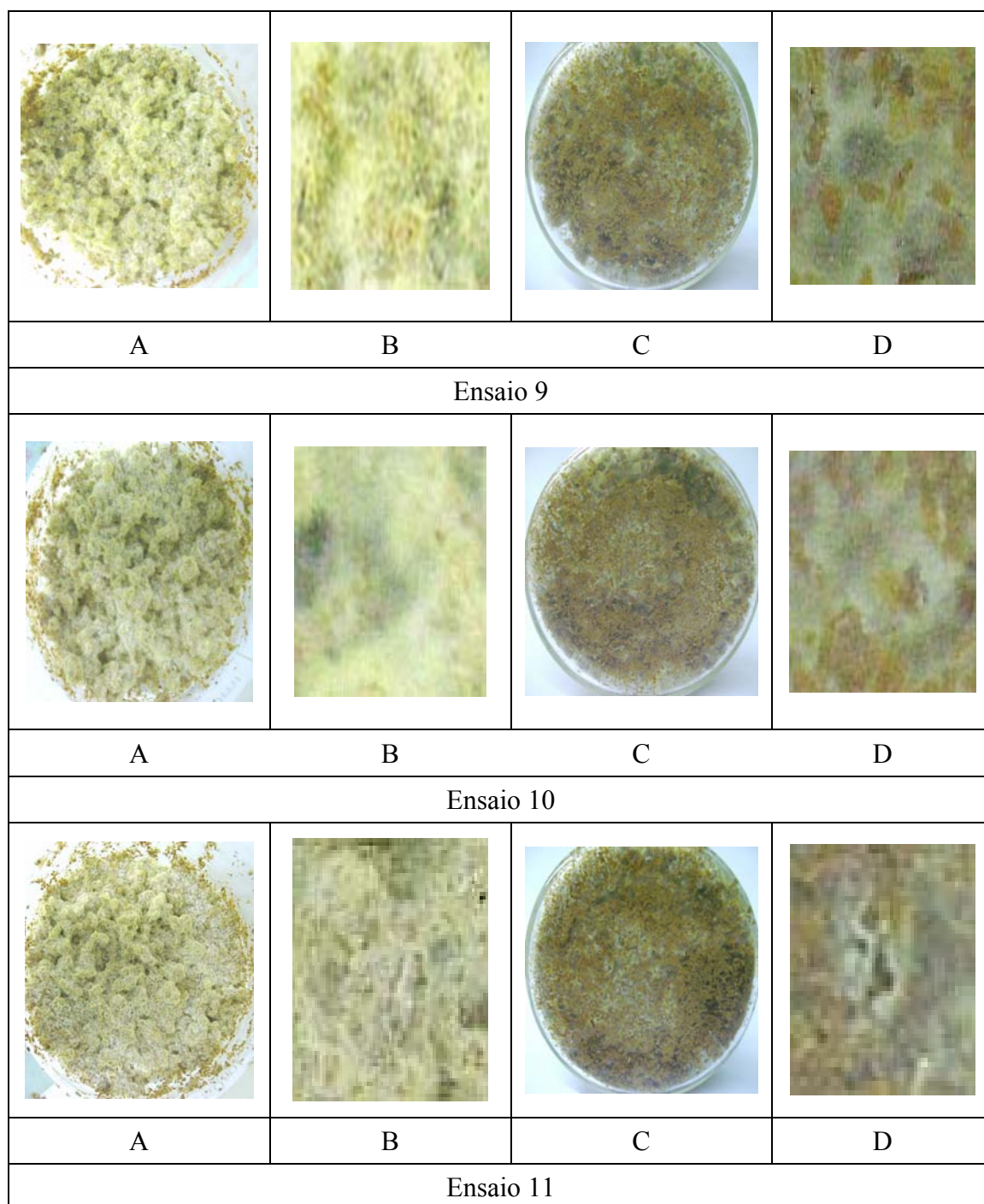


Figura 5.16 Aspecto do meio de fermentação correspondente ao resíduo de cevada, nas condições referentes ao planejamento estatístico: (A) vista da superfície do meio, (B) ampliação da vista da superfície, (C) vista do fundo do frasco e (D) ampliação da vista do fundo do frasco.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Shojaosadati e Babaeipour (2002), que relataram um efeito positivo do aumento do tamanho de partícula sobre a produção de ácido cítrico, empregando polpa de maçã e o fungo *A. niger* BC1. Kumar et al. (2003b) obteve maior acúmulo de ácido cítrico a partir de bagaço de cana-de-açúcar aumentando o tamanho de partícula de valores menores que 0,64 mm para valores na faixa de 1,2-1,6 mm.

Comparando os ensaios E1-E3, E2-E4, E5-E7 e E6-E8, nos quais se empregaram o mesmo tamanho de partícula e mesmo teor de metanol, porém níveis diferentes de umidade, constata-se, para os dois resíduos, que a redução do teor de umidade de 80 para 50% afetou negativamente os parâmetros de fermentação em estudo. A diminuição da umidade é vantajosa, pois diminui a possibilidade de contaminação do meio, porém, dificulta a transferência de massa. O favorecimento da produção de ácido cítrico com o aumento da umidade também foi relatado por Roukas (2000) e Kumar et al. (2003b), que variaram a umidade de figo de 60 para 75% e de bagaço de cana de 55 para 75%, respectivamente.

O efeito do metanol foi avaliado a partir dos ensaios E1-E2, E3-E4, E5-E6 e E7-E8, nos quais se empregaram os mesmos valores de tamanho de partícula e teor de umidade, porém níveis diferentes de metanol. Neste caso, para ambos os resíduos, o aumento do teor de metanol de 3 para 7% favoreceu o produção de ácido cítrico e o fator de conversão de substrato em produto. Este comportamento mostra a importância do metanol para o processo fermentativo em estudo. Roukas (1999), Roukas (2000) e Kumar et al. (2003b) relataram um efeito estimulante similar do metanol sobre a fermentação cítrica, quando variaram o teor de metanol de 1,5 a 6%, 3 a 6% e 2 a 4%, utilizando vagem da alfarrobeira, figo e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. A influência positiva do metanol observada no presente trabalho pode ser atribuída à atuação deste álcool na permeabilidade da membrana, favorecendo a excreção do citrato (MADDOX et al. 1986 apud ROUKAS, 1999), assim como

à sua capacidade de aumentar a tolerância do fungo *A. niger* aos íons ferro, cobre e manganês, conforme citado por Moyer (1953). Taha e El-Zainy (1959) comprovaram a capacidade de metanol de neutralizar o efeito negativo dos íons ferro e manganês em fermentação submersa para a produção de ácido cítrico por fungo.

A consideração feita anteriormente (item 5.4.5), de que os resíduos em estudo não apresentam substâncias inibidoras, pode ser reforçada pelo fato de a presença de metanol não ter impedido o crescimento do fungo *A. niger* NRRL3 (Figuras 5.15 e 5.16), uma vez que este composto já foi testado em fermentação submersa, concluindo-se que tem efeito inibidor sobre o crescimento de *A. niger* (PRATA, 1989). Ou seja, se houvesse substâncias tóxicas nos resíduos, estas, associadas ao efeito tóxico do metanol, poderiam inibir o desenvolvimento do fungo a ponto de inviabilizar o processo. No caso do presente trabalho (FES) uma inibição pode ser observada comparando-se os ensaios E1-E2, E3-E4, E5-E6 e E7-E8, em que se pode notar o menor crescimento quando se emprega 7% de metanol (ensaios E1, E3, E5 e E7).

5.6 Análise estatística dos resultados dos planejamentos

A avaliação detalhada da influência dos efeitos do tamanho da partícula, do teor de umidade e do teor de metanol sobre os parâmetros fermentativos do processo de produção de ácido cítrico por *A. niger* a partir de resíduo de laranja e cevada foi realizada aplicando-se análise estatística.

As análises da estimativa dos efeitos para as variáveis dependentes (produção de ácido cítrico e $Y_{P/S}$) foram realizadas empregando-se os gráficos de Pareto (Figuras 5.17 a 5.20), sendo considerados significativos os termos cujos valores de $t_{\text{calculado}}$ (representados por

barras) fossem superiores ao valor de $t_{\text{tabelado}} = 3,18$ (representado pela linha tracejada), para distribuição de Student a 95% de confiança, com três graus de liberdade.

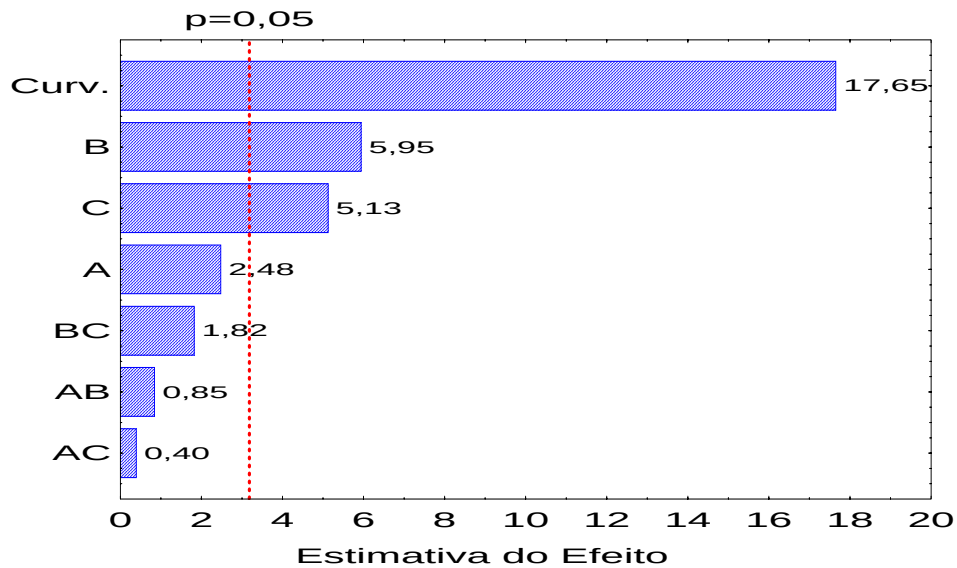


Figura 5.17 Gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja.

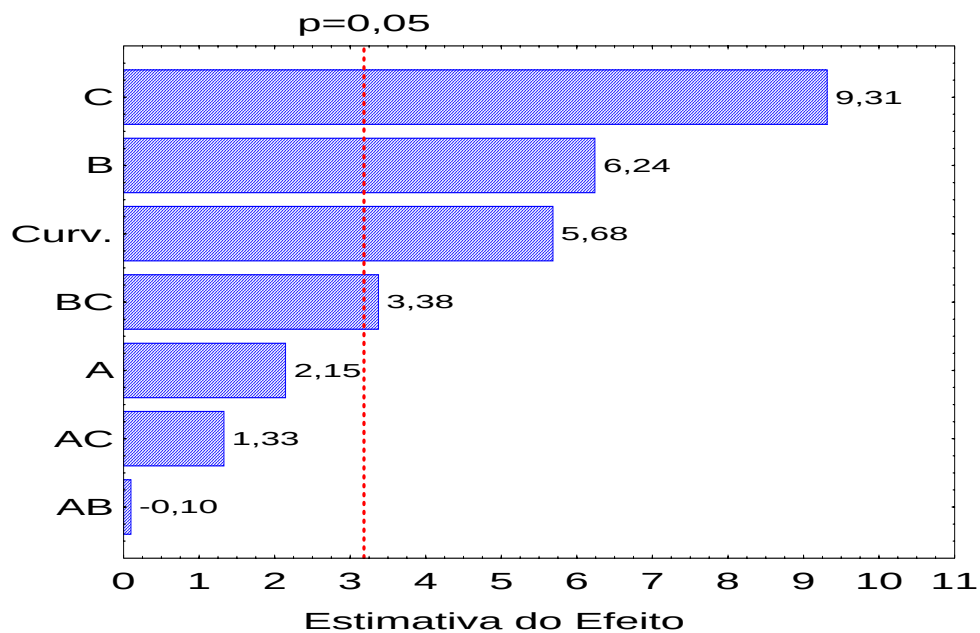


Figura 5.18 Gráfico de Pareto da variável resposta $Y_{p/s}$ para o resíduo de laranja.

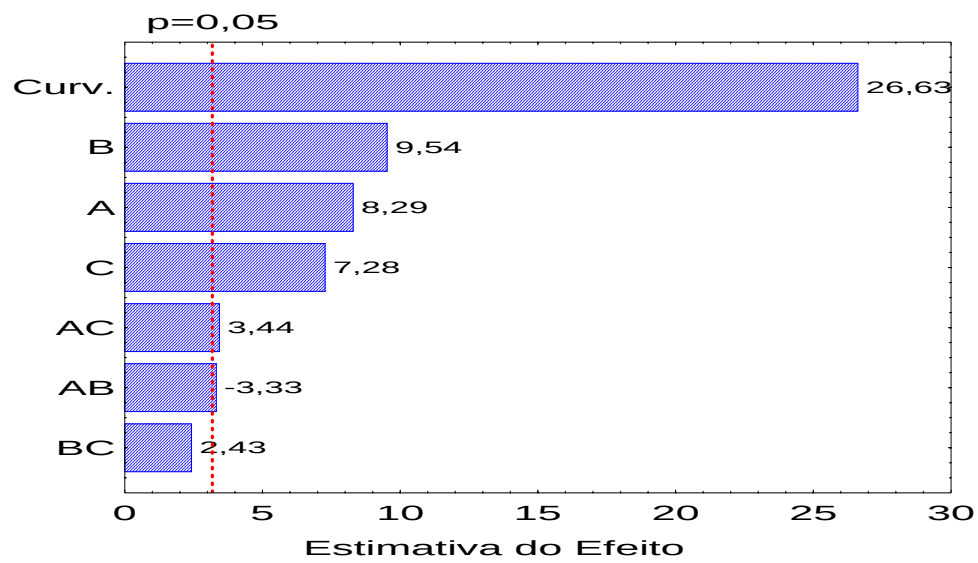


Figura 5.19 Gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada.

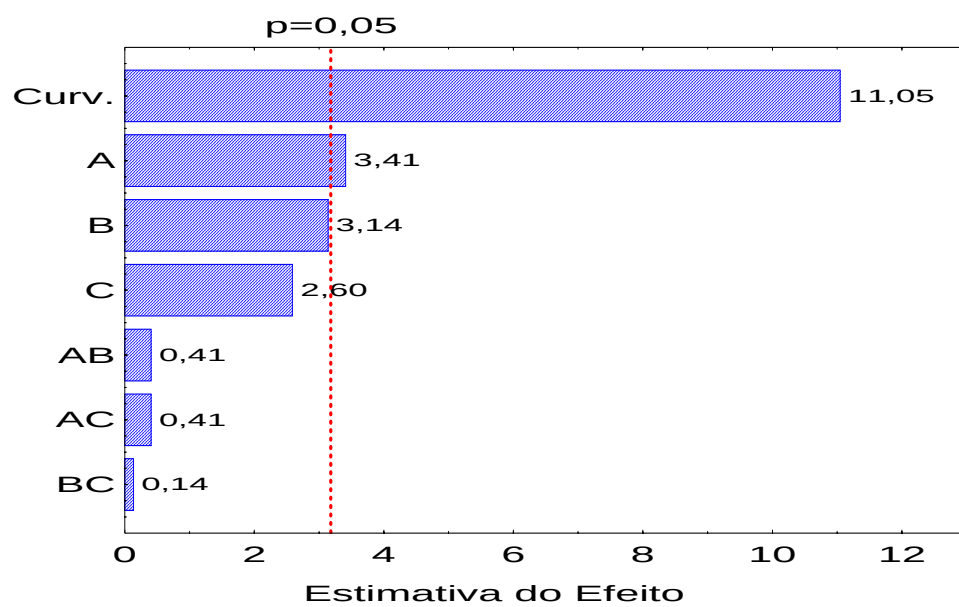


Figura 5.20 Gráfico de Pareto da variável resposta $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada.

Analisando-se os gráficos de Pareto das Figuras 5.17 e 5.18, referentes ao resíduo de laranja, constata-se que as variáveis umidade (B) e metanol (C) apresentaram efeitos significativos para ambas as respostas analisadas, sendo estes efeitos mais pronunciados sobre $Y_{P/S}$, para o qual a interação umidade-metanol (BC) também foi significativa. Em todos os casos, como as estimativas dos efeitos foram positivas, o aumento dos valores destas variáveis resulta aumento das respectivas variáveis resposta. Para as duas respostas, a curvatura apresentou significância, sendo esta maior para a resposta produção de ácido cítrico. Esta análise está de acordo com o observado anteriormente, considerando os aspectos de crescimento do fungo no meio (Figura 5.15) e os resultados dos parâmetros fermentativos (Tabela 5.9). No caso do resíduo de cevada, para a resposta produção de ácido cítrico (Figura 5.19), todos os efeitos principais: tamanho da partícula (A), teor de umidade (B) e teor de metanol (C) apresentaram significância, assim como as interações partícula-metanol (AC) e partícula-umidade (AB). Entretanto, para o valor de $Y_{P/S}$ (Figura 5.20), somente o tamanho de partícula teve efeito significativo. Para ambas as respostas, a curvatura foi significativa.

Para confirmar a significância dos efeitos principais e suas interações sobre os parâmetros fermentativos do processo em estudo foi realizada a análise de variância dos efeitos (Tabelas 5.11 a 5.14).

Constata-se que tanto para o resíduo de laranja como para o de cevada, os termos que influenciaram significativamente os parâmetros fermentativos foram os mesmos revelados pelos gráficos de Pareto.

As respostas estudadas para ambos os resíduos apresentaram curvatura significativa. No entanto, a contribuição da curvatura sobre a resposta $Y_{P/S}$ para o resíduo de laranja não foi elevada (18,06%), conforme pode ser observado na Tabela 5.12, ao contrário dos demais casos (Tabelas 5.11, 5.13 e 5.14), que apresentaram uma contribuição acima de 74%. Estes resultados sugerem que as variáveis resposta em estudo, exceto $Y_{P/S}$, para a laranja, se ajustam

a modelos quadráticos. Porém, para a obtenção do modelo seria necessária a realização de um número maior de experimentos.

Tabela 5.11 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja considerando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância	Contribuição (%)
Curv.	3036,22	1	3036,22	311,64	0,0004 *	80,59
A	59,95	1	59,95	6,15	0,0892	1,59
B	344,53	1	344,53	35,36	0,0095 *	9,15
C	256,51	1	256,51	26,33	0,0143 *	6,81
AB	7,03	1	7,03	0,72	0,4580	0,19
AC	1,53	1	1,53	0,16	0,7183	0,04
BC	32,40	1	32,40	3,33	0,1657	0,86
Erro	29,23	3	9,74			
Total	3767,40	10				

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

R²=0,99

* significativo ao nível de 95% de confiança

Tabela 5.12 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão (Y_{P/S}) para o resíduo de laranja considerando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância	Contribuição (%)
Curv.	0,0386	1	0,0386	32,31	0,0108 *	18,06
A	0,0055	1	0,0055	4,62	0,1208	2,58
B	0,0465	1	0,0465	38,99	0,0083*	21,80
C	0,1035	1	0,1035	86,76	0,0026 *	48,51
AB	0,0000	1	0,0000	0,01	0,9249	0,01
AC	0,0021	1	0,0021	1,77	0,2754	0,99
BC	0,0136	1	0,0136	11,41	0,0432 *	6,38
Erro	0,0036	3	0,0012			
Total	0,2134	10				

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

R²=0,98

* significativo ao nível de 95% de confiança

Tabela 5.13 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada considerando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância	Contribuição (%)
Curv.	278,40	1	278,40	709,03	0,0001 *	74,36
A	27,01	1	27,01	68,79	0,0037 *	7,21
B	35,70	1	35,70	90,92	0,0024 *	9,54
C	20,80	1	20,80	52,98	0,0054 *	5,56
AB	4,35	1	4,35	11,08	0,0448 *	1,16
AC	4,65	1	4,65	11,85	0,0412 *	1,24
BC	2,31	1	2,31	5,89	0,0936	0,62
Erro	1,18	3	0,39			
Total	374,40	10				

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

R²=0,997

* significativo ao nível de 95% de confiança

Tabela 5.14 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão (Y_{p/S}) para o resíduo de cevada considerando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância	Contribuição (%)
Curv.	0,0819	1	0,0819	122,09	0,0016 *	79,45
A	0,0078	1	0,0078	11,65	0,0421 *	7,58
B	0,0066	1	0,0066	9,86	0,0517	6,41
C	0,0045	1	0,0045	6,73	0,0808	4,38
AB	0,0001	1	0,0001	0,17	0,7096	0,11
AC	0,0001	1	0,0001	0,17	0,7096	0,11
BC	0,0000	1	0,0000	0,019	0,9001	0,01
Erro	0,0020	3	0,0007			
Total	0,1030	10				

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

R²=0,98

* significativo ao nível de 95% de confiança

A fim de confirmar a influência da curvatura para todas as variáveis em estudo e verificar a possibilidade de definir um modelo para a resposta $Y_{P/S}$, referente ao resíduo de laranja, foi realizada a análise de variância dos efeitos principais e de suas interações, para o ajuste em modelos lineares (Tabelas 5.15 a 5.18).

As respostas produção de ácido cítrico para ambos os resíduos e $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada (Tabelas 5.15, 5.17 e 5.18) apresentaram uma redução considerável do coeficiente de correlação com a retirada da curvatura, o que pode ser atribuído às suas elevadas contribuições. Além disso, para estas respostas, a falta de ajuste foi significativa a um nível de 95% de confiança, indicando que o ponto central está próximo da região de otimização e confirmando que os dados seriam melhor explicados por modelos quadráticos.

Tabela 5.15 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja desconsiderando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
A	59,95	1	59,95	10,40	0,0841
B	344,53	1	344,53	59,78	0,0163 *
C	256,51	1	256,51	44,51	0,0217 *
AB	7,03	1	7,03	1,22	0,3845
AC	1,53	1	1,53	0,27	0,6576
BC	32,40	1	32,40	5,62	0,1411
Falta de ajuste	3053,92	2	1526,96	264,94	0,0038 *
Erro Puro	11,53	2	5,76		
Total	3767,41	10			

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

* significativo ao nível de 95% de confiança

$R^2=0,17$

Tabela 5.16 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja desconsiderando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
A	0,0055	1	0,0055	3,38	0,2076
B	0,0465	1	0,0465	28,48	0,0334 *
C	0,1035	1	0,1035	63,38	0,0154 *
AB	0,0000	1	0,0000	0,01	0,9383
AC	0,0021	1	0,0021	1,29	0,3733
BC	0,0136	1	0,0136	8,33	0,1020
Falta de ajuste	0,0389	2	0,01943	11,90	0,0775
Erro Puro	0,0033	2	0,0016		
Total	0,2134	10			

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

$R^2=0,80$

* significativo ao nível de 95% de confiança

Tabela 5.17 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre a concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada desconsiderando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
A	27,01	1	27,01	74,34	0,0132 *
B	35,70	1	35,70	98,26	0,0100 *
C	20,80	1	20,80	57,25	0,0170 *
AB	4,35	1	4,35	11,98	0,0743
AC	4,65	1	4,65	12,80	0,0700
BC	2,31	1	2,31	6,36	0,1278
Falta de ajuste	278,84	2	139,42	383,73	0,0026 *
Erro Puro	0,73	2	0,36		
Total	374,40	10			

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

$R^2=0,25$

* significativo ao nível de 95% de confiança

Tabela 5.18 Análise de variância dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) para o resíduo de cevada desconsiderando curvatura.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
A	0,0078	1	0,0078	11,16	0,0791
B	0,0066	1	0,0066	9,45	0,0915
C	0,0045	1	0,0045	6,45	0,1264
AB	0,0001	1	0,0001	0,16	0,7273
AC	0,0001	1	0,0001	0,16	0,7273
BC	0,0000	1	0,0000	0,02	0,9059
Falta de ajuste	0,0825	2	0,0413	58,94	0,0167 *
Erro Puro	0,0014	2	0,0007		
Total	0,1031	10			

A = Tamanho da partícula, B = Teor de umidade, C = Teor de metanol

$R^2=0,18$

* significativo ao nível de 95% de confiança

Para uma melhor visualização dos efeitos das variáveis sobre as respostas que não permitem definição de modelo linear, seus comportamentos foram representados em diagramas de cubo.

Nas Figuras 5.21 e 5.22 estão apresentados os diagramas de cubo das respostas produção de ácido cítrico, para os resíduos de laranja e de cevada, respectivamente, e na Figura 5.23 o diagrama de cubo da resposta $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada. Em todos os casos verifica-se o efeito positivo das três variáveis em estudo. As máximas produções de ácido cítrico (46,7 g / kg de resíduo seco para laranja e 16 g / kg de resíduo seco para cevada), assim como o máximo valor de $Y_{P/S}$ para o resíduo de cevada (0,22 g/g), correspondem aos níveis superiores das variáveis independentes.

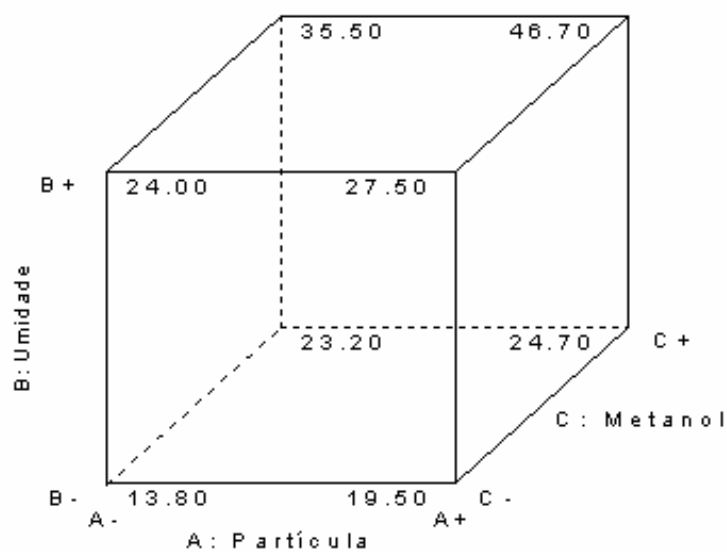


Figura 5.21 Diagrama de cubo da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de laranja.

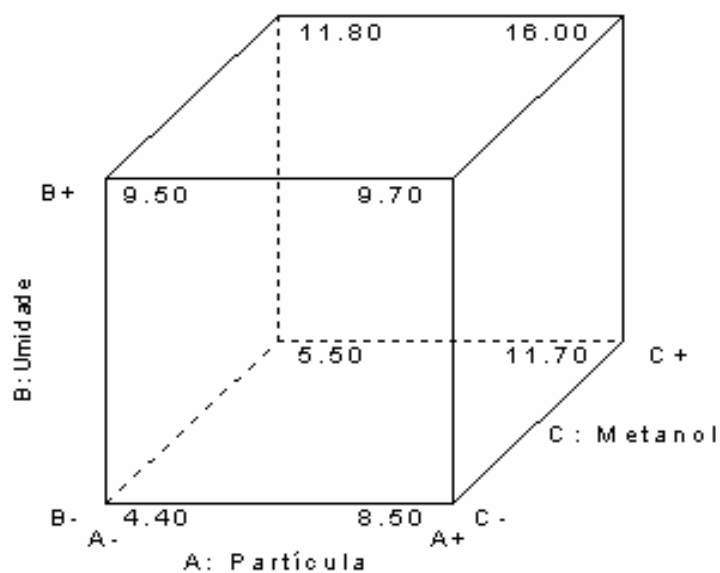


Figura 5.22 Diagrama de cubo da variável resposta concentração de ácido cítrico para o resíduo de cevada.

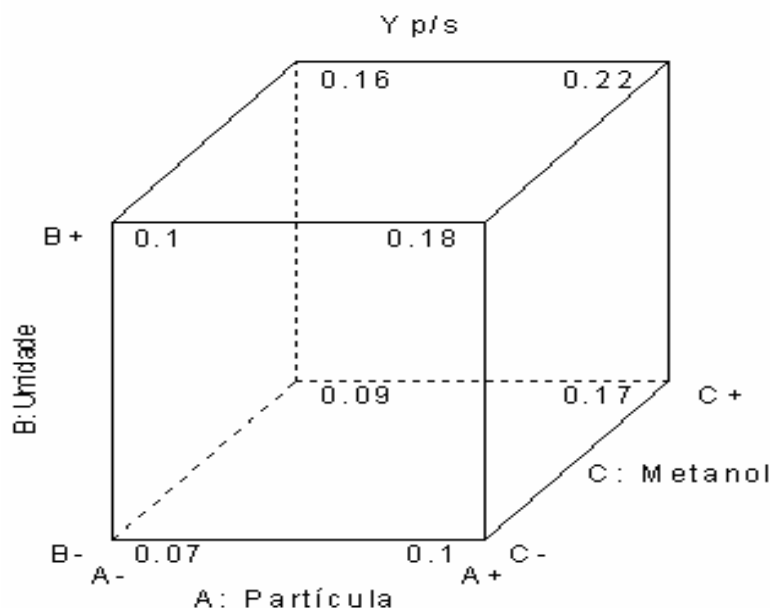


Figura 5.23 Diagrama de cubo da variável resposta concentração $Y_{p/s}$ para o resíduo de cevada.

O aumento do teor de umidade em níveis superiores de tamanho de partícula e porcentagem de metanol foi o efeito mais acentuado sobre a produção de ácido cítrico a partir do resíduo de laranja (Figura 5.21), enquanto o tamanho de partícula foi o fator que menos influenciou a produção quando umidade e metanol estavam em níveis -1 e +1, respectivamente.

Os fatores que proporcionaram os efeitos mais pronunciados sobre a produção de ácido cítrico a partir de resíduo de cevada (Figura 5.22) foram o teor de umidade, quando partícula e metanol estavam em níveis -1 e +1, e o teor de metanol, quando partícula e umidade estavam em níveis superiores. Entretanto, o tamanho de partícula praticamente não influenciou quando umidade e metanol estavam em níveis +1 e -1, respectivamente.

A conversão de açúcares do resíduo de cevada em ácido cítrico (Figura 5.23) foi mais influenciada pelo tamanho da partícula nos níveis de umidade +1 e metanol -1 e nos níveis de umidade -1 e de metanol +1 (aumento de 0,08 g/g no valor de $Y_{p/s}$). Esta mesma influência

foi observada para o teor de umidade com tamanho de partícula +1 e porcentagem de metanol -1. O efeito menos pronunciado foi o do metanol, para níveis inferiores de tamanho de partícula e teor de umidade. Assim como para as respostas produção de ácido cítrico nos resíduos de laranja e cevada (Figuras 5.21 e 5.22), o melhor valor de $Y_{p/s}$ foi obtido nos níveis superiores das variáveis estudadas, indicando que novos ensaios deverão ser realizados, em trabalhos futuros, a fim de se identificar os valores mais adequados das mesmas para a condução do processo em estudo.

Ainda, com relação a análise de variância desconsiderando a curvatura, o coeficiente de correlação obtido para a variável resposta $Y_{p/s}$ do resíduo de laranja (Tabela 5.16) não apresentou elevada redução ao se desconsiderar a curvatura (variou de 0,98 para 0,80) e a falta de ajuste não foi significativa. Conseqüentemente, em virtude da baixa contribuição da curvatura, os termos significativos na análise de variância com e sem curvatura foram os mesmos: umidade e metanol.

Para a resposta $Y_{p/s}$ do resíduo de laranja foi ajustado um modelo linear com base nos termos significativos apresentados na Tabela 5.16. A análise de variância da regressão para este modelo está mostrada na Tabela 5.19. O modelo proposto foi significativo e não apresentou falta de ajuste a 95% de confiança, conseguindo explicar 70% da variação total.

Tabela 5.19 Análise de variância da regressão que representa o fator de conversão ($Y_{p/s}$) para o resíduo de laranja.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
Modelo	0,150	2	0,075	9,74	0,0078 *
Resíduo	0,063	8	0,008		
Falta de ajuste	0,060	6	0,010	6,13	0,1468
Erro Puro	0,003	2	0,002		
Total	0,21	10			

* significativo ao nível de 95% de confiança

$R^2=0,70$

O modelo matemático que descreve a resposta fator de conversão para o resíduo de laranja, dentro da região estudada, está representado pela equação 5.1.

$$Y_{P/S} = 0,33 + 0,076 * \text{umidade} + 0,11 * \text{metanol} \quad \text{Equação 5.1}$$

A superfície de resposta descrita por esta equação está representada na Figura 5.24. O aumento do teor de umidade e de metanol (níveis superiores) favorece a conversão de substrato em produto no resíduo de laranja. De forma análoga, a diminuição dos mesmos tem um efeito negativo.

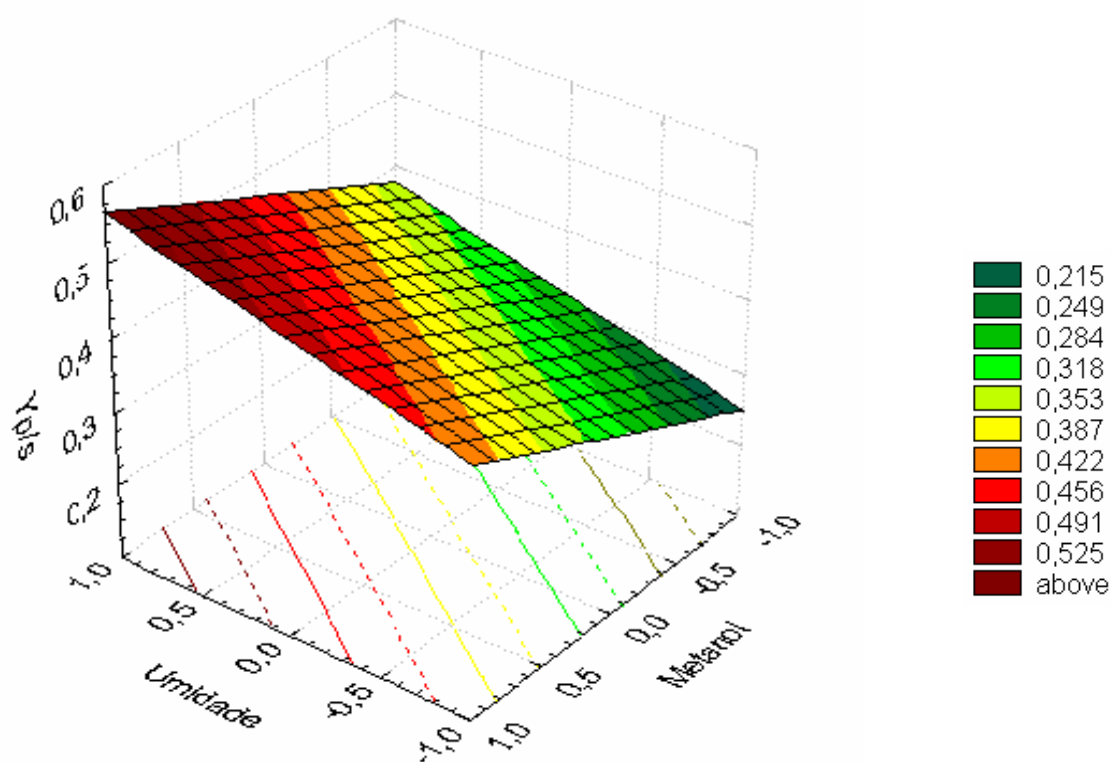


Figura 5.24 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona teor de umidade com o teor de metanol, representando o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para o resíduo de laranja.

O tamanho de partícula do resíduo de laranja mais adequado para realizar esta fermentação é 1,44 mm, correspondente ao nível superior da variável estudada, embora seu efeito não tenha sido significativo. Porém, fracionar o material a um tamanho de partícula maior é mais conveniente, por representar economia de energia e mão de obra.

6 CONCLUSÕES

- Os resíduos de laranja e de cevada, provenientes das indústrias de suco e cervejaria, respectivamente, são matérias-primas promissoras para a produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*, por fermentação em estado sólido (FES);
- Nas faixas estudadas dos valores de três das variáveis que afetam o processo, os limites superiores das mesmas são os que proporcionam os melhores resultados de conversão de substrato em produto para o resíduo de laranja. Estes valores são: 7% (m/m) de metanol, 80% de umidade e tamanho de partícula 1,44 mm;
- Para se obter a maior produção de ácido cítrico, a partir dos dois resíduos, deve-se utilizar os valores correspondentes ao ponto central do planejamento: 65% de umidade e 5% de metanol, para ambos os resíduos e tamanho de partícula de 0,92 mm para laranja e 0,50 mm para cevada;
- Em função dos resultados obtidos é possível inferir que os resíduos estudados podem também ser utilizados como suporte para o processo de FES em que se realiza a suplementação do mesmo com a fonte carbono que será transformada em produto pelo fungo;
- Uma vez que os estudos foram realizados sem qualquer tipo de suplementação dos resíduos, conclui-se também que a produção do ácido poderá ser aumentada adicionando-se nutrientes, com base em estudos específicos para a definição qualitativa e quantitativa dos mesmos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando melhorar o processo de fermentação cítrica a partir de resíduos de laranja e cevada, tem-se como propostas:

- Determinar o teor de nitrogênio, fósforo e elementos traços dos resíduos de laranja e cevada, a fim de ajustá-los aos níveis mais adequados possível, uma vez que estes componentes influenciam na fermentação cítrica;
- Estudar o efeito do pH inicial do meio, pois este fator é crítico para fermentação em estudo;
- Realizar estudos de suplementação dos resíduos com substrato, a fim de se verificar seu potencial como fonte de substrato em conjunto com a função de suporte;
- Estudar a influência da aeração do meio, visando aumentar a produtividade, uma vez que o fornecimento do oxigênio é fundamental para este processo.

REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. **Subprodutos da laranja.** Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/subprodutos_br.html>. Acesso em 5 de Dezembro de 2007.
- ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 97-100, 2002.
- ADTP. **Agência de Desenvolvimento Tietê Paraná.** Disponível em: <<http://www.adtp.org.br/artigo.php?idartigo=60>>. Acesso em 1 de Julho de 2006.
- ARAÚJO, W. A.; MACIEL, M. R. W. Estudo da pré-concentração do permeado de “orange core wash” por osmose inversa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 16, 2006, Santos. 1 CD-ROM.
- ARAÚJO, W. L. **Produção de ácidos orgânicos.** Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm>>. Acesso em Fevereiro de 2007.
- BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, p. 247-276.
- CABRERA. **Bagaço de cevada.** Disponível em: <<http://www.grupocabrera.com.br/bagaço.htm>>. Acesso em 20 de Dezembro de 2007.
- CARLIE, M. J.; WATKINSON, S. C. Spores, dormancy and dispersal. In: _____. **The Fungi**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 153-201.
- CERVESIA. **O mercado brasileiro de cerveja.** Disponível em: <http://www.cervesia.com.br/dados_estatisticos.asp>. Acesso em 5 de Julho de 2007.
- COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p.291-302, 2006.
- CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n- paraffin. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 27-40, 2001.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Organic acids. In: **Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology**. 2nd ed. Sunderland: Science Tech Publishers, 1990. p.140-141.
- DAKHMOCHE, S. D.; AOULMI, Z. G.; BENNAMOUN, Z. M. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 190-197, 2006.
- DAWSON, M. W.; MADDOX, L. S.; BOANG, I. F.; BROOKS, J. D. Application of fed batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger*, The effect of dilution rate and dissolved oxygen tension. **Biotechnology Bioengineering**, v. 32, p. 220-226, 1988.

DEMIREL, G.; YAYKASLI, K. O.; YASAR, A. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. **Food Chemistry**, v. 89, p. 393-396, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method form determination of sugars and related substances. **Nature**, v. 28, p.350-356, 1956.

GUERRA, N. P.; AGRASAR, A. T.; MACIAS, C. L.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 343-350, 2003.

GODOY, R. C. B.; MATOS, E. L. S.; SANTOS, A. P.; AMORIN, T. S. Estudo de compotas e doces cristalizados elaborados com diferentes albedos cítricos. **B. CEPPA**, v. 23, p. 95-108, 2005.

GRAF, G. **Citric acid prices stable, but trend points up**. Disponível em: <<http://www.purchasing.com/article/CA624878.html>>. Acesso em Janeiro de 2007.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, p.209-223, 1995.

HANG, Y. D.; SPLITTSTOESSER, D. F.; WOODAMS, E. E.; SHERMAN, R. M. Citric acid fermentation of brewery waste. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 383-384, 1977.

HERMANN ,S. R., HERNANDEZ, F. , RIVALDI , J. D., SILVEIRA, G. G., SILVA D., SOARES, L. H. B., BIANCHI, V. L., KRIEGER, N., MORAES, R. O., DENTIZEN , A. Produção de Pectina Liase e Amilase por Fermentação no Estado Sólido à Base de Bagaço de Laranja e Farelo de Arroz. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 14, 2003, Florianópolis. 1 CD-ROM.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentaion- are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C.; VOLTOLINI, T. V.; FARIA, K. P.; FERREIRA, C. C. B. Composição e digestibilidade aparente de silagem de bagaço de laranja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1485-1490, 2000.

KIM, J. W.; BARRNGTON, S.; SHEPPARD, J.; LEE, B. Nutrient optimization for the prouction of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peat moss enriched with glucose. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1253-1260, 2006.

KUBICEK, C. P.; ROHR, M. Citric acid fermentation. In: REHM, H. J. **CRC Critical Review Biotechnology**, 1986. v.3, p. 331-373.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1725-1729, 2003a.

_____. Citric acid production by state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731-1738, 2003b.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 1-4, 2007.

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.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**, p. 307-319, 2004.

MAIORANO, A. E.; BONOMI, A.; SCHMIDELL, W.; OGAKI, Y. Determinação do crescimento celular em fermentação em estado sólido. **Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT)**, p.1-13, 1992.

MARCHAL, R.; METCHE, M.; VANDECASTEELE, J. P. Intracellular concentrations of citric acid and isocitric acids in cultures of three citric acid excreting yeast of *Candida lipolytica* grown on alkanes. **Journal of General microbiology**, v. 116, p. 535-539, 1980.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; SILVA, R.D.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v.37, p. 949-954, 2002.

MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. A brief introduction to citric acid biotechnology. In: **Citric Acid Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 3-21,

MEDEIROS, A. B. P.; CHRISTEN, P.; ROUSSOS, S.; GERN, J.C.; SOCCOL, C.R. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. **Brazilian Journal of microbiology**, v.34, p.245-248, 2003.

MELLO, E. T.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos em uma indústria de bebidas. **Brasil Alimentos**, v. 17, p.24-29, 2007.

MICROBIOLOGIA de alimentos. **Alimentos e enzimas produzidos por microrganismos**. Disponível em: <<http://www.livronline.com/servicos/gratuitos/ma002/capitulos/cap4.html>>. Acesso em Fevereiro de 2007.

MILSON, P. E.; MEERS, J. L. Citric acid. In: MOO-YONG, M. Ed. **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Press, p. 665-680, 1985.

MITCHELL, D.A. Microbial basis of processes. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid substrate cultivation**. England: Elsevier Science Publishers Ltda, 1992. p.17-24.

MOLINA, M. A. B. **Avaliação do caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3 butanodiol**. 1995. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MOYER, A. J., Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture, I. Nature of the alcohol effect. **Applied Microbiology**, v.1, p.8, 1953.

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

NATURAL rural. **Insumos para Agropecuária Convencional e Orgânica**. Disponível em: <<http://www.naturalrural.com.br/noticias/?codigo=47471>>. Acesso em 15 de Dezembro de 2007.

NELSON, N. A. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

OXIDIAL. **Soluções Químicas**. Disponível em: <http://www.oxidial.com.br/pt/produtos/pos/acido-citrico_B.2.8.html>. Acesso em Janeiro de 2007.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R.; NIGAM, P. Factors that influence solid state fermentation. In: _____. **Solid-state fermentation in Biotechnology: Fundamentals and applications**. New Delhi: Asistech Publishers, 2001, p. 29-31.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 244-263, 2007.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Mangement & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PENNA, T. C. V. Produção de ácidos. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, p. 45-50.

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.

PRATA, A. M. R. **Avaliação do Hidrolisado Celulósico de Cana-de-açúcar para Obtenção de Ácido Cítrico**. 1989. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Process Biotechnology**, v. 1, p. 1-18, 1998.

ROJAS, M. G.; HOSN, S. A. A.; AURIA, R.; REVAH, S.; TORRES, E. F. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. **Process Biotechnology**, v. 31, p. 363-369, 1995.

ROUKAS, T. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 54-59, 1999.

_____. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 298-304, 2000.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 273-276, 1997.

SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 51-60, 2005.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SHOJAOSADATI, S. A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 909-914, 2002.

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

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

SODECK, G.; MODL, J.; KOMINEK, J.; SALZBRUNN, W. Production of citric acid according to the submerged fermentation process. **Process Biochemistry**, p. 9-11, 1981.

STANIER, Y. R.; ADELBERG, A. E.; INGRAHAN, L. Microbial Metabolism: The generation of ATP. In: _____. **The Microbial world**. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1976, p.154-186.

TAHA, E. E.; EL-ZAINY, T. A. The mutual influence of metanol and trace elements on mycological production of citric acid. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 33, p. 124-127, 1959.

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. 25, p. 175-178, 2000.

WIKIPÉDIA. **Ácido cítrico**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81acido_c%C3%ADtrico>. Acesso em Janeiro de 2007.

WOLSCHEK, M. F.; KUBICEK, C. Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. In: _____. **Citric Acid Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1999. p. 21-23.

XIE, G.; WEST, T. P. Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grains. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 269-273, 2006.

XU, D. B.; MADRID, C. P.; ROHR, M. KUBICEK, C. P. Comparison of factors influencing citric acid production *A. niger* grown in submerged culture and filter paper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 444-449, 1989a.

_____. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *A. niger*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 553-558, 1989b.

YAYKASLI, K. O.; DEMIREL, G.; YASAR, A. Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 518-522, 2005.

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

ANEXO

Preparo dos reagentes de Nelson

Reagente A:

25g de carbonato de sódio anidro
25g de tartarato de potássio e amônio
20g de bicarbonato de sódio
200g de sulfato de sódio
1 L de água

Reagente B:

15g de sulfato de cobre pentahidratado.
100 mL de água
2 gotas de ácido sulfúrico concentrado antes de acertar o volume.

Reagente C:

25g de molibdato de amônio, dissolvido em 450 mL de água destilada
21 mL de ácido sulfúrico concentrado
3g de arseniato ácido de sódio hepta hidratado dissolvido em 25 mL de água destilada