



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS (CÍTRICO E ELÁGICO) A PARTIR DE CASCA
DE CACAU

CURITIBA

2017

PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS (CÍTRICO E ELÁGICO) A PARTIR DE CASCA
DE CACAU

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Co-orientação: Prof.^a Dr.^a Cristine Rodrigues
Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

O48p Oliveira, Priscilla Zwiercheczewski de
Produção de ácidos orgânicos (cítrico e elágico) a partir de casca de cacau /
Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira. – Curitiba, 2017.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia,
2017.

Orientadora: Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Coorientadora: Cristine Rodrigues
Coorientador: Carlos Ricardo Soccol

1. Ácidos orgânicos. 2. Ácido cítrico. 3. Ácido elágico. 4. Fermentação. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Vandenberghe, Luciana Porto de Souza.
III. Rodrigues, Cristine. IV. Soccol, Carlos Ricardo. V. Título.

CDD: 547

Bibliotecária: Vanusa Maciel - CRB – 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA** intitulada: **PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS (CÍTRICO E ELÁGICO) A PARTIR DE CASCA DE CACAU**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Junho de 2017.

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CRISTINE RODRIGUES

Co-orientador - Avaliador Externo (UFPR)

ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS

Avaliador Interno (UFPR)

MARIA HELENE GIOVANETTI CANTERI

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Seguir na pós-graduação é um caminho um tanto desafiador. Eu dediquei um pouco mais de dois anos de minha vida a este desafio – cheio de altos e baixos – mas tudo é recompensador quando se faz o que gosta (e este caminho de pesquisa, experimentos e descobrimentos tem os seus encantos). Por isso, alguns agradecimentos são necessários:

À Luciana Vandenberghe, que me orientou com esmero, disposição e paciência. Desde o primeiro momento pude desenvolver tamanha admiração e empatia. Muito obrigada.

À Cristine Rodrigues, muito obrigada por todo o conhecimento transmitido com tamanha facilidade e carisma, sempre esteve disposta em me ensinar e auxiliar, e dessa forma seguiu na minha co-orientação.

Ao professor Carlos Soccol pela oportunidade de ingressar neste programa pioneiro da Biotecnologia no país.

Às integrantes da banca por gentilmente aceitarem o convite e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

A CAPES e CNPq pelo fomento e à Rede Biocau pelo intercâmbio de experiências.

Não poderia deixar de agradecer aos meus queridos orientadores que tive durante a graduação, e que de certa forma ainda me orientam: José Trindade e Maria Helene Canteri, pelos quais possuo enorme admiração. Sempre que possível, vocês continuaram a me auxiliar e aconselhar sobre meus anseios, angústias e dúvidas sobre o mundo acadêmico. Gratidão!

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação, em especial: Zulma V. e Patrick T., que compartilhamos tantos desesperos dentro do grupo Biocau e que soubemos rir de tudo isso, sempre com aprendizado. Luis P. e Omar P., pela amizade, ajuda e preocupação em tudo dar certo em nossos trabalhos. Erickson M. e Juliana S. que seguiram para outros laboratórios, mas que quando nos visitavam era sempre uma alegria – e fora dele também. Aos demais colegas da Turma PPGEBB 2015, do saudoso LPB I, LPB II e Cenbapar. Agradeço aos demais professores do departamento e aos técnicos dos laboratórios, Mitiyo F. e Otacílio P.

Com muito amor agradeço a minha família. Vocês sempre estiveram ao meu lado em qualquer escolha que eu fizesse, com muito apoio, compreensão e incentivo. Seguirei batalhando para que eu continue sendo motivo de orgulho a vocês. Sou muito grata a minha mãe Rosemary Z., minha avó Isabela Z. e meu tio Roy B. Sem vocês eu não teria chegado até esta etapa. Em memória: meu querido amigo Tyr e minha querida tia Maria – vocês foram exemplos de persistência e superação, obrigada pelas lições de vida.

Ao meu amado companheiro Mario B., que com carinho e compreensão me incentivou durante esta caminhada. A tua presença foi fundamental para que eu seguisse adiante nos momentos difíceis.

Com muito carinho agradeço a Joyce G. Você é uma grande amiga que conquistei nesse árduo caminho, sempre companheira nos bons e maus momentos. Sempre disposta a me ajudar em qualquer que fosse a situação, dentro e fora do laboratório. No dia em que defendi meu TCC, meu orientador, José T., proferiu a seguinte frase: “sem os amigos não conseguiríamos seguir adiante na pós-graduação”. Tenha a certeza, minha amiga, que eu não teria conseguido finalizar esta etapa sem a sua ajuda. Muito obrigada!

Muita gratidão a Mario B. e Lourdes B., que carinhosamente e gentilmente me acolheram, além de se preocuparem comigo como uma filha.

À Maria C., pela amizade e que, durante esta caminhada, carinhosamente se preocupou comigo como uma filha. Gratidão!

Ao Renan C., com quem pude, desde os tempos do EM, trocar momentos de pura aleatoriedade e descontração, e quem, neste último, ano sempre me incentivou a seguir em frente e rindo.

À Alessandra C., pela ajuda inicial com as minhas dúvidas em cálculo, pela amizade e proximidade à minha família, neste período.

Ao Victor R., que aos 40 minutos do segundo tempo apareceu com a sua torcida, o que significou muito para mim.

Por fim, agradeço ao povo brasileiro. A vocês retorno esta pesquisa, como uma forma de contribuição ao avanço de nosso país.

“Quando aceitamos nossos limites, conseguimos ir além deles.”

Albert Einstein

RESUMO

A importância comercial do cacau se deve à popularidade do chocolate. No processo de sua produção geram-se muitos resíduos, os quais, se descartados sem qualquer tratamento, tornam-se um problema ambiental e econômico. A casca de cacau, por outro lado, possui composição físico-química de interesse ao desenvolvimento do fungo *Aspergillus niger*, associado à síntese de compostos bioativos – tais como o ácido cítrico (AC) e o ácido elágico (AE). A motivação da presente pesquisa reside no interesse pela produção de biomoléculas de interesse comercial, por meio da caracterização físico-química parcial da casca de cacau e a exploração das suas potencialidades em vias fermentativas. A casca foi utilizada como suporte e fonte de carbono para a produção de AC em fermentação no estado sólido (FES). Linhagens do gênero *A. niger* foram testadas para encontrar a melhor cepa produtora. Realizou-se a produção de AC durante 168 horas com a cepa de *A. niger* LPB B6 (CCT 7717). Foram acompanhados os parâmetros de pH, umidade e a análise de açúcares redutores e totais. O pico de produção foi alcançado em 72 horas, neste momento, a cepa apresentou uma produtividade expressiva – de 13,59 g AC kg⁻¹ h⁻¹, acumulando 978,52 g AC kg⁻¹ de casca de cacau seca. O rendimento do processo foi de 0,8542 g AC kg⁻¹ de substrato, superando os maiores relatos de produção contidos na literatura. Para o AE, foi quantificada, em análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a concentração de 0,0272 mg g⁻¹ de casca de cacau. Objetivando elevar a concentração de AE através da bioconversão microbiana, linhagens do gênero *Aspergillus* foram selecionadas em fermentação submersa com meio de cultivo contendo extrato da casca de cacau. A cepa com melhor resultado, *A. niger* LPB B6 (CCT 7717), apresentou produção de 0,1511 mg AE g⁻¹ de casca de cacau. Em seguida, outra fermentação submersa foi realizada. O meio foi constituído por extrato de casca de cacau suplementado com suco de romã – em diferentes proporções – para avaliar seu potencial como agente indutor de produção. A concentração de AE mais expressiva foi de 0,0861 mg g⁻¹ em meio contendo suco de romã e extrato da casca de cacau (3:17). Uma extração em fase sólida (SPE) foi realizada para a clarificação das amostras fermentadas, em etapa prévia às análises em CLAE. Duas colunas de sílica adsorvente de porosidades diferentes foram testadas, quando a coluna com maior porosidade apresentou resultado mais satisfatório. Após a passagem do solvente de eluição e posterior concentração em estufa a vácuo, o conteúdo recuperado (46%) apresentou concentração de 2,3 mg AE g⁻¹ de casca de cacau. Por meio da produção dessas duas biomoléculas, evidenciou-se o potencial da casca de cacau como substrato durante um processo fermentativo. Testes devem ser continuados, tendo em vista os resultados obtidos, para a otimização da produção de AE em fermentação submersa, bem como para a SPE. É relevante ressaltar que ainda não existem registros na literatura indicando a produção de AC e AE utilizando como substrato a casca de cacau.

Palavras-chave: Casca de cacau. Ácido cítrico. Fermentação no estado sólido. Ácido elágico. Fermentação submersa. Extração em fase sólida.

ABSTRACT

The commercial importance of the cocoa is due to the popularity of the chocolate. In the process of its production a lot of residue is produced, which, if discarded without treatment, can become an ambiental and economical problem. The cocoa husk, in turn, has an interesting physical-chemical composition for the *Aspergillus niger* growing, that is associated to the synthesis of bioactive compounds – such as the citric acid (CA) and the ellagic acid (EA). The motivation of the present research resides in the interest for the production of commercial biomolecules, by the partial physical-chemical characterization of the cocoa husk and the exploration of its potentials in fermentative process. The cocoa husk was utilized as a support and carbon source for the CA production in solid state fermentation (SSF). Strains of the genre *A. niger* were tested to find the most productive strain. A study about the CA production was executed during 168 hours with the *A. niger* LPB B6 (CCT 7717) strain. Parameters such as pH, humidity and the analysis of reducing and total sugars were observed. The peak of production was reached at 72 hours. At this point, the strain showed an expressive productivity – of 13.59 g CA kg h⁻¹, accumulating 978.52 g CA kg⁻¹ of dried matter. The yield was 0.8542 g CA kg⁻¹ of substrate, surpassing the highest rates reported in literature about CA production. For the EA, it was quantified, with a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, a concentration of 0.0272 mg g⁻¹ of cocoa husk. With the objective of elevating the concentration of EA by bioconversion, strains of the genre *Aspergillus* were selected by submerged fermentation in cultivation medium containing cocoa husk extract. The strain yielding best results, the *A. niger* LPB B6 (CCT 7717), exhibited production of 0.1511 mg EA g⁻¹ of cocoa husk. Afterwards, another submerged fermentation was conducted. The medium consisted in cocoa husk extract supplemented by pomegranate juice – in different proportions – to evaluate its potential as an inductor of production. The most expressive concentration of EA was 0.0861 mg g⁻¹ in medium containing pomegranate juice and cocoa husk extract (3:17). A solid phase extraction (SPE) was performed with the fermented samples as a clean-up step prior to the analysis with HPLC. Two silica adsorbent cartridges of different porosities were tested, in which the cartridge with superior porosity showed better results. After the passage of the elution solvent and its later concentration in the vacuum heating chamber, the recovery content (46%) showed a concentration of 2.3 mg EA g⁻¹ cocoa husk. Through the production of these two biomolecules, it evidenced the cocoa husk potential as a substrate during a fermentative process. Tests must be continued, considering the results obtained, to optimize the production of EA in submerged fermentation, as well as to the SPE. It is relevant to emphasize that there is no record in literature about the production of CA and EA in which cocoa husk is conducted as substrate.

Key-words: Cocoa husk. Citric acid. Solid state fermentation. Ellagic acid. Submerged fermentation. Solid phase extraction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2	OBJETIVOS.....	15
	CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1	CACAU	16
1.1	RESÍDUOS DO CACAU.....	17
1.2	APLICAÇÕES DIVERSAS PARA OS SUBPRODUTOS DO CACAU.....	19
2	ÁCIDO CÍTRICO	24
2.1	DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS.....	24
2.2	TÉCNICAS DE PRODUÇÃO.....	25
2.3	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO CÍTRICO.....	27
2.4	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>Aspergillus niger</i>	28
2.5	FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO.....	31
2.6	SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO.....	34
3	ÁCIDO ELÁGICO	35
3.1	DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS.....	35
3.2	SÍNTESE DO ÁCIDO ELÁGICO.....	39
3.3	PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO.....	40
3.4	FONTES NATURAIS DE ÁCIDO ELÁGICO.....	41
3.5	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO ELÁGICO.....	42
3.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO.....	44
	CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU	46
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1	CASCA DE CACAU.....	48
2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE CACAU.....	48
2.2.1	Cinzas e Umidade.....	49
2.2.2	Atividade de água e pH.....	49
2.2.3	Açúcares redutores.....	49
2.2.4	Proteínas solúveis.....	49
2.2.5	Cátions e ânions solúveis.....	50

2.3	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	50
2.3.1	Escolha de cepas produtoras de ácido cítrico em fermentação no estado sólido.....	50
2.3.2	Determinação da concentração de ácido cítrico.....	51
2.3.3	Produção de ácido cítrico em função do tempo.....	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE CACAU.....	53
3.2	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	56
3.3	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	57
	CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	62
1	INTRODUÇÃO.....	62
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1	CASCAS DE CACAU.....	64
2.2	PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU.....	64
2.2.1	Determinação da concentração de ácido elágico produzida a partir de extrato aquoso de cacau.....	66
2.4	PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ.....	66
2.4.1	Produção de ácido elágico em fermentação no estado sólido a partir de casca de cacau suplementada com casca de romã.....	67
2.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO PRODUZIDA A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ.....	68
2.5.1	Teste de solubilidade do padrão de ácido elágico.....	69
2.6	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM FASE SÓLIDA.....	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1	PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU.....	72
3.2	PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ.....	74
3.2.1	Produção de ácido elágico em fermentação no estado sólido a partir de casca de cacau suplementada com casca de romã.....	75

3.2.2	Teste de solubilidade do padrão de ácido elágico.....	75
3.3	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM FASE SÓLIDA.....	77
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
	CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	81
	CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Comercialmente, a importância do cacau se deve à produção do chocolate. Durante décadas, após a retirada das amêndoas, as partes restantes do fruto (polpa/mucilagem, cascas das amêndoas e cascas do fruto) permaneciam nas fazendas cacaeiras sem qualquer tipo de tratamento ou quaisquer precauções com relação à proliferação de doenças prejudiciais à própria cultura do cacau. O Brasil, na década de 90, quase teve toda a sua cultura cacaeira extinta por conta da ausência de cuidados desta natureza (FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993).

Investigações acerca da composição dos resíduos do cacau e suas possíveis aplicações têm surgido discretamente. A casca do fruto do cacau está entre estes resíduos, porém ainda são poucos relatos sobre a sua composição. O que se tem conhecimento é que mais de 40% da composição da casca refere-se à fração pectínica e aproximadamente 35% refere-se à estrutura lignocelulósica (ADAMAFIO, 2013). O teor de proteínas pode variar até 18 g 100 g⁻¹, e o conteúdo de açúcares geralmente se encontra na faixa de 3 g 100 g⁻¹ além do conteúdo mineral e também de compostos fenólicos (ADOMAKO, 1972; BONVEHÍ; COLL, 1999).

Por apresentar nutrientes de interesse para o desenvolvimento de microrganismos, as cascas, quando descartadas de forma inadequada no ambiente, rapidamente iniciam o seu processo de decomposição. Além do ponto de vista ambiental, a utilização dos resíduos agroindustriais em processos fermentativos apresenta potencial econômico. A exploração desses resíduos visa uma maior produtividade e menor custo, pois são materiais de disponibilidade ao longo do ano e em grandes volumes. Isso traz como possibilidade o emprego desses resíduos como substrato e suporte em fermentação no estado sólido (FES) para a produção de biomoléculas, a exemplo dos ácidos orgânicos.

Os ácidos orgânicos são caracterizados pela estrutura molecular composta de grupos carboxílicos. Normalmente são encontrados em frutas, e industrialmente são aplicados como agentes antioxidantes, reguladores de acidez, atuando na estabilidade e manutenção da qualidade final do produto.

O ácido cítrico (AC) é um ácido mundialmente conhecido e amplamente aplicado em diversos segmentos industriais, com aplicações desde a indústria de alimentos até o tratamento de efluentes. Isso se deve à versatilidade do ácido, considerado uma substância segura e biodegradável, e também pelo alto volume de produção. Atualmente, a produção em escala industrial se realiza pelo processo de fermentação submersa com o uso do fungo

Aspergillus niger, é o microrganismo com a maior capacidade de acúmulo de AC por proporcionar fácil manipulação e adaptação a condições e substratos variados.

Com a descoberta da sua potencial atividade antioxidante – uma propriedade comum aos compostos polifenólicos – o ácido elágico (AE) é, atualmente, visado pela indústria para aplicações em cosméticos, fármacos e em alguns alimentos considerados nutracêuticos, ou na forma de agente conservante. Porém, sua produção ainda é baixa devido à estrutura complexa e ao elevado custo do processo de obtenção por métodos convencionais, sendo, por isso, estudada a possibilidade de produção por microrganismos. Com alta biodisponibilidade, estudos evidenciam que a romã é a fruta que armazena maiores quantidades do ácido, sendo largamente encontrado em frutas *berries* como morangos, amoras e framboesas. Pode ser encontrado também em nozes e castanhas, assim como em madeiras utilizadas para o envelhecimento de bebidas.

A presente pesquisa pertence à Rede Biocau, que consiste na integração dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia para promover o desenvolvimento científico, tecnológico, de inovação e formação de recursos na cadeia produtiva do cacau com o auxílio financeiro da CAPES. Em parceria, as Universidades Federal do Paraná, Federal do Pará e Estadual de Feira de Santana desenvolvem quatro subprojetos: o apoio à formação de recursos humanos e inovação (subprojeto 1), aproveitamento da casca de cacau (subprojeto 2), identificação da diversidade microbiana (subprojeto 3) e a fermentação controlada das amêndoas do cacau (subprojeto 4). A “Produção de ácidos orgânicos (cítrico e elágico) a partir de casca de cacau” está inserida no subprojeto 2, e como mencionado, as universidades realizam as pesquisas em conjunto, dessa maneira ocorre a troca de conhecimentos e de técnicas, e ao final, apresentará um retorno à nossa cultura cacaueira com os dados pertinentes para a melhoria de toda a cadeia produtiva.

O Capítulo de Revisão apresenta dados e informações gerais sobre o cacau e seus resíduos, composição química e exemplos de aplicações diversas aos resíduos. Para o AC, são apresentadas suas características, aplicações, e técnicas de produção com enfoque na fermentação em estado sólido (FES), as preferências do *Aspergillus niger* para o seu desenvolvimento e metabolismo de produção do ácido. Para o AE são apresentadas as características e definições gerais sobre as classes de taninos e sobre o AE, seus efeitos biológicos, fontes naturais, síntese por via sintética e via biotecnológica, e técnicas analíticas para sua quantificação.

Esta pesquisa foi motivada pelo fato de a casca de cacau apresentar composição físico-química que pode favorecer o desenvolvimento do processo por fermentação submersa

ou fermentação no estado sólido. Ainda não existem relatos na literatura sobre a produção desses ácidos orgânicos – cítrico e elágico – a partir de casca de cacau. Dessa forma, o presente trabalho visa à caracterização físico-química parcial da casca de cacau e a exploração das suas potencialidades para a produção de biomoléculas de interesse comercial.

1.2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Investigar o potencial da casca de cacau como substrato/suporte na produção de ácidos orgânicos de interesse comercial.

- Objetivos Específicos

- Caracterizar parcialmente a casca de cacau por meio de análises físico-químicas;
- Testar a viabilidade de uso da casca como fonte de carbono em fermentação no estado sólido e em fermentação submersa;
- Testar cepas do gênero *Aspergillus niger* pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia para a produção de AC;
- Quantificar o AC produzido em fermentação no estado sólido utilizando casca de cacau como única fonte de carbono, acompanhando o metabolismo do microrganismo selecionado através da produção de AC em função do tempo;
- Selecionar cepas do gênero *Aspergillus* pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia para a produção e quantificação de AE em fermentação submersa utilizando extrato de casca de cacau como única fonte de carbono, e posterior suplementação com suco de romã como indutor de produção.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 CACAU

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é o fruto da árvore cacaueira (FIGURA I.1) pertencente à família *Malvacecea* e cuja origem remonta à América Central e América do Sul. Existem dois grandes grupos de cacau, o *Criollo* e o *Forastero*. O Brasil cultiva e exporta a variedade *Amelonado*, de sabor suave e atraente ao paladar europeu (OETTERER et al., 2006; CEPLAC, 2016).

FIGURA I.1 – ÁRVORE CACAUEIRA DE *Theobroma cacao*



FONTE: UNICAMP (2017).

Para a promoção de um desenvolvimento adequado dos frutos do cacaueiro, algumas condições ambientais a favorecem, notadamente: climas tropicais, cujas temperaturas permanecem entre 18 °C e 32 °C e umidade em torno de 70% e 90% – sendo o volume de chuva bem distribuído ao longo do ano. As amêndoas são fermentadas por microrganismos naturalmente presentes no fruto que produzem metabólitos variados durante oito dias. Esses metabólitos promovem alterações bioquímicas que desencadeiam a formação de precursores aromáticos após a torrefação das amêndoas, responsáveis pelas características sensoriais do chocolate (SCHWAN; WHEALS, 2004; APROTOSOAIE; LUCA; MIRON, 2016). Na FIGURA I.2 podem ser observadas as amêndoas do cacau ainda envoltas pela mucilagem, que são expostas através de um corte transversal do fruto do cacau.

FIGURA I.2 – CORTE TRANSVERSAL DO FRUTO DO CACAU



FONTE: SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (2017).

O mercado consumidor do chocolate é crescente, principalmente na União Europeia e América do Norte, apresentando um consumo anual de 1,7% e 3,6%, respectivamente (AFOAKWA, 2010; FAO, 2017). A produção mundial de cacau para a safra 2015/16 é estimada em mais de 4 milhões de toneladas. A Costa do Marfim, o Gana e a Nigéria são os maiores produtores do fruto, sendo que 70% do total da produção, nestes países, advêm de pequenos produtores (DONALD, 2004; FRANZEN; MULDER, 2007). Por esse motivo trata-se de uma *commodity* de grande importância econômica para os países africanos. O Brasil, por sua vez, é o quinto produtor mundial, com destaque de produção dos estados da Bahia e do Pará. Na safra de 2016, a Bahia alcançou uma produção de 101.308 toneladas, e o estado do Pará, que recentemente tem ascendido em produtividade, atingiu 118.400 toneladas. No ano de 2016, a Bahia sofreu com forte estiagem, o que acabou favorecendo o Pará, com projeção de produção para a próxima safra de 110 mil e 120 mil toneladas, respectivamente (CEPLAC, 2017; SBDA, 2017).

1.1 RESÍDUOS DO CACAU

Para a produção do chocolate e demais produtos de menor valor agregado – manteiga de cacau, cacau em pó e licor de cacau – é gerado um volume muito grande de resíduos, dos quais são descartadas as cascas do fruto inteiro, as cascas das amêndoas e a polpa ou mucilagem. Aproximadamente 80% do peso do fruto seco corresponde aos resíduos, utilizados para a fertilização da própria lavoura; porém, o descarte ocorre de forma inadequada sem tratamento prévio. Tal prática resulta na propagação de doenças para a

cultura do cacau, como é o caso da “vassoura-de-bruxa” (FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993).

A maior parte dos resíduos é constituída por uma fração abundante de celulose, lignina e pectina. Foram encontrados aproximadamente 209 g kg⁻¹ de lignina insolúvel em ácido, 128 g kg⁻¹ hemicelulose e 262 g kg⁻¹ de celulose (ALEMAWOR et al., 2010) e aproximadamente 45% de polissacarídeos pécicos nas cascas (KRISHNA; CHANDRASEKARAN, 2013). Para elucidar as diferenças de composição entre os resíduos do cacau, Adamafio (2013) listou a porcentagem dos compostos principais, apresentados na TABELA I.1.

TABELA I.1 – COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS DE CACAU

MATERIAL	PROTEÍNA (%)	FIBRA (%)	GORDURA (%)	CARBOIDRATO NÃO CELULÓSICO (%)	ENERGIA TOTAL (MJ kg ⁻¹)
Casca do fruto	6,8 – 10	24 – 35,4	1,6 – 2,4	46,6	10,7
Torta das amêndoas	15,1 – 28,6	5,8 – 10,3	5,5 – 16,5	42,1	7,0
Casca das amêndoas	14,5 – 21,6	17,4 – 20,9	3,1 – 5,2	40,6	5,1

FONTE: Adaptado de ADAMAFIO, 2013.

Há um crescente interesse na utilização desses resíduos para a geração de energia e biocombustíveis – o que tornaria a cultura do cacau sustentável econômica e ambientalmente (DELLA; KÜHN; HOTZA, 2005). Oddoye et al. (2013) listaram outros produtos que podem ser obtidos a partir de frações variadas do resíduo de cacau, apresentados no QUADRO I.1.

QUADRO I.1 – PRODUTOS QUE PODEM SER OBTIDOS DOS RESÍDUOS DE CACAU

SUBPRODUTO	FONTE
Goma	Cascas, folhas
Carvão ativado	Cascas
Fibra dietética	Cascas
Enzima pectinolítica	Cascas
Metilxantina	Cascas, folhas e amêndoas
Teobromina	Cascas e amêndoas
Compostos polifenólicos	Cascas, folhas e ramos
Painel de partículas	Cascas
Óleos essenciais	Folhas, flores e cascas
Adubo	Cascas
Biogás	Cascas

FONTE: ODDOYE; AGYENTE-BADU; AKOTO (2013).

Na literatura também são relatadas propriedades medicinais dos resíduos do cacau, tais como atividade antioxidante e antitumoral (PREZA et al., 2010; KHAN et al., 2015), antimicrobiana (SMULLEN et al., 2007) e antiviral (KAMEI et al., 2015). Apesar do fruto do cacau ser utilizado com a finalidade medicinal há mais de 3 mil anos, os estudos e aplicações direcionados às potencialidades presentes nos resíduos ainda são pouco explorados.

1.2 APLICAÇÕES DIVERSAS PARA OS SUBPRODUTOS DO CACAU

Para o aproveitamento dos nutrientes remanescentes dos resíduos de cacau existe a possibilidade de sua aplicação em ração animal. Oddoye et al. (2010) desenvolveram ração para suínos em fase de crescimento a partir de casca de cacau úmida. 20 suínos em fase de crescimento foram alimentados com três dietas: a primeira com 250 g de casca de cacau seca (controle), a segunda com 200 g de casca de cacau úmida e a terceira com 300 g de casca de cacau úmida por 140 dias. As dietas não afetaram de forma significativa o ganho de peso, o consumo diário e a conversão alimentar. Os suínos consumiram toda a ração oferecida, o que significa que ela é palatável aos mesmos. A terceira dieta tornou-se mais cara que as demais visto que, dado ao alto custo do concentrado utilizado, havendo o aumento da quantidade de casca fresca, aumenta, também, a demanda em suprir os outros nutrientes necessários. Isto porque a casca possui baixo teor de energia metabolizável, por conter alto teor de fibra, o que exige um concentrado com alto nível de nutrientes.

Como alternativa às fontes não renováveis de energia, o emprego da biomassa de resíduo agroindustrial surge como alternativa sustentável, sendo, porém, necessárias as análises dos fundamentos de combustão direta, pirólise e digestão anaeróbica para uma discussão sobre a satisfatoriedade do seu desempenho (BATISTA et al., 2015). Em seu trabalho, Syamsiro et al. (2012) utilizaram a casca de cacau como uma fonte de energia renovável para averiguar o comportamento dela em uma câmara. A casca moída foi carbonizada a 400 °C por 2 horas e, como resultado, obtiveram um alto aquecimento (17 MJ kg⁻¹) com elevado conteúdo de cinzas.

Os resíduos de cacau são interessantes à indústria de cosméticos devido aos seus elevados teores de compostos fenólicos e antioxidantes, que agem de forma positiva contra radicais livres e sinais de envelhecimento em tratamentos dermatológicos. Karim et al. (2016) testaram a eficácia do extrato da casca do cacau como um gel redutor dos sinais de rugas na superfície da pele. No extrato foram encontrados, através da detecção em cromatografia líquida acoplada a um espectro de massas: ácido málico, dois flavonoides procianidinas B1 e

C2, ácido rosmarínico, dimetil ácido elágico e a flavona anabinosil-glucosil-apigenina – que contribuem para o efeito funcional do cosmético. A concentração efetiva dos extratos (50%) foi determinada e aplicada em uma formulação em gel. Suas doses, com propriedades funcionais e não tóxicas para as células, continham mais de 60% de água na composição e, pelo menos, 10% do extrato da casca de cacau, o que, segundo os autores, é uma concentração suficiente para inibir os efeitos da colagenase e elastase na pele. Testadores receberam o gel em estudo para aplicação no lado direito da face e um gel sem o extrato e demais compostos ativos (placebo) para a aplicação do lado esquerdo da face. Após cinco semanas de aplicação, a hidratação e os sinais de rugas na pele melhoraram em torno de 13% comparados aos efeitos do placebo, o que atesta o potencial de uso do extrato de casca de cacau como um agente anti-idade.

Uma boa alternativa de uso dos resíduos do processamento do cacau é a fertilização do solo, devido à elevada concentração de minerais presentes nas cascas. Sodré et al. (2012) realizaram um estudo de caracterização do extrato orgânico resultante da compostagem da casca de cacau e uma avaliação de aplicabilidade do extrato como um fertilizante de potássio para o solo no crescimento de mudas do cacaueiro. Ensaios foram realizados com dosagens que variaram de zero a 1000 mg de potássio dm^{-3} de solo homogêneo ao extrato, sendo a quantidade de extrato necessária calculada de acordo com a análise química da presença de potássio no extrato da casca de cacau (em torno de $145,9 \text{ g kg}^{-1}$). Após 120 dias o solo apresentou mudanças: elevaram-se os teores de Ca, Mg, K e Zn e o seu pH, bem como, houveram reduções nos teores de Al e Fe. Para o cultivo do cacaueiro, os autores concluíram que é viável o uso do extrato obtido a partir da casca de cacau como fonte de potássio, na concentração de $391,6 \text{ mg de potássio dm}^{-3}$ de solo para a fertilização.

A casca de cacau também é utilizada como um adubo para a jardinagem, mantendo a temperatura e a umidade do solo, fornecendo nitrogênio e emanando aroma de chocolate. No entanto, o aroma acaba atraindo animais de estimação o que pode ser perigoso, pois os resíduos contêm teobromina – tóxica aos pequenos animais. Com respeito à toxicidade da teobromina, Adamafo (2013) fez uma comparação entre os níveis de concentração do composto nos diferentes resíduos do cacau, dispostos na TABELA I.2.

TABELA 1.2 - CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA EM RESÍDUOS DE CACAU

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA (g kg ⁻¹)
Casca de cacau	1,5 – 4
Torta de amêndoas de cacau	20 – 23
Casca das amêndoas de cacau	5 – 21
Amêndoas fermentadas	23 – 29
Amêndoas não fermentadas	31 - 38

FONTE: Adaptado de ADAMAFIO, 2013.

As gomas são amplamente empregadas na indústria química de polímeros e também na indústria de alimentos. Diniz, Druzian e Audibert (2012) produziram goma xantana utilizando a casca de cacau como fonte de carbono para a fermentação com a bactéria *Xanthomonas campestris*. Além da fonte de carbono, o meio foi composto por potássio e nitrogênio, mantido a 25 °C e agitação de 250 rpm por 120 horas. A casca mostrou-se viável como substrato para a produção da goma, apresentando concentração de 4,99 g l⁻¹ contra 2,33 g l⁻¹ do meio utilizando sacarose.

Resíduos do cacau também apresentam compostos com propriedades antiplaca bacteriana dos dentes, o que desperta o interesse em produzir, a partir deles, soluções orais e cremes dentais com o agradável sabor do chocolate. Smullen et al. (2007) testaram a habilidade dos extratos de cacau não fermentado e de outras plantas na inibição de placa bacteriana, em modelo *in vitro*, utilizando dente bovino em um meio líquido contendo *Streptococcus mutans*. Os extratos das plantas inibiram o crescimento da bactéria, e o extrato de cacau não fermentado apresentou inibição de glucana bacteriana de 14,5%.

Em conjunto com outros microrganismos, *Streptococcus mutans* é o principal causador de cáries e biofilmes bacterianos. Em apenas um único uso, as escovas de dente podem ser contaminadas por diversas espécies de microrganismos que permanecem ativos por até uma semana. Na busca de uma alternativa para esta questão de armazenamento de escovas de dente, Badiyani et al. (2013) desenvolveram uma solução desinfetante para a limpeza de escovas de dente utilizando extrato da casca das amêndoas de cacau com concentração final de 1 mg ml⁻¹. Para as análises, a cabeça de cada escova foi retirada e imersa em grupos de tubos esterilizados contendo tampão fosfato pH 7,4 e outro contendo extrato. Os resultados mostraram uma redução de aproximadamente 32% de *Streptococcus mutans* no grupo contendo o extrato da casca, demonstrando dois tipos de substâncias cariostáticas: um anti-glucosiltransferase e outro anti-atividade bacteriana.

A pectina é o principal interesse dos países importadores de resíduos de cacau, devido a sua presença em quantidade abundante principalmente na casca. Chan e Choo (2013)

realizaram extrações de pectina em variações de tempo, temperatura e grau da substância extrativa, com precipitação em etanol 70%. O maior rendimento de pectina (7,6%) foi com ácido cítrico (1:25 m/v) em pH 2,5 a 95 °C por 3 horas; neste caso, as pectinas obtidas foram de baixa metoxilação. Mollea, Chiampo e Conti (2008), por sua vez, extraíram pectinas de alto grau de metoxilação em cascas de cacau provenientes de Gana e Venezuela. As extrações foram realizadas em temperatura de 95 °C com variação de tempo e pH; a precipitação de pectina ocorreu em etanol 99,8%. A casca proveniente de Gana obteve rendimento próximo a 9% (ácido anidrogacturônico) em pH 2,5 após 1 hora, e a casca proveniente da Venezuela obteve rendimento próximo a 8% (ácido anidrogacturônico) em 1 hora de extração com pH 1. Barazarte, Sangronis e Unai (2008) também investigaram as condições de extração de pectina da casca de cacau e suas características. Eles utilizaram EDTA com variações de pH e temperatura, e posterior precipitação em etanol 70%. O maior rendimento (4,56 g 100 g⁻¹) ocorreu em pH 5 a 90 °C. Os autores concluíram que as variáveis temperatura e pH influenciam nas características das pectinas obtidas: em altas temperaturas de extração as pectinas apresentam melhor qualidade.

A coloração das amêndoas de cacau está diretamente relacionada aos compostos fenólicos presentes e também aos açúcares redutores que influenciam durante o processo de fermentação. Arlorio et al. (2005) utilizaram as cascas das amêndoas de cacau como matéria-prima. Empregaram o uso da extração de fluido supercrítico com CO₂ para extrair frações fenólicas pigmentadas com posterior caracterização. Em uma caracterização prévia, as cascas das amêndoas apresentaram uma concentração de 18,2 g kg⁻¹ de compostos fenólicos em peso seco, aproximadamente 1,8% do total de compostos, pelo método de *Folin Ciocalteu*. Após uma extração supercrítica as frações obtidas apresentaram uma discreta contaminação por lipídeos. Os extratos foram dissolvidos em diferentes solventes para a análise de atividade antioxidante. O extrato que apresentou melhor resultado foi o metanólico (1:500), com percentual de inibição de 96,5%, o qual era proveniente de Gana. Os autores sugerem a aplicação, de forma segura, dos pigmentos das cascas das amêndoas de cacau na tecnologia de alimentos como um corante funcional ou como um complexo de antioxidantes. Tu (2016) testou a estabilidade dos pigmentos da casca de cacau em algodão, como um corante natural. Os pigmentos possuem boa resistência em pH 6,4, os íons metálicos aumentam a fixação do corante no tecido. O autor constatou que a melhor condição ambiental para a coloração do tecido foi acima de 100 °C durante 1 hora.

Além das cascas de cacau, a polpa também é resíduo obtido durante a retirada das amêndoas para a produção de chocolate. Denominada regionalmente como “mel” de cacau,

consiste em um líquido extraído da polpa ou mucilagem, que envolve as amêndoas do cacau. Santos (2012) utilizou este resíduo em sua dissertação com o objetivo de formular uma geleia com “mel” de cacau; uma formulação padrão de controle conteve sacarose e, às outras formulações, foram adicionados diferentes edulcorantes. Os resultados mostraram aproximadamente 70% de umidade, pH entre 3,9 e 4,15, o maior teor de pectina ficou em 1,46 g 100 g⁻¹. No teste de intenção de compra e preferência da análise sensorial, a formulação que conteve acessulfame de potássio e sucralose obteve maior aceitação e a melhor textura na análise física. Com relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, Endriyani et al. (2016) encontraram os seguintes valores para a polpa de cacau sem tratamento: 103,76 mg de GAE 100 g⁻¹ de polpa para compostos fenólicos; capacidade de absorção de oxigênio de 1871 μmol TE 100 g⁻¹ de polpa; e atividade antioxidante celular de 23,71 μmol QE 100 g⁻¹ de polpa. São necessários estudos contínuos para que se possam provar possíveis ações benéficas desse subproduto do cacau para a saúde.

A casca de cacau também é interessante de um ponto de vista ecológico, visto que suas propriedades físicas e químicas podem auxiliar na remoção de compostos indesejáveis em efluentes de indústrias. Krishna (2014) utilizou a casca de cacau para atuar como um carvão ativado na remoção de corante na água residual da indústria têxtil. A casca foi quimicamente ativada (ZnCl₂, K₂CO₃ e KOH), carbonizada e o tamanho dos poros ficou entre 0,25 – 0,5 mm e 0,5 – 1 mm. Durante o teste de ativação com o valor de pH entre 6 e 7 e concentração de carvão entre 0,5 e 1 g l⁻¹, o melhor desempenho foi com o ZnCl₂ (780 m² g⁻¹) devido a melhor área de contato, melhor porosidade (0,58 m³ g⁻¹) e menor conteúdo de cinzas (aproximadamente 6%), atingindo 86% de conteúdo de carvão ativado. Bello e Ahmada (2011) também testaram a casca de cacau como um agente de remoção de corante presente em efluente têxtil (*Remazol Brilliant Black Reactive*). A casca, com tamanho de partícula entre 1 e 2 mm, foi ativada com reativo Orange e carbonizada a 500 °C e 700 °C em uma segunda etapa. A cinética demonstrou se tratar de um agente eficiente na adsorção, com uma adsorção máxima de 111 mg g⁻¹ – sendo uma reação endotérmica de 22,6 kJ mol⁻¹ fisicamente controlável.

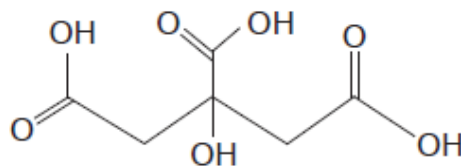
2 ÁCIDO CÍTRICO

2.1 DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS

O ácido cítrico (AC) é o ácido orgânico conhecidamente mais antigo e com maior diversidade de aplicação mundial. O seu descobrimento data de 1784, quando Scheele alcançou seu isolamento a partir do suco de limão. Quimicamente, o AC foi sintetizado a partir de um derivado de glicerol em 1880 por Grimoux e Adam. E por fim, a primeira via fermentativa de produção em escala industrial foi demonstrada por Currie em 1917 (BEROVIC; LEGISA, 2007; SOCCOL et al., 2017; VANDENBERGHE et al., 2016).

O AC (2-hidroxi-propano-1, 2, 3- ácido tricarboxílico) é um ácido fraco, com baixa toxicidade e solúvel em água, que contém três grupamentos carboxílicos em sua estrutura molecular (FIGURA I.3), e massa molecular de 210,14 Da. O AC apresenta aspecto de cristais brancos que em solução aquosa desempenha um ótimo efeito tamponante, com pH entre 2,5 e 6,5, devido à estrutura admitir três diferentes pKas em temperatura ambiente (pKa 1=3,15; pKa 2=4,77 e pKa 3=6,39, respectivamente) (BLAIR; STAAL, 1991; PAPAGIANNI, 2011).

FIGURA I.3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CÍTRICO



FONTE: PAPAGIANNI (2011).

Com um mercado mundial pujante (US \$ 2,6 bilhões em 2014) a Europa ainda possui a maior parcela de consumo e aplicação do AC, e estima-se que até o ano de 2020 o seu crescimento atinja um valor de 3,6 bilhões de dólares (MARKETS; MARKETS, 2016). As aplicações industriais são diversas (QUADRO I.2), sendo que a indústria alimentícia ainda detém 70% dessa aplicabilidade, pelo motivo do AC ser considerado uma substância segura pelo FAO – WHO Expert Committee on Food Additives (SOCCOL et al., 2006).

QUADRO I.2 – APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DO ÁCIDO CÍTRICO

APLICAÇÃO	AÇÃO
Geleias, gelatinas e balas	Saborizante, ajuste de pH, conservante, controle de açúcar invertido
Alimentos congelados	Prolongamento de <i>shelf-life</i> através de inativações enzimáticas e ação antioxidante
Alimentos enlatados	Manutenção da cor, antioxidante e antimicrobiano
Frutas congeladas	Diminui a deterioração do sabor e aroma
Carnes	Manutenção de cor e odor, anticoagulante
Bebidas	Ajuste de pH, acidez, saborizante, conservante
Sorvetes	Saborizante
Óleos e gorduras	Antioxidante, auxilia na degomagem e desodorização
Alimentação animal	Saborizante, estabilizante de pH gástrico, agente quelante de íons metálicos, aumenta solubilidade e digestibilidade
Produtos fármacos	Estabilizante, conservante, anticoagulante
Cosméticos e detergentes	Agente quelante de íons metálicos e estabilizante de pH
Limpeza de metais	Removedor de oxidação em superfícies metálicas
Tratamento de água/efluentes	Agente quelante de íons metálicos, remoção de algas
Indústria têxtil	Agente quelante de íons metálicos, ajuste de pH
Fertilizantes	Remoção de contaminantes, agente quelante de íons metálicos

FONTE: Adaptado de SOCCOL et al. (2004); BEROVIC; LEGISA (2007); KUBICEK; PUNT; VISSER, (2011); DHILLON et al. (2011a); SOCCOL et al. (2017).

2.2 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO

Antigamente o AC era obtido pela extração direta do limão, tal prática é inviável devido ao baixo rendimento e ao alto custo do processo. Técnicas de fermentação foram desenvolvidas e testadas para a produção de AC por meio de diversos fungos filamentosos, especialmente o *Aspergillus niger*, em processos fermentativos de superfície, fermentação no estado sólido, e fermentação submersa – sendo esta última amplamente aplicada em escala industrial (SOCCOL et al., 2006; VANDENBERGHE et al., 2016). As técnicas de fermentação utilizadas para a produção de AC estão descritas no QUADRO I.3.

QUADRO 1.3 – COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE	FERMENTAÇÃO SUBMERSA	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
<p>Substrato líquido com fluxo contínuo;</p> <p>Baixo custo de energia e investimento;</p> <p>Fermentação em bandejas de alumínio dispostas em estantes em salas apropriadas;</p> <p>Alta demanda de tempo e espaço físico;</p> <p>Sensível a contaminações;</p> <p>Utilizada em indústrias de pequeno/médio porte.</p>	<p>Baixo investimento;</p> <p>Controle de esterilização e parâmetros do processo;</p> <p>Alta demanda de energia e água;</p> <p>Alto rendimento;</p> <p>Dificuldade de recuperação;</p> <p>Geração de resíduos;</p> <p>Técnica utilizada em nível de produção industrial – tanque agitado, <i>airlift</i> e batelada são os biorreatores mais empregados.</p>	<p>Substrato sólido com teor de umidade entre 65-70%;</p> <p>Técnica simples;</p> <p>Uso de resíduos agroindustriais;</p> <p>Baixo custo de energia e investimento;</p> <p>Simula habitat natural do microorganismo;</p> <p>Dificuldade de controle de parâmetros e escalonamento;</p> <p>Geração de baixo volume de resíduos.</p>

FONTE: Adaptado de BEROVIC; LEGISA (2007); DHILLON et al. (2011a); VANDENBERGHE et al. (2016).

A produção industrial de AC iniciou a partir do processo de fermentação em superfície, que consiste no cultivo estático do fungo em um substrato líquido, geralmente realizada em bandejas que propiciam a formação de uma camada micelial. A inoculação pode ser por suspensão de esporos ou esporos em ar estéril, com propagação em aerossol. As condições são: temperatura constante de 30 °C, aeração por circulação de ar estéril, pH próximo de 6, duração entre 8 a 14 dias e retenção pelos micélios de aproximadamente 15% do produto. Durante a recuperação de AC, o micélio passa por um processo de lavagem após a drenagem do caldo fermentado, com posterior prensagem – para extração de maior volume de AC – ou secagem – quando destinado à alimentação animal (SOCCOL et al., 2004; BEROVIC; LEGISA, 2007; PAPAGIANNI, 2007).

A característica principal da fermentação em estado sólido (FES) é a ausência de água livre, onde o microrganismo consegue se desenvolver em substratos sólidos contendo apenas a umidade, absorvida no suporte sólido, adequada para o seu crescimento. O cultivo em meio sólido oferece alternativas de destino aos resíduos agroindustriais, geralmente são substratos baratos e abundantes, com alta quantidade de nutrientes. Esses resíduos, infelizmente, não são descartados de maneira apropriada, contaminando o ambiente e as plantações, favorecendo o aparecimento de pragas (RAMACHANDRAN et al., 2004; CHUNDAKKADU, 2005; VANDENBERGHE et al., 2013).

Por ser um processo relativamente simples, o cultivo sólido é baseado no modelo fermentativo do tradicional *Koji*, uma técnica bastante difundida na Ásia. Ele não requer

equipamentos específicos, conseqüentemente demanda pouca energia, possui menor risco de contaminação por bactérias, melhor circulação de oxigênio e gera menos resíduos se comparado com as demais técnicas. Porém, o controle de parâmetros essenciais e escalonamento são mais difíceis. Ainda assim, a FES favorece a produção de altas concentrações de AC em resposta à rápida assimilação de substrato pelo microrganismo (PANDEY et al., 1999; DHILLON et al., 2011a; SOCCOL et al., 2017).

Atualmente a produção industrial de AC é realizada por fermentação submersa, por se tratar de um processo que permite automatização em larga escala. Geralmente, a produção ocorre em biorreatores do tipo tanque agitado ou coluna de bolhas. Ao meio nutritivo são adicionados sais de amônio ou fosfato e inóculo com taxa de 10^6 esporos/ml de substrato. O pH é ajustado para próximo de 5, a disponibilidade do nível de aeração é elevado, a temperatura é mantida entre 28 °C e 32 °C e a duração média de processo é de 5 a 10 dias (PAPAGIANNI, 2011; VANDENBERGHE et al., 2016).

2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO CÍTRICO

Foi a partir de um meio rico em açúcares que Currie, em 1917, desenvolveu a produção de AC por vias fermentativas através do fungo *Aspergillus niger*, observando que os fungos crescem mais satisfatoriamente em meios cujos níveis de minerais são mais elevados e o pH está em torno de 3. Geralmente, os fungos apresentam uma ampla faixa de temperatura que propicia o seu desenvolvimento, que vai de 20 °C a 55 °C, assim como o pH, que pode variar desde o ácido ao básico, ou seja, entre 2 e 9 (YADAV, 1988; PAPAGIANNI, 2007).

Vários microrganismos podem produzir AC, No entanto, o *A. niger* continua sendo o microrganismo com maior capacidade de acúmulo de AC em escala industrial. Isso se deve à facilidade de manipulação, pois seus filamentos se adaptam a diversos substratos – principalmente substratos sólidos que simulam o seu habitat natural – e também ao fato de possuir a regulação do fluxo glicolítico por enzimas metabólicas, o controle da excreção de AC e sua fácil recuperação (KARAFFA; KUBICEK, 2003; PAPAGIANNI, 2007). Além do *A. niger*, diversos outros fungos e leveduras são capazes de acumular AC, apresentados no QUADRO I.4.

QUADRO I.4 – MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

FUNGOS	LEVEDURAS
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. luchensis</i> , <i>A. phoenicus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A.saitoi</i> , <i>A. flavus</i>	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. catenula</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. intermedia</i>
<i>Penicillium janthinellum</i> e <i>P. restrictum</i>	<i>Hansenula</i> sp.
<i>Absidia</i> sp.	<i>Pichia</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Debaromyces</i> sp.
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Torula</i> sp.
<i>Eupenicillium</i> sp.	<i>Torulopsis</i> sp.
<i>Mucor piriformis</i>	<i>Kloekera</i> sp.
<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.
<i>Ustilina vulgaris</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

FONTE: Adaptado de PAPAGIANNI (2011).

A principal diferença entre a produção de AC por fungos e a por leveduras está no rendimento insatisfatório de AC a nível industrial destas, devido à conversão de boa parte do substrato em ácido isocítrico. Uma alternativa a essa conversão é a seleção de cepas mutantes que desenvolvam baixa atividade de aconitase que regula a produção do ácido isocítrico (SOCCOL et al., 2004).

2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger*

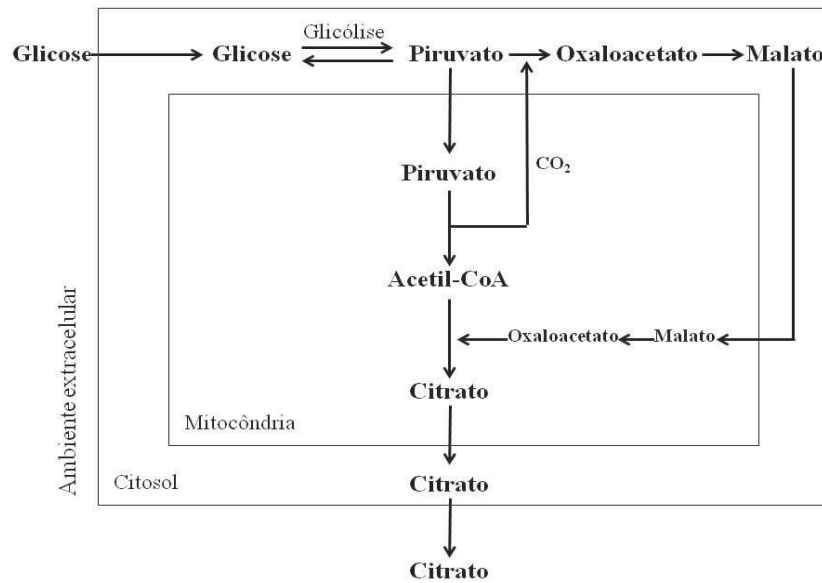
De modo geral, a via metabólica do AC pode ser resumida nas seguintes etapas: assimilação do substrato; degradação da glicose por via glicolítica até a formação de duas moléculas de piruvato; conversão de piruvato até os precursores oxaloacetato e acetil-CoA; condensação dos precursores a AC; e por fim a sua excreção (KUBICEK; PUNT; VISSER, 2011).

O fungo *A. niger* é notadamente reconhecido como o maior produtor de AC. Porém, essa produção pode ser limitada durante a via glicolítica devido à quantidade inicial de glicose e a retirada do produto final. Seu metabolismo apresenta dois transmissores de glicose, um de alta e outro de baixa afinidade, o que explica o mecanismo de difusão simples durante a superprodução de AC. Não é possível a regulação direta da difusão simples, quando a glicose entra por um transmissor positivo a captação de glicose e a concentração de AC são acentuados. Durante a difusão, esses eventos são ajustados conforme a excreção de AC pela relação entre taxa de captação específica e concentração de glicose (BEROVIC; LEGISA, 2007; VANDENBERGHE et al., 2016).

O percurso metabólico de produção de AC começa no citoplasma. O fungo consome substratos variados, com preferência pela glicose, direcionada para as reações em via glicolítica e de pentose fosfato. A produção é iniciada na via de pentose fosfato durante a fase de germinação dos esporos. O acúmulo de AC pela conversão direta de substrato em via glicolítica é iniciado nas primeiras 24 horas e intensificado entre 40 e 50 horas. São nessas fases iniciais de produção que também são acumulados compostos intermediários como poliol e aminoácidos. As duas moléculas de piruvato, originadas da oxidação de uma molécula de glicose, seguem para a mitocôndria desencadeando as reações do Ciclo do Ácido Cítrico (também denominado Ciclo do Ácido Tricarboxílico ou Ciclo de Krebs). Essas duas moléculas de piruvato sofrem descarboxilação até a formação de precursores essenciais para o ciclo, oxaloacetato e acetil-CoA. As moléculas de CO₂ liberadas durante as reações são armazenadas pela ação da enzima piruvato carboxilase, produzida pelo fungo para a síntese destes compostos. Este é um fator positivo que elimina uma volta completa no ciclo, com influência no saldo final, pois eleva o acúmulo de AC e evita o desperdício de substrato. Na via de pentose fosfato poucos carbonos são metabolizados gerando baixo acúmulo de AC (CLELAND; JOHNSON, 1954; LEGISA; MATTEY, 1986; PAPAGIANNI, 2007; MAX et al., 2010).

A FIGURA I.4 esquematiza o fluxo da glicose até a formação de citrato em *A. niger*. Primeiramente, a glicose presente no ambiente extracelular é transportada para o citosol, que por meio da glicólise é convertida em duas moléculas de piruvato. Ainda no citosol, a partir do piruvato é formado o oxaloacetato por intermédio da enzima piruvato carboxilase. Em seguida, ocorre a sua conversão em malato, pela malato desidrogenase. Durante essas reações são produzidos 50% do NADH por via glicolítica. O malato tem papel ativo na superprodução do AC, por atuar no transporte do ácido dentro da mitocôndria (KUBICEK; PUNT; VISSER, 2011; PAPAGIANNI, 2011).

FIGURA I.4 – REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CITRATO



FONTE: Adaptado de KUBICEK; PUNT; VISSER, (2011).

Estima-se que o transporte de moléculas interna e externamente à mitocôndria tenha relação com um alto acúmulo de AC. A enzima citrato sintase, que regula a produção de citrato, situa-se na mitocôndria. O oxaloacetato, por sua vez, é produzido externamente, para, em seguida, ser transferido do citosol para a mitocôndria, onde se iniciam as reações de condensação. Portanto, este mecanismo controla a porcentagem de produção de AC por meio do transporte do citrato para o citosol antes da excreção (KARAFFA; KUBICEK, 2003).

Ao final do ciclo o oxaloacetato é distribuído, tornando possível o recomeço do ciclo através de sua condensação com a molécula de acetil-CoA formando citrato, por meio da citrato sintase, e por fim gerando AC. O ácido sofre reações sequenciais com liberação de duas moléculas de CO₂, o que reestrutura o oxaloacetato para iniciar uma nova volta no ciclo, sendo que, a cada volta, são produzidas duas moléculas de CO₂ e ATP. Para um acúmulo de citrato, a enzima aconitase deve ser inibida pela limitação de concentração de ferro, para assim, o ciclo tornar-se ativo apenas para a formação de citrato (BEROVIC; LEGISA, 2007; MAX et al., 2010).

A biossíntese de AC por *A. niger* é altamente dependente de enzimas regulatórias durante o ciclo. Alvarez-Vasquez, González-Alcón e Torres (2000) estimam que aproximadamente 13 regulações enzimáticas devam ser moduladas para se atingir um aumento de produção de AC.

As enzimas requerem a presença de íons metálicos, os quais exercem uma forma de controle da atividade enzimática. Um alto acúmulo de AC é alcançado quando a enzima α -

cetoglutarato desidrogenase não é produzida em presença de altas concentrações de amônio e glicose. Os íons necessários ao desenvolvimento microbiano conhecidamente são o magnésio e o zinco, sendo afetado pela limitação de fonte de nitrogênio, fostato e quantidades insuficientes de manganês (ANGUMEENAL et al., 2002).

A deficiência de manganês afeta diretamente a ação da fosfofrutoquinase, a qual regula o fluxo glicolítico. No interior da célula a presença de citrato inibe a glicólise; no entanto, sua ação é minimizada em condições favoráveis de componentes inibidores, como é o caso dos íons de amônia. A concentração de amônia possui um forte efeito sobre a fosfofrutoquinase. Essa concentração é aumentada com o processo de decomposição proteica em ambiente deficiente em manganês, o que propicia a formação da “piscina de amônia”, por meio da qual ocorre a inibição da enzima, o que termina favorecendo o acúmulo e transporte de AC (ANGUMEENAL et al., 2002; BEROVIC; LEGISA, 2007; LEGISA; MATTEY, 2007).

Ainda são poucas as respostas acerca da compreensão do percurso bioquímico que ocorre durante a produção de AC por *A. niger*. Atualmente, estudos são direcionados para a engenharia metabólica, tendo em vista as informações sobre a fisiologia dos fungos, mapeamento e identificação dos genomas. Sendo assim, é possível a mediação das atividades enzimáticas e o desenvolvimento de microrganismos fortemente produtores de AC, com melhor adaptação ao processo fermentativo e aos seus parâmetros, a partir da redução da liberação de compostos que interferem nesse acúmulo (SOCCOL et al., 2004).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

De um modo geral, Seviour et al. (2013) elencam os principais pontos para se atingir uma alta produção de AC, dentre os quais estão:

- A) altas concentrações de carbono e de oxigênio dissolvido, aproximadamente 50 g l⁻¹ de açúcares são consumidos pelo fungo por difusão passiva;
- B) baixo pH – em torno de 2,5 – visando impedir a produção de outros ácidos;
- C) concentração – em conformidade com o substrato – de fosfato e limitação de metais pesados, principalmente manganês.

O nível de rendimento da produção é afetado pela quantidade disponível de fonte de carbono, onde, à medida que se aumenta a concentração de açúcares, eleva-se o acúmulo de AC. Os açúcares são facilmente assimilados pelo fungo, com preferência por glicose, frutose e sacarose, para uma rápida produção de AC (MATTEY, 1992). A título de curiosidade,

Karaffa e Kubicek (2003) citam que a partir de 100 g de um substrato açucarado, é possível ser produzido aproximadamente 95 g de AC.

O nível de umidade em (FES) é ajustado de acordo com a composição física da matriz sólida. Os fungos se adaptam melhor a substratos com umidade em torno de 20% a 70%. Um baixo nível de umidade interfere negativamente no crescimento microbiano, da mesma maneira que altera a conformação física das partículas do substrato, o que acarreta um inchaço, o que, por sua vez, compromete a difusão de nutrientes e a estabilidade enzimática. No caso contrário, um nível elevado de umidade promove uma competição com outros microrganismos, ao ponto de limitar as trocas gasosas e gerar uma aglomeração das partículas do substrato (GOWTHAMAN; KRISHNA; MOO-YOUNG, 2001; CHUNDAKKADU, 2005).

A temperatura é outro parâmetro que pode apresentar influência negativa durante o processo fermentativo, seja para o crescimento celular, seja durante a estabilidade enzimática e a produção de biomoléculas. A remoção de excesso de aquecimento gerado pelo metabolismo microbiano durante a FES é impossibilitada pela pouca condutividade térmica presente em um substrato sólido. Para isso, uma melhor oxigenação do ambiente é necessária para a dissipação do calor excessivo (VIESTURS et al., 1981; PANDEY et al., 2001). Além de ter a função principal de dissipar o calor gerado removendo CO_2 , a aeração forçada fornece a quantidade ideal de oxigênio para o crescimento dos microrganismos e auxilia a transferência de umidade entre as partículas porosas do substrato (RAIMBAULT, 1998; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; PRADO; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2005a; RODRIGUES et al., 2013). No caso da aeração por difusão (sem aeração forçada) não há dissipação do calor, o que, em alguns casos, pode prejudicar o processo.

As condições de aeração podem interferir no rendimento final de AC devido ao fato de que o CO_2 é uma molécula importante durante o Ciclo do AC. Derivado das moléculas de piruvato, ele atua para o provimento de oxaloacetato à citrato sintase, que em grandes quantidades pode prejudicar os níveis finais de citrato e biomassa (PAPAGIANNI, 2007). O ambiente fermentativo necessita da presença de oxigênio dissolvido durante a produção de AC. O rendimento aumenta quando a aeração é elevada; caso seja interrompida, a sua influência passa a ser para a produção de biomassa. Em níveis adequados de oxigênio dissolvido, a quantidade de CO_2 fornecida é suficiente para as reações enzimáticas. A enzima piruvato carboxilase age no substrato CO_2 para produzir oxaloacetato, e, posteriormente, para obter o citrato (PAPAGIANNI, 2011).

Outro fator importante é o tamanho de partícula do substrato – geralmente, o tamanho mais adequado está entre 0,6 e 2 mm para FES. Este parâmetro tem relação com a difusão de nutrientes e oxigênio, e interfere, também, na quantidade inicial de substrato disponível para a assimilação do microrganismo. Substratos com partículas grandes possuem a vantagem de melhor aeração do meio, porém limitam o desempenho microbiano; as partículas menores, por outro lado, promovem uma melhor transferência de nutrientes (KRISHNA, 1999; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SOCCOL et al., 2017).

O pH desempenha papel importante na produção de ácidos orgânicos, processo no qual o metabolismo é altamente dependente de reações enzimáticas. Neste sentido, as enzimas atuam em meios com pHs específicos. Andersen, Lehmann e Nielsen (2009) relatam que em pH entre 6 e 8 há um maior favorecimento à produção de ácido oxálico por *A. niger*; em pH próximo a 5,5 ocorre a produção de ácido glucônico e em pH 3 a produção de AC se inicia, sendo o pH ótimo aquele abaixo de 2. Uma produção adequada de AC requer um pH baixo, que dificulte a liberação de ácidos indesejáveis como o oxálico e glucônico, e que, além disso, diminua o risco de contaminação durante o processo.

Os esporos de *A. niger* germinam em um meio com pH em torno de 5. Ao iniciar a produção de AC o pH do meio reduz – em torno de 2 – devido à assimilação dos sais de amônia pelo fungo e liberação de prótons. O pH do meio de fermentação pode ser diminuído com sais de amônio – nitrato e sulfato – e também pode ser alterado em decorrência do tipo de substrato e do metabolismo microbiano. Para a produção de AC os sais de fósforo não precisam estar em concentrações limitantes. Porém, quando há uma limitação nos níveis dos íons metálicos, a adição suplementar de fósforo ocasiona aumento de biomassa (PAPAGIANNI, 2007; MAX et al., 2010; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

Elementos minerais são essenciais para a produção de AC. O ferro é o íon principal, pois atua na ativação da acetil-CoA. Porém, em excesso, ativa a enzima aconitase que regula a produção do ácido isocítrico – um isômero de AC indesejável durante o processo capaz de reduzir o acúmulo final de AC. Além de contribuir para a produção de AC, o magnésio estimula a formação de biomassa. A presença de cobre, zinco e a baixa disponibilidade de fósforo aumentam a capacidade de produção do AC (MILSOM; MEERS, 1985; SATO; SUDO, 1999; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SOCCOL et al., 2004). Os íons de manganês também interferem nas funções celulares do fungo, como na esporulação, síntese da parede celular e produção de metabólitos secundários (PAPAGIANNI, 2011).

Angumeenal e Venkappayya (2004) constataram que íons tais como molibdênio, cádmio, chumbo e cromo são estimulantes para a produção do AC em um meio contendo

glicose como fonte de carbono, os quais podem interagir com a estrutura da parede celular. Sabe-se que os íons de ferro e manganês podem afetar a morfologia das células. A concentração não controlada desses metais promove o crescimento de micélio não produtor de AC, enquanto que, um alto rendimento de produção é associado às células em formato de *pellets* (SAUER; MATTANOVICH; MARX, 2013).

Além dos íons metálicos, a estrutura morfológica dos microrganismos pode ser alterada por fatores tais como pH, agitação e concentração dos demais nutrientes. Durante a fermentação submersa, os micélios são alterados pela agitação e aeração do meio. Nos primeiros dias de fermentação o fungo se desenvolve em formato de *pellets*. Esse formato favorece a transferência de calor junto à baixa viscosidade do meio de cultura; por outro lado, em alta concentração de ferro e manganês o fungo desenvolve filamentos incapazes de produzir AC, o que aumenta a viscosidade do meio nutritivo dificultando as trocas de calor (BEROVIC; LEGISA, 2007; PAPAGIANNI, 2011).

A adição de alcoóis, em concentrações de até 6%, como etanol e metanol, favorece a produção de AC devido às suas interações com os íons metálicos, anulando o efeito inibidor, e sem interferir no metabolismo do fungo. O etanol age na redução da atividade da aconitase minimizando a degradação de AC e aumentando a atividade de outras enzimas presentes no ciclo. O metanol também altera a atividade de algumas enzimas do ciclo e altera a morfologia dos micélios, provocando a formação de *pellets* em fermentação submersa, o que estimula, por sua vez, a excreção de AC (SOCCOL et al., 2004; DHILLON et al., 2011a; VANDENBERGHE et al., 2016).

2.6 SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

Diversos estudos são realizados para se encontrar um destino adequado aos resíduos agroindustriais. Por isso, estes estão sendo aplicados como substrato para a produção de diferentes biomoléculas. Apesar de serem classificados como resíduos, eles são materiais portadores de uma riqueza nutricional ainda remanescente e de interesse aos microrganismos, proveitosos em processos fermentativos, principalmente em FES. São, em grande parte, substratos compostos de alta concentração fibrosa e amilácea, e resíduos provenientes de diversas culturas, tais como: abacaxi, banana, kiwi, maçã, uva, polpa cítrica, bagaço de cana, arroz, mandioca, beterraba, batata, milho, palha de trigo, casca de café entre outros materiais celulósicos (SOCCOL et al., 2004; PRADO et al., 2005b). A TABELA I.3 apresenta a produção de AC a partir dos mais variados substratos e suas respectivas produções.

TABELA I.3 – SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

SUBSTRATO	PRODUÇÃO (AC/SUBSTRATO)	REFERÊNCIA
Bagaço de cana	75,45 g kg ^{-1 a} ; 97,81 g kg ⁻¹ tratamento alcalino; 87,32 g kg ⁻¹ tratamento ácido	Yadegary et al. (2013)
Bagaço de maçã	159,14 g kg ^{-1 b}	Hoseyini, Asefi e Mozaffari (2011)
Bagaço de maçã	294,19 g kg ^{-1 b}	Dhillon et al. (2013)
Bagaço de maçã	127,9 g kg ^{-1 b}	Dhillon et al. (2011b)
Bagaço de mandioca	347 g kg ^{-1 b}	Vandenberghe et al. (2000)
Cachos de palma oleaginosa	337,94 g kg ^{-1 b}	Bari et al. (2009)
Casca de banana	82 g kg ^{-1 b}	Kareem e Rahman (2013)
Casca de café	187,54 g kg ^{-1 b}	Ramachandra et al. (2013)
Casca de laranja	193 mg g ^{-1 b}	Torrado et al. (2011)
Espiga de milho	603,5 g kg ^{-1 b}	Hang e Woodams (1998)
Farelo de aveia	62 g kg ^{-1 b}	Rao e Reddy (2013)
Polpa cítrica	616,5 g kg ^{-1 b}	Rodrigues et al. (2009)
Polpa de tamarindo	14,07 mg g ^{-1 b}	Ajiboye e Sani (2015)
Resíduo de abacaxi	60,61 g kg ^{-1 b}	Kareem, Akpan e Alebiowu (2010)
Resíduo de cenoura	29 g kg ^{-1 a}	Garg e Hang (1995)
Vagem de alfarroba	264 g kg ^{-1 b}	Roukas (1999)

LEGENDA: *a*: baseado em açúcar consumido; *b*: baseado em substrato seco.

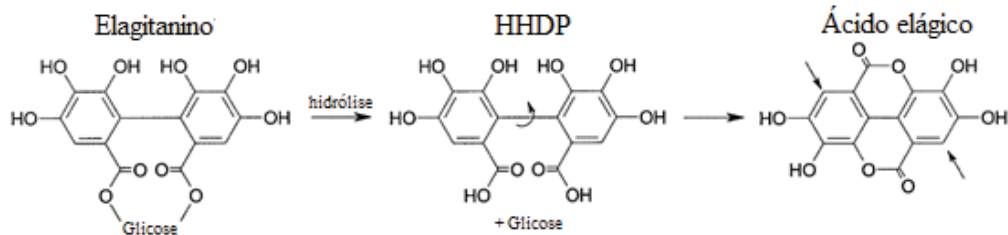
FONTE: A AUTORA (2017).

3 ÁCIDO ELÁGICO

3.1 DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS

Detalhando a sua estrutura, ilustrada na FIGURA I.5, o ácido elágico (AE) é formado por uma dilactona do ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e quatro anéis aromáticos (que conferem termoestabilidade), os quais representam zonas hidrofílicas e lipofílicas, respectivamente. Seu peso molecular é de 338,2 g mol⁻¹ com ponto de fusão de 362 °C. Essas características conferem ao AE uma baixa solubilidade em água, com melhor solubilidade em solventes polares como o metanol e etanol (BALA et al., 2006). O AE está presente na natureza em três formas: elagitaninos, onde o ácido HHDP forma ésteres com açúcar; AE livre e AE glicosídico – sendo estes os menos frequentes (ZAFRILLA; FERRERES; TOMÁS-BARBERÁN, 2001). A hidrólise do elagitanino produz o HHDP, espontaneamente lactonizado em AE. Na FIGURA I.5, as setas indicam os carbonos suscetíveis a ataques eletrofílicos por solventes orgânicos.

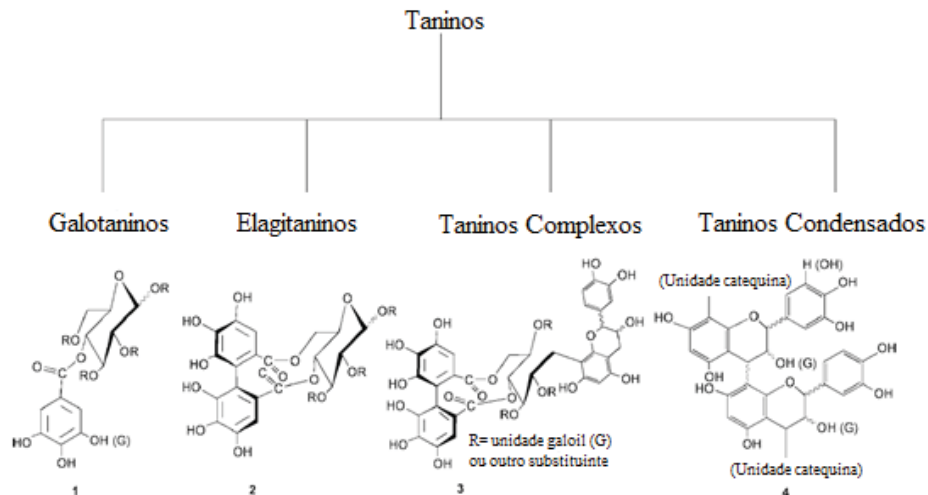
FIGURA I.5 – ESTRUTURA DO ÁCIDO ELÁGICO FORMADA A PARTIR DA HIDRÓLISE DO ELAGITANINO



FONTE: Adaptado de HÄKKINEN et al. (2000).

Os elagitaninos são taninos precursores do AE. Os taninos se dividem nas seguintes classes: galotaninos (GT), elagitaninos (ET), taninos complexos e taninos condensados. Essa divisão pode ser observada na FIGURA I.6.

FIGURA I.6 – CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS



FONTE: Adaptado de KHANBABAEI; REE (2001).

Os taninos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, distribuídos por toda a estrutura vegetal, e atuam como protetores dos tecidos em caso de ataque de insetos e microrganismos (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Possuem alta massa molecular, que varia dentre 500 a 3000 Da, definidos como compostos fenólicos solúveis em água, cuja principal característica é a habilidade em precipitar proteínas. Essa interação resulta na formação de substâncias adstringentes que participam no mecanismo de defesa celular e também relacionadas com o estágio de maturação das frutas, onde, a redução da adstringência indica um sinal de maturação (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; MELO, 2008; GONÇALVES, 2012).

Mueller-Harvey (2001) afirma que os taninos hidrolisáveis são sintetizados por uma ampla variedade de plantas e árvores, geralmente utilizadas para a alimentação animal, com

ocorrência em madeiras, cascas, folhas, frutos e galhos. Os taninos mais complexos, como elagitaninos, também são derivados biosinteticamente de pentagalactose por reações oxidativas entre unidades de ácido gálico. De acordo com Pansera et al. (2003), os taninos são aplicados em diversos segmentos industriais, tais como: clarificantes em vinhos e antioxidantes em sucos de frutas e bebidas; corantes na indústria têxtil; produção de borrachas; como agente coagulante e floculante em tratamento de água; curtimento do couro, onde ocorre a associação de compostos polifenólicos ao colágeno.

Os galotanninos são componentes do grupo de taninos hidrolisáveis mais simples, formados por unidades galactose ligados a um núcleo glicosídico, contendo um resíduo poliol ou polifenol. Assim como os elagitaninos, são suscetíveis a hidrólises por ácido, base ou enzimas, geralmente a tanase (KHANBABAEE; REE, 2001; AGUILERA-CARBÓ, 2009).

Os elagitaninos, também pertencentes ao grupo dos taninos hidrolisáveis, são compostos de ésteres do ácido HHDP com um poliol, geralmente uma glicose. São classificados de acordo com o número de grupos HHDP na molécula, formando estruturas monoméricas até oligômeros e polímeros. Quando expostos a condições ácidas ou básicas, a estrutura sofre hidrólise nas ligações éster, liberando o açúcar, e formando de maneira espontânea o AE. Através de uma lactonização esse rearranjo espontâneo permite a detecção e quantificação do ácido (CLIFFORD; SCALBERT, 2000; AGUILERA-CARBÓ et al., 2008a). Geralmente, os elagitaninos derivam de um mesmo precursor, o penta-O-galactose- β -D-glicose, que sofre oxidação e forma os resíduos galactose com ligações éster (HASLAM, 1989). Ainda na estrutura vegetal, os monômeros de elagitaninos quando sofrem oxidação podem formar dímeros a tetrâmeros, com massa molecular que pode chegar a 4000 Da (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

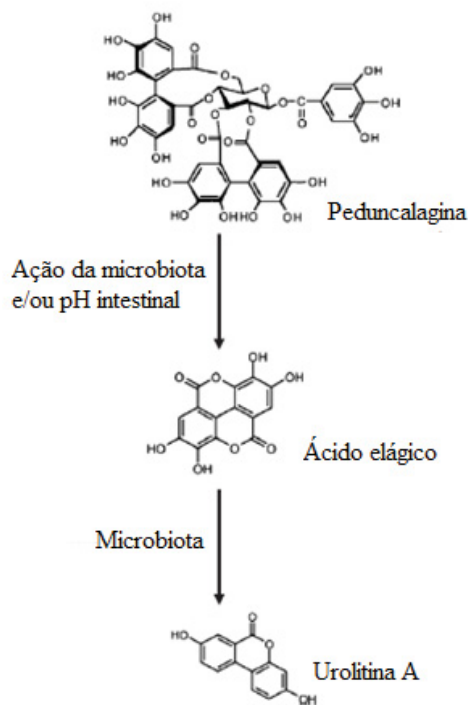
Os taninos complexos possuem uma unidade de catequina unida aos resíduos de galotannino ou elagitanino por ligações glicosídicas (KHANBABAEE; REE, 2001).

Os taninos condensados são polímeros de flavan-3,4-diol sem molécula de açúcar em sua estrutura e suas ligações carbono-carbono não são suscetíveis a novas ligações após a hidrólise, tal como ocorre com os taninos hidrolisáveis (AGUILERA-CARBÓ, 2009).

O interesse pelo AE aumentou a partir do desenvolvimento de estudos considerando sua possível atividade antimutagênica e anticarcinogênica. Também tem demonstrado propriedades antioxidantes como um efeito inibidor em peroxidação lipídica em testes *in vitro* (HÄKKINEN et al., 2000). A descoberta do AE remonta ao ano de 1968, quando Bhargava e Westfall, em um experimento com ratos com câncer de mama, administraram o extrato de nozes e obtiveram a regressão dos tumores. Em 1982, Wood e colaboradores renovaram o

interesse pelo ácido por este ter apresentado inibição a benzo- α -pireno-7,8-diol-9, 10-epoxi-2 de mutações induzidas em *Salmonella typhimurium* e em células V79 de hamsters chineses. Estudos também são realizados para se conhecer como o AE é absorvido no intestino humano. A absorção é possibilitada pelo potencial da microflora intestinal em metabolizar o AE e seus derivados em um composto nomeado Urolitina A, conforme demonstrado pelo esquema na FIGURA I.7. Como exemplo, o elagitanino peduncalagina, presente na fruta romã, é hidrolisado pelo pH do ambiente intestinal ou pela ação da microflora presente no intestino, formando o AE, também degradado pela ação da microbiota, resultando na excreção do composto Urolitina A, conhecido por inibir a proliferação de células cancerosas no cólon intestinal. O desempenho da microflora provavelmente está ligado à ação de uma bactéria específica, ainda não conhecida (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2009; LANDETE, 2011).

FIGURA I.7 – METABOLIZAÇÃO DO ELAGITANINO E ÁCIDO ELÁGICO NO INTESTINO HUMANO



FONTE: Adaptado de LANDETE (2011).

Em seu estudo, Sharma et al. (2010) comentam que o composto Urolitina A, resultante da hidrólise de elagitaninos no intestino humano, quando em quantidade considerável pode apresentar atividade inibitória das células cancerosas em proliferação.

Além de serem integrantes do mecanismo de defesa da estrutura vegetal, os taninos são utilizados pela medicina asiática como agentes bactericidas e fungicidas – atividades resultantes principalmente da ação antioxidante e sequestradora de radicais livres, também da

complexação com íons metálicos ou com outras moléculas como proteínas e polissacarídeos (HAYOUNI et al., 2011).

Aguilera-Carbó (2009) e Landete (2011) listaram diversas atividades exercidas pelos elagitaninos e AE, apresentadas no QUADRO I.5.

QUADRO I.5 – EFEITOS BIOLÓGICOS DE ELAGITANINOS E ÁCIDO ELÁGICO

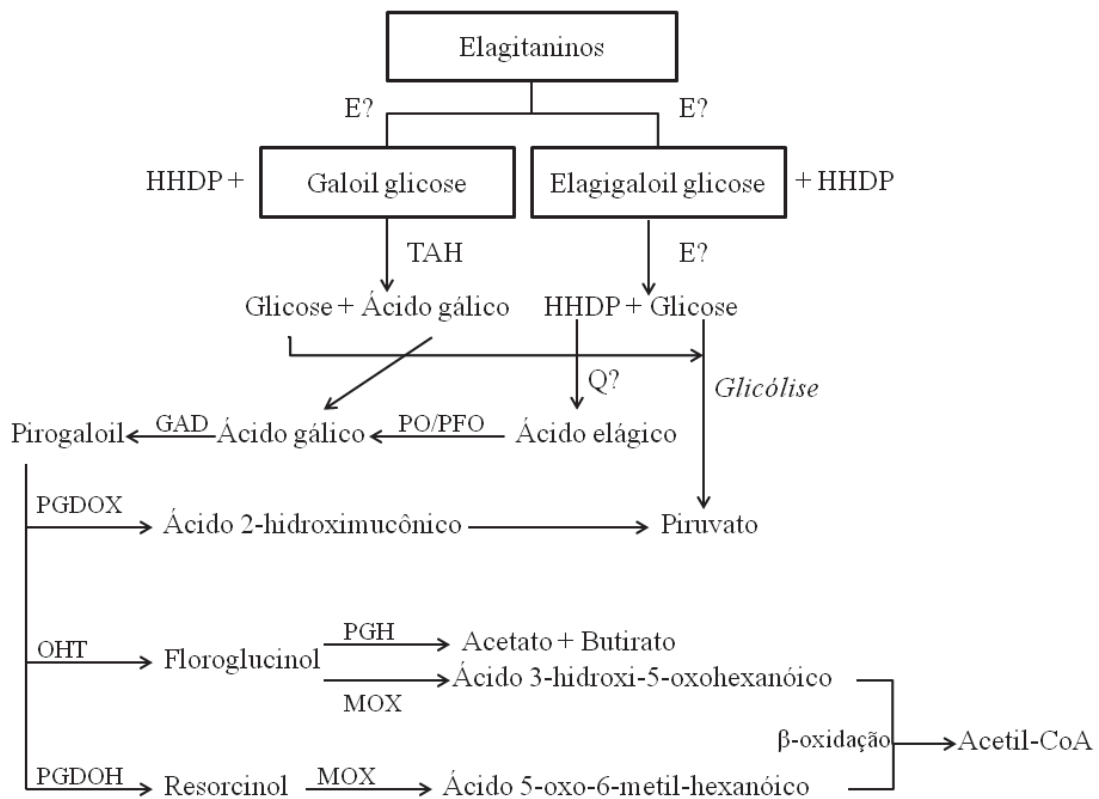
ATIVIDADES	EXEMPLOS	REFERÊNCIAS
Antioxidante	Em sucos de romã, o elagitanino punicalagina é o responsável; O consumo de morangos pode aumentar a capacidade antioxidante no organismo pela presença de elagitaninos	Gil et al. (2000); Henning et al. (2010)
Estrogênica e/ou Antiestrogênica	Atividade apresentada pelo ácido elágico em células MCF-7 derivadas do câncer de mama; Urolitinas A e B	Papoutsi et al. (2005); Larrosa et al. (2006)
Anticarcinogênica	Atividade apresentada pelo ácido elágico em carcinogênese no cólon de ratos; Extratos de romã contendo elagitaninos podem reduzir câncer de próstata humano por inibir o caminho angiogênico	Umesalma e Sudhandiran (2010); Albrecht et al. (2004)
Antimicrobiana	Elagitaninos punicalaginas inibiram o crescimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; Extratos contendo elagitaninos inibiram microrganismos patogênicos como <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> e <i>Campylobacter</i> spp.	Reddy et al. (2007); Scalbert (1991)
Prebiótica	Elagitanino punicalagina aumentou significativamente o crescimento de <i>Bifidobacterium breve</i> e <i>Bifidobacterium infantis</i> ; E aumentou o crescimento de <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.	Bialonska et al. (2009); Bialonska et al. (2010)
Anticolesterol	Prevenção de problemas cardíacos inibindo a síntese de colesterol por ação de elagitaninos	Abe et al. (2001)
Quimioprotetor	Ácido elágico reduz a incidência de N-2-fluorenilacetamida induzida (tumor de fígado)	Ahn et al. (1996)

FONTE: Adaptado de AGUILERA-CARBÓ (2009) e LANDETE (2011).

3.2 SÍNTESE DO ÁCIDO ELÁGICO

O composto mais aceito como o precursor majoritário de elagitaninos e galotaninos em vegetais é o 1,2,3,4,6,-penta-O-galloyl- β -Dglicose (PPG). Sua oxidação ocorre por ação enzimática da polifenoloxidase (lacase) que catalisa a formação do ácido HHDP. Para a biosíntese do PPG é necessária uma série de posições específicas para que ocorra a reação da enzima galoiltransferase, e isso depende do principal composto doador de acil, o β -glucogallin, que pode originar também complexos de galotaninos (AGUILERA-CARBÓ et al., 2008a). A FIGURA I.8 ilustra a rota biossintética de produção de ácidos orgânicos a partir de elagitaninos. Todo o processo está cercado de enzimas ainda desconhecidas, mas fundamentais para a transformação dos compostos.

FIGURA 1.8 – BIODEGRADAÇÃO DE ELAGITANINOS ATÉ ÁCIDOS ORGÂNICOS



LEGENDA: Enzima desconhecida (E?), tanino acil hidrolase (TAH), peroxidase (PO), polifenoloxidase (PFO), ácido gálico descarboxilase (GAD), pirogalolildio xigenase (PGDOX), hidroxiltransferase (OHT), pirogalolidesidroxilase (PGDOH), floroglucinol hidrolase (PGH), monoxigenase (MOX), lactonização espontânea ou catalisada enzimaticamente (Q?).

FONTE: Adaptado de AQUILERA-CARBÓ et al. (2008a).

3.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO

Comercialmente, o AE é produzido somente por síntese química. Isto implica em alto custo, uma vez que é necessário o emprego de grandes quantidades de solventes e ácidos fortes em processos demorados que exigem equipamentos sofisticados. No entanto, este grande dispêndio de trabalho propicia uma produção de baixo rendimento e com o risco de contaminação do produto. Devido ao seu alto custo, a exploração do AE ainda é pequena e para contornar essas condições, nos últimos anos pesquisadores têm testado microrganismos produtores de enzimas para atuarem como catalisadoras da hidrólise de elagitaninos até o AE. Dessa forma, aumenta-se o rendimento e a qualidade do produto, além de facilitar-se o processo de obtenção do ácido orgânico com o possível estudo das enzimas produzidas (CRUZ-ANTONIO et al., 2010).

A aplicação do AE está limitada à indústria de cosméticos: em cremes com efeitos rejuvenescedores, em cremes com efeitos clareadores de pele, aplicações em tratamentos clareadores e perfumes (AGUILERA-CARBÓ et al., 2008a).

3.4 FONTES NATURAIS DE ÁCIDO ELÁGICO

Tomás-Barberán e Clifford (2000) informam que o AE é um dos principais componentes das frutas que geralmente consumimos, principalmente as *berries*, por possuírem maiores quantidades do ácido – em torno de 15 vezes mais do que outras frutas. Outras fontes de AE na dieta, conforme Sharma et al. (2010), são nozes, romã, castanhas, uvas muscadine, amêndoas e bebidas envelhecidas em barris de carvalho.

Anttonen e Karjalainen (2005) relatam que a concentração do ácido em framboesas varia conforme a cultivar – estando em torno de 38 a 118 mg g⁻¹ de fruta seca. Os autores dizem ainda que, nas framboesas, os principais elagitaninos encontrados são o saguinin H-6 e lambertin, os precursores do AE na fruta.

O conteúdo de AE varia de acordo com o tipo de fruta, com o tipo de cultivar e com o estágio de maturação. Se a amostra for analisada no estado *in natura*, o AE estará presente na forma dos precursores elagitaninos, compostos solúveis em água; ou se a amostra a ser analisada sofreu algum processamento ou esteve armazenada, é possível que uma fração do AE esteja presente na forma livre, de baixa solubilidade em água (PINTO, 2008).

Em comparações com o grau de maturação de uvas moscatel, estes frutos maduros contém elevada concentração de AE em relação às frutas menos maduras, o que pode ser justificado levando-se em conta o processo de hidrólise acelerada que ocorre durante sua maturação, na qual a hidrólise atua sobre os elagitaninos e libera o AE (LEE; TALCOTT, 2004).

Häkkinen et al. (2000) analisaram o conteúdo de AE em frutas *berries* durante o processamento e armazenamento por meio de extrações com metanol e ácido clorídrico para posterior injeção em CLAE. Os melhores resultados foram 40,3 mg 100 g⁻¹ em morango *in natura* (base úmida); 38,4 mg 100 g⁻¹ em morango congelado e armazenado a -20 °C por 3 meses; 30,5 mg 100 g⁻¹ em morango congelado e armazenado por 6 meses; e 24,9 mg 100 g⁻¹ em morango armazenado e congelado por 9 meses. Em amostras de framboesa vermelha, os teores de ácido foram de 70,8 mg 100 g⁻¹ na fruta *in natura*; 63,8 mg 100 g⁻¹ na fruta armazenada e congelada a -20 °C por 3 meses; 61,6 mg 100 g⁻¹ na fruta armazenada e congelada por 6 meses; e 49,9 mg 100 g⁻¹ na fruta armazenada e congelada por 9 meses.

Durante o processamento do morango em geleia, os melhores resultados foram: 23,8 mg 100 g⁻¹; 24 mg 100 g⁻¹; 25,4 mg 100 g⁻¹; 21 mg 100 g⁻¹ para o armazenamento inicial a 5 °C e para 3, 6 e 9 meses, respectivamente. Os autores comentam que o conteúdo de AE em morangos durante o armazenamento, aumentou significativamente mesmo com concentrações elevadas de CO₂ – o que pode ser justificado pela degradação dos elagitaninos.

Vekiari et al. (2008) realizaram a extração com metanol a partir dos frutos e da casca de árvores de castanha, com posterior hidrólise em ácido trifluoracético 2 N para a determinação do conteúdo de AE por CLAE. O conteúdo de AE na casca variou de 0,71 a 21,6 mg g⁻¹ de peso seco em amostras não hidrolisadas. Para as amostras hidrolisadas, os valores variaram de 2,83 a 18,4 mg g⁻¹ de peso seco. Nos frutos, o conteúdo de AE no pericarpo não hidrolisado foi de 0,04 e 0,19 mg g⁻¹, e no pericarpo hidrolisado foi entre 0,74 e 5,98 mg g⁻¹. Na película os valores corresponderam a 0,03 – 0,091 mg g⁻¹ para amostras não hidrolisadas, e 0,54 a 0,79 mg g⁻¹ para amostras hidrolisadas. O AE se apresentou principalmente na forma de elagitanino nas cascas e películas; nas polpas, os autores encontraram apenas traços de AE.

3.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO ELÁGICO

Visando uma produção eficiente de AE, convertido a partir dos elagitaninos por hidrólise, é necessário a ocorrência de uma ação sinérgica de um complexo enzimático capaz de romper as ligações ésteres, ligações C-glicosídicas e ligações carbono-carbono. Para essa conversão, além das enzimas comerciais, as tanases acil hidrolases são enzimas usualmente utilizadas para romper ligações ésteres, obtidas a partir de microrganismos; já as celulasas e xilanasas, também produzidas por microrganismos, atuam na quebra das ligações C-glicosídicas e ligações carbono-carbono. Essas enzimas podem ser produzidas a partir da fermentação dos elagitaninos e aplicadas para a produção do AE – processo este que pode aumentar o potencial de rentabilidade do ácido e evitar o encarecimento de produção com o uso das enzimas comerciais (HUANG et al., 2007). Os microrganismos relatados na literatura capazes de produzir tais enzimas estão listados na TABELA I.4.

TABELA 1.4 – CEPAS FÚNGICAS E FONTES VEGETAIS MAIS COMUNS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO

MICROORGANISMO	FONTE DE ELAGITANINOS	PRODUÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de mirtilo	350 $\mu\text{g g}^{-1}$	Vattem e Shetty (2003)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Bagaço de mirtilo	375 $\mu\text{g g}^{-1}$	Vattem e Shetty (2002)
<i>Aspergillus niger</i> SHL 6	Casca de carvalho	160 mg g^{-1}	Huang, Ni e Borthwick (2005)
<i>Aspergillus niger</i> GH1e <i>Aspergillus niger</i> PSH	Casca de romã	6,3 mg g^{-1} e 4,6 mg g^{-1}	Robledo et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Casca de romã	12,39 mg g^{-1}	Aguilera-Carbó (2009)
<i>Aspergillus niger</i> PSH	Plantas <i>creosote</i> e <i>tar bush</i>	4,74 mg g^{-1} e 7,56 mg g^{-1}	Ventura et al. (2008)

FONTE: Adaptado de CRUZ et al. (2011).

Ventura et al. (2008) realizaram a produção de AE a partir das plantas *creosote* e *tar bush* por intermédio do fungo *Aspergillus niger* PSH. Para a extração dos taninos utilizaram acetona 70% e H_2SO_4 e quantificação pelo método de Wilson e Hagerman (1990). A biodegradação dos elagitaninos a AE foi equivalente para as duas plantas: a concentração inicial de AE para a planta *tar bush* foi de 2,72 mg g^{-1} e para a planta *creosote* foi de 2,49 mg g^{-1} . Após 96 horas de fermentação, o acúmulo foi de 4,74 mg g^{-1} e 7,56 mg g^{-1} para as plantas *creosote* e *tar bush*, respectivamente.

Vattem e Shetty (2003) testaram a produção de AE por intermédio do fungo *Lentinus edodes* tendo a fruta *cranberry* como substrato. Foram realizadas extrações com água e com etanol e posterior análise em CLAE. Durante a fermentação, o extrato aquoso contendo NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio levou a um aumento do conteúdo de AE em 49% a partir do quinto dia, o que corresponde a uma concentração de 116 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de polpa. Com o uso de proteína hidrolisada de peixe como fonte de nitrogênio no extrato aquoso, o conteúdo de AE aumentou 37% a partir do quinto dia, correspondendo a 107 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de polpa, de um conteúdo inicial do ácido de 78 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca), havendo decréscimo após o quinto dia de fermentação. No extrato etanólico, com proteína hidrolisada de peixe como fonte de nitrogênio, o conteúdo de AE aumentou 35% a partir do quinto dia (320 $\mu\text{g g}^{-1}$ base seca de polpa) com um rápido decréscimo e estabilização até o décimo quinto dia. Com NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio, o conteúdo do ácido aumentou gradualmente até o décimo quinto dia de fermentação em 23%, partindo de uma concentração inicial de 260 $\mu\text{g g}^{-1}$ de polpa (base seca) para 350 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca).

3.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO

Os elagitaninos são detectados e quantificados através da sua exposição a ácidos ou bases, ocorrendo hidrólise das ligações éster e liberando as unidades do ácido HHDP. Essas unidades sofrem um rearranjo, de maneira espontânea, formando o AE (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Essa reação de hidrólise torna possível a detecção e quantificação dos elagitaninos, determinados em AE, com leituras em equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Uma boa reprodutibilidade de resultados depende do solvente utilizado para a extração dos taninos da amostra, bem como o extrato obtido ser submetido a uma hidrólise prévia à análise de cromatografia (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000).

Muitas técnicas de purificação do AE estão sendo desenvolvidas, como por exemplo, as colunas de separação Dianion LP-20 ou Sephadex LH-20, Sep-Pak TC18 e cartucho Bond Elut PSA que permite a separação dos compostos – sendo este último o mais utilizado. Para a detecção e quantificação, o uso de CLAE é o mais indicado, com métodos baseados em fase reversa de coluna C18 com solventes como metanol, etanol, acetonitrila, misturados com água ou água acidificada por ácido acético ou fosfórico. A maior dificuldade relatada é que o uso de solventes de alta polaridade leva a tempos de retenção longos. Quando há o uso de gradiente de solvente, o tempo de retenção aumenta de 30 a 60 minutos (AGUILERA-CARBÓ et al., 2008b).

Com relação ao uso de solventes, Daniel et al. (1989) realizaram testes para estabelecer o melhor solvente de extração e concluíram que ambas as misturas de acetona:água (4:1, v/v) e metanol puro foram eficientes. Para a hidrólise, após a extração, utilizaram o ácido trifluoroacético 2N durante 2 horas a uma temperatura de 100 °C e concluíram, também, que hidrólises por tempos prolongados não liberam maiores concentrações de AE.

Hartzfeld et al. (2002) comentam que o método espectrofotométrico desenvolvido por Wilson e Hagerman (1990) para determinar AE requer grande quantidade de piridina como solvente, a qual possui risco de toxicidade em análises de rotina. A metanólise do método de Lei, Jervis e Helm (2001), que utilizaram cromatografia, foi bem sucedida, porém exige equipamentos sofisticados. A partir deste ponto de vista, o método de reação com iodeto de potássio para taninos hidrolisáveis, que consiste em uma extração com metanol e ácido sulfúrico, foi testado pelos autores. A leitura foi realizada em espectrômetro após a reação colorimétrica do extrato com iodeto de potássio em comprimento de onda de 525 nm. Os

autores chegaram à conclusão de que compostos polifenólicos como ácido gálico, AE e taninos condensados não formam produtos com coloração avermelhada após reação com KIO_3 . Galotaninos simples são detectáveis, pois as unidades galoil sofrem oxidação pelo KIO_3 formando coloração amarela; porém, compostos mais complexos como elagitaninos não são estimados. A seguir, na TABELA I.5, estão listados diversos experimentos para determinação de AE, com os seus respectivos métodos e resultados.

TABELA I.5 – MÉTODOS DESENVOLVIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO

SUBSTRATO	MÉTODO	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Casca de romã	Extrato aquoso; Extrato água-metanol; Extrato metanólico. Quantificação em CLAE	41,67 mg g ⁻¹ ; 42,78 mg g ⁻¹ ; 54,09 mg g ⁻¹	Nascimento (2013)
Morangos e framboesas (frescos, polpa e sementes)	Extração com metanol puro e TFA 2N. Quantificação em CLAE	Morangos: 300 µg g ⁻¹ (bs); polpa 52,2 µg g ⁻¹ (base úmida), sementes 38 µg g ⁻¹ (bu) Framboesas: 400 µg g ⁻¹ (bs), polpa 9,1 µg g ⁻¹ (bu), sementes 275 µg g ⁻¹ (bu)	Daniel et al. (1989)
Madeiras de castanha e carvalho	Extração com Etanol e HCl. Quantificação em CLAE	22 mg g ⁻¹ para castanha e 9 mg g ⁻¹ para carvalho	Peng, Scalbert e Monties (1991)
Madeiras de carvalho, noz e castanha	Extração com metanol. Quantificação em CLAE	Carvalho vermelho da Europa: 19, 24 e 63 mg g ⁻¹ ; Carvalho branco da América do Norte 41 mg g ⁻¹ ; noz da Europa 28 mg g ⁻¹ ; castanha da Europa 89 mg g ⁻¹	Bianco, Handaji e Savolainen (1998)
Comparações sobre o conteúdo de AE em várias partes de uvas muscadine	Extração com metanol. Quantificação em CLAE	Casca cv. Cowart 162 mg kg ⁻¹ ; polpa cv. Albemarle 24,5 mg kg ⁻¹ ; suco cv. Albemarle 23,4 mg kg ⁻¹	Lee e Talcott (2004)
Framboesas com diferentes graus de maturação (1, 2, 3)	Extração com metanol	Framboesas de San Mateo Acatitlán 0,51 mg kg ⁻¹ , 1,95 mg kg ⁻¹ e 5,38 mg kg ⁻¹ , respectivamente. Framboesas de Tlamimilolpa 0,74 mg kg ⁻¹ , 0,74 mg kg ⁻¹ e 3,25 mg kg ⁻¹ respectivamente	Salinas-Moreno et al. (2009)
Comparação do conteúdo de AE em morangos e outras frutas de importância comercial	Extração com acetona e HCl. Quantificação em espectrofotômetro (WILSON; HA GERMAN, 1990)	0,5 mg g ⁻¹ (bs) em morangos; 0,07 mg g ⁻¹ em maçãs verdes; 0,02 mg g ⁻¹ em bananas; 0,04 mg g ⁻¹ em peras; 0,06 mg g ⁻¹ em abacaxis; 0,07 mg g ⁻¹ em ameixas; e 0,04 mg g ⁻¹ em tangerinas. O AE não foi encontrado em maçã vermelha, kiwi e laranja	Williner, Pirovani e Güemes (2003)
Framboesa vermelha e morango	Extração com metanol e HCl. Quantificação em CLAE	Framboesa vermelha 1,6 g kg ⁻¹ (bu) e 0,31 g kg ⁻¹ (bu) para morangos	Matilla e Kumpulainen (2002)
Diferentes plantas	Extração com metanol e HCl. Quantificação em CLAE	<i>Punica granatum</i> 33,79 mg g ⁻¹ ; <i>Punica granatum</i> vermelha 12,8 mg g ⁻¹ ; <i>Euphorbia antisyphylitica</i> 2,18 mg g ⁻¹ ; <i>Flourensia cernua</i> 1,59 mg g ⁻¹ ; <i>Tumera diffusa</i> selvagem 0,81 mg g ⁻¹ e <i>Jatropha dioica</i> 0,81 mg g ⁻¹ (bases secas)	Aguilera-Carbó et al. (2008b)

FONTE: A AUTORA (2017).

CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

1 INTRODUÇÃO

Embora o cultivo do cacau seja uma prática antiga e o mercado do fruto seja vasto, o seu processamento ainda não demonstrou progresso em relação à tendência de uma cultura sustentável. Atualmente, são poucas as aplicações dos resíduos do processamento industrial de cacau. Estudos iniciais para a solução desse problema ambiental estão sendo realizados. Em países produtores do fruto, a exportação das cascas de cacau é uma alternativa à sua disposição inadequada, uma vez que os países importadores de resíduos de cacau (cascas, polpa e cascas das amêndoas) não possuem clima e solo favoráveis ao cultivo do fruto; contudo, desenvolvem aplicações variadas aos resíduos (DELLA; KÜHN; HOTZA, 2005; ODDOYE; AGYENTE-BADU; AKOTO, 2013).

De modo geral, os resíduos possuem nutrientes e propriedades importantes com potencial de uso para a produção de biocombustíveis (DELLA; KÜHN; HOTZA, 2005), alimentos (DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012; SANTOS, 2012), cosméticos (KARIM et al., 2016), ração animal (ODDOYE et al., 2010), energia (SYAMSIRO et al., 2012), fertilizantes (SODRÉ et al., 2012), compostos bioativos (ADOMAKO, 1972; DONKOH et al., 1991; BONVEHÍ; COLL, 1999), entre outros.

A casca de cacau é um resíduo do processo de retirada das amêndoas que são destinadas à produção de chocolate com grande quantidade de nutrientes, tais como proteínas (entre 12 e 18 g 100 g⁻¹), aminoácidos (315 mg), conteúdo lipídico (3 g 100 g⁻¹), açúcares (3 g 100 g⁻¹) e diversos minerais. Apresenta, também, uma composição rica em material lignocelulósico e compostos fenólicos (ADOMAKO, 1972; BONVEHÍ; COLL, 1999).

Como a casca de cacau representa 80% do peso seco de todo o fruto (FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993), é frequente o seu descarte nas plantações do cacauzeiro, o que ocasiona o aparecimento de doenças se disposta sem tratamento prévio. Deste modo, a exploração do resíduo é tema importante em se tratando da questão ambiental.

Diversas análises podem ser realizadas para a caracterização físico-química da casca de cacau, tais como as gravimétricas para determinação de cinzas e de umidade, determinação de açúcares e proteínas, quantificação do conteúdo de matéria celulósica, fração lipídica e íons solúveis. A umidade de uma amostra é determinada pelo binômio tempo x temperatura de secagem, calculada pela diferença entre a massa inicial e a massa final após a secagem.

(ZORZETO, 2011). As cinzas representam a fração inorgânica que compõe a substância amostral, sendo obtidas pela incineração de amostras em mufla aquecida em temperaturas entre 550 e 575 °C, e determinadas pela diferença entre a massa inicial e a massa final após a incineração (IAL, 2008).

O pH é um parâmetro que interfere na estabilidade de processos bioquímicos e biotecnológicos, uma vez que representa as relações entre acidez e alcalinidade. Sua identificação consiste na medição eletrônica da concentração de íons de hidrogênio em uma amostra através de um pHmetro com dois eletrodos (FERNANDES; OLIVEIRA, 2015). A medição da atividade de água busca determinar o volume de água livre em uma amostra, definida pela relação $A_w = p/p_0$, onde p significa a pressão de vapor de água na amostra e p_0 significa a pressão de vapor da água pura (BRASIL, 2014).

A quantificação de proteínas auxilia em análises físico-químicas e permite o acompanhamento em processos de finalidades diferentes. São disponíveis metodologias para a determinação de proteínas solúveis e totais, sendo o método de Bradford (1976) um dos mais utilizados. Estimar os açúcares é importante quando se trata dos processos fermentativos, pois permite identificar quanto de açúcar está disponível em uma amostra para o microrganismo consumir e produzir um bioproduto desejado (PASTORE; BICAS; MARÓSTICA, 2013). Os métodos mais utilizados são o de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945) e DNS de Miller (1959).

Em um bioprocessos, a cromatografia iônica auxilia na caracterização de substratos, cuja composição influencia diretamente no metabolismo dos microrganismos e formação de produto. O cromatógrafo é constituído de uma fase estacionária (sólido), e uma fase móvel (líquido). A análise consiste na separação dos cátions e ânions pela interação eletrostática entre os íons presentes na amostra e os contra-íons presentes na fase estacionária (KLEIN, 2010; ALCALDE, 2014).

Com um mercado mundial bilionário, estimado para o ano de 2020 em US \$ 3,6 bilhões (MARKETS; MARKETS, 2016), o ácido cítrico (AC) possui diversas aplicações. Além de ter um papel intermediário durante o ciclo de respiração celular dos animais, o AC é naturalmente presente em frutas cítricas, sendo considerado um ácido biodegradável e de pouca toxicidade. A indústria alimentícia detém 70% de toda a sua aplicação, devido as suas propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes e reguladoras de acidez. As demais aplicações estão distribuídas entre 12% para a indústria farmacêutica e 18% em outras áreas (ração animal, têxtil e tratamento de efluentes). O AC pode ser sintetizado pela fermentação de *Aspergillus niger* em substratos ricos em açúcar (VANDENBERGHE et al., 2000;

RODRIGUES, 2006). A produção de AC por FES possui a vantagem do uso de resíduos agroindustriais diretamente no processo fermentativo – como fonte de carbono, como substrato e como suporte – contribuindo, também, para a questão ambiental. A matriz sólida deve apresentar umidade em torno de 65% a 70%, uma vez que simula o habitat natural do fungo. É uma técnica simples e que não necessita de maiores investimentos, com menor risco de contaminação por bactérias e melhor circulação de oxigênio, gerando menor volume de efluentes.

O foco principal deste capítulo é a caracterização físico-química parcial da casca de cacau e a exploração de seu potencial como substrato para fermentação. Neste sentido, é proposta uma alternativa de uso que visa à produção de AC por FES.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o procedimento experimental foi realizado nos laboratórios da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da UFPR em Curitiba/PR, Brasil.

2.1 CASCA DE CACAU

As cascas de cacau foram obtidas e preparadas a partir do fruto cacau *in natura*, proveniente de fazendas cacaueiras da região Norte do Brasil, no Estado do Pará, variedade *Forastero*, em parceria com a Universidade Federal do Pará, por meio da Rede Biocau – Lote 2015. As cascas foram desidratadas em estufa Nova Ética 400/ND com circulação de ar a 50 °C por até 48 horas. Posteriormente, foram fragmentadas e moídas em moinho de facas Cienlab Willey DL, sendo classificadas granulometricamente em diferentes frações em agitador de peneiras Bertel VP-01. O material com tamanho reduzido é peneirado na malha USS/ASTM No. 20, para posterior utilização da fração que compreende o tamanho de partícula de 2,00 – 0,84 mm.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE CACAU

Todas as análises de caracterização físico-química da casca de cacau foram realizadas em triplicata.

2.2.1 Cinzas e Umidade

As determinações do teor de cinzas seguiram a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL, 2008), e as determinações de umidade seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Os resultados foram calculados a partir da diferença de massa amostral.

2.2.2 Atividade de água e pH

Para mensurar a atividade de água, foram realizadas análises diretamente com a casca de cacau seca, em equipamento AquaLab CX-2. A medição do pH da amostra sólida foi realizada a partir do extrato aquoso da casca de cacau com o uso do potenciômetro MS Tecnopon mPA 210.

2.2.3 Açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores e totais foram determinados pela reação com ácido dinitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), com adaptação para a determinação dos teores de açúcares totais, que sofreram hidrólise ácida por HCl concentrado. Baseia-se na redução do ácido dinitro-3,5-salicílico (de cor amarelo forte) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (de cor laranja-marrom forte) ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada. (RABELO, 2007).

A determinação foi realizada a partir de um extrato aquoso da casca de cacau, que consistiu na suspensão de 10 g de casca em 100 ml de água deionizada, mantida em banho-maria em água em temperatura de ebulição durante 15 minutos. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de açúcares redutores e totais foi calculada a partir da equação da curva padrão de glicose em relação à absorbância, com intervalos de concentração de 0 a 1 g l⁻¹.

2.2.4 Proteínas solúveis

A concentração das proteínas solúveis do extrato da casca de cacau foi determinada pelo método de Bradford (1976). Baseia-se na interação iônica do corante *Comassie Blue* com a proteína da amostra em pH ácido, que resulta na formação de compostos de aminoácidos e

aromáticos em complexo com a proteína. Essa interação é absorvida na faixa de 595 nm, onde a forma aniônica do corante (vermelha) passa para a forma catiônica (azul) (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

O extrato foi obtido pela suspensão de 10 g de casca em 100 ml de água deionizada, mantida em banho-maria com água em temperatura de ebulição durante 15 minutos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. A concentração de proteínas foi determinada a partir da equação da reta gerada pelo gráfico da curva padrão de albumina soro bovina em relação à absorbância, com intervalos de concentração de 5 a 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

2.2.5 Cátions e ânions solúveis

Os cátions e ânions foram determinados por meio do cromatógrafo de troca iônica Ion Analysis Metrohm CH-9101, a partir do extrato aquoso de casca de cacau. Este foi preparado a partir de 1 g de casca de cacau adicionado em 30 ml de água deionizada. A suspensão foi mantida em banho-maria com água em temperatura de ebulição por 15 minutos. Após filtração simples em um não-tecido TNT, o extrato foi aferido com água deionizada em balão volumétrico de 50 ml. Os cátions foram determinados em coluna Metrosep C3 mantida a 40 °C com fluxo de 0,9 ml min^{-1} de fase móvel 3,5 mM HNO_3 . Os ânions foram determinados em coluna Metrosep A supp 5 mantida em temperatura ambiente com fluxo de 0,7 ml min^{-1} de fase móvel 1 mol l^{-1} bicarbonato de sódio e 3,2 mol l^{-1} carbonato de sódio.

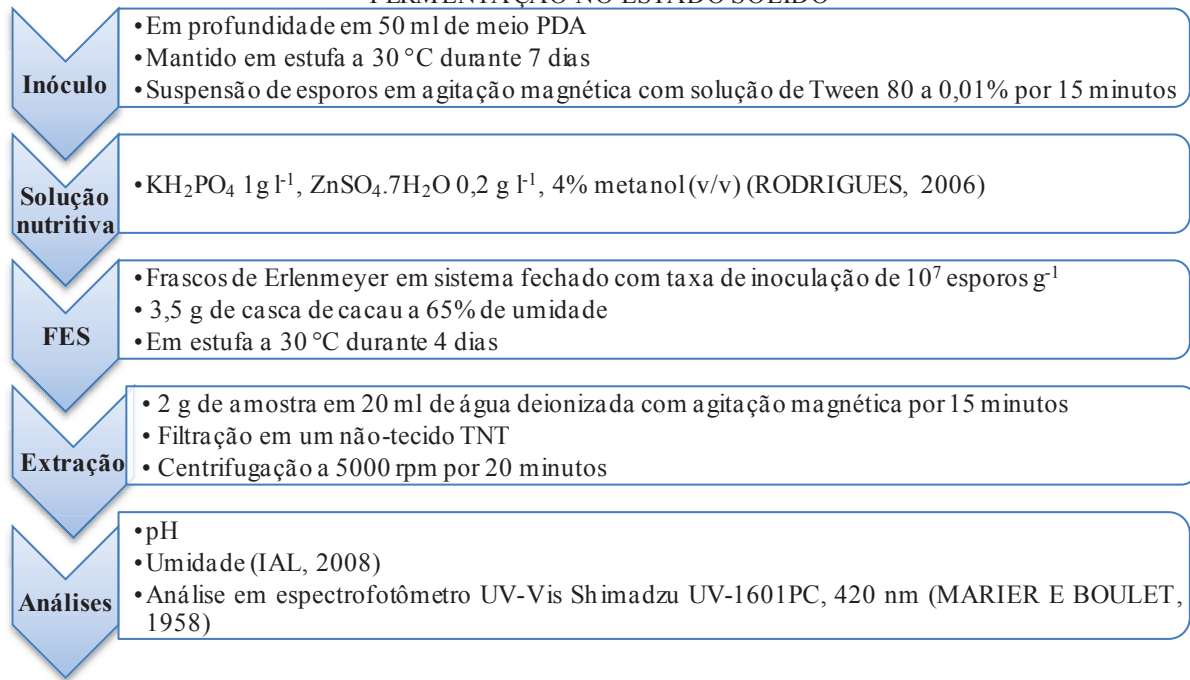
2.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

2.3.1 Escolha de cepas produtoras de ácido cítrico em fermentação no estado sólido

A escolha de microrganismos teve como base um estudo prévio, selecionado por Rodrigues (2006). A cepa de *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) foi obtida por mutação induzida da cepa de *Aspergillus niger* LPB BC (CCT 7716) isolada a partir do bagaço da cana-de-açúcar. Ambas as linhagens pertencem ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, catalogadas pela Coleção de Culturas Tropical, da Fundação Andre Tosello. Os microrganismos mostraram ser excelentes produtores de AC em polpa cítrica, conferindo-lhes um grande potencial para a produção do ácido utilizando resíduos como substrato.

Ensaio iniciais para a produção de AC foram realizados em duplicata, com as cepas de *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) e *Aspergillus niger* LPB BC (CCT 7716), previamente selecionadas por Rodrigues (2006), seguindo-se as condições e etapas apresentadas na FIGURA II.1.

FIGURA II.1 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO



2.3.2 Determinação da concentração de ácido cítrico

A extração do AC foi realizada com 2 g de material fermentado, ao qual foram adicionados 20 ml de água deionizada. A suspensão manteve-se em agitação magnética durante 15 minutos, com posterior filtração simples em um não-tecido TNT.

O pH da extração foi medido em potenciômetro MS Tecnopon mPA 210, sendo então centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos, diluição de 1:4 vezes, filtrado através de membrana Millipore de 0,22 µm, e analisadas em:

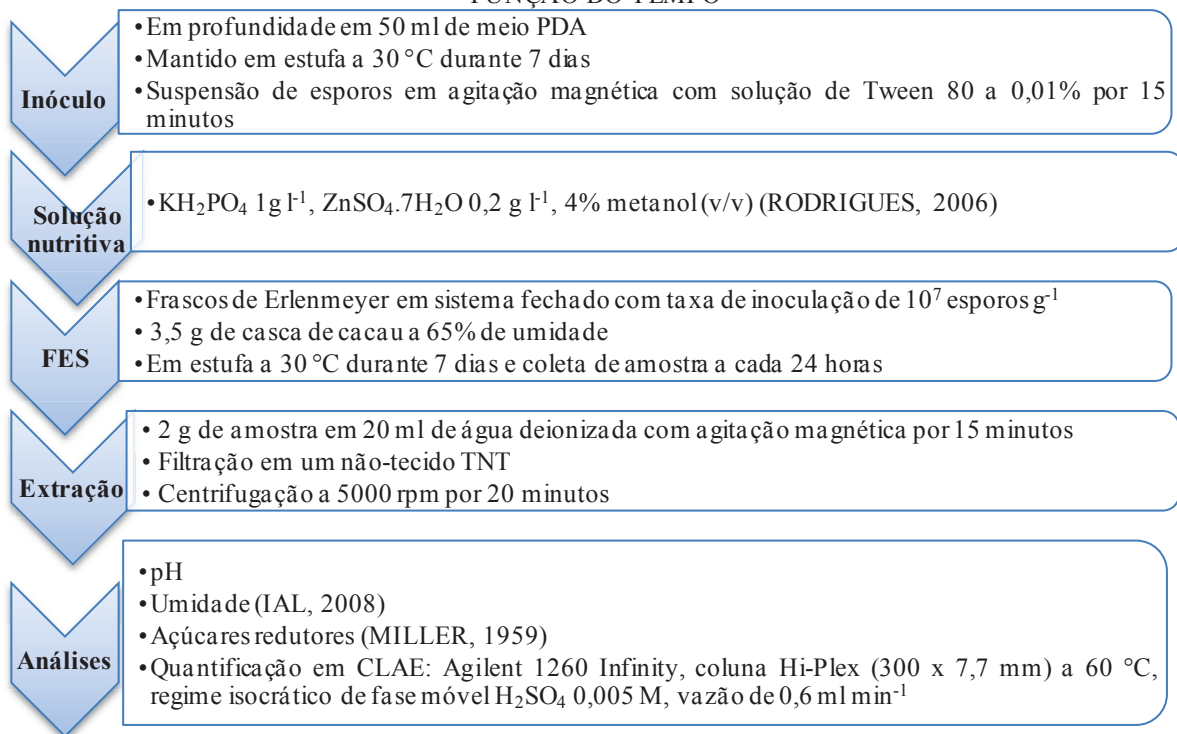
- ensaios iniciais em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1601PC, com comprimento de onda de 420 nm, conforme a metodologia de Marier e Boulet (1958);
- a produção de AC em função do tempo em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna Hi-Plex (300 x 7,7 mm) a 60 °C, regime isocrático de fase móvel H_2SO_4 0,005 M, vazão de 0,6 ml min⁻¹.

Para acompanhar as concentrações de açúcares disponíveis ao consumo do fungo, os teores de açúcares redutores e totais foram determinados pela reação com ácido dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959), com leitura em espectrofotômetro de microplaca BioTek PowerWave HT em comprimento de onda de 540 nm.

2.3.3 Produção de ácido cítrico em função do tempo

A produção de AC em função do tempo foi realizada para a cepa selecionada *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717), com melhor capacidade de produção de AC na etapa anterior, seguindo as condições apresentadas na FIGURA II.2. Neste estudo foram utilizadas as cascas de cacau pertencentes ao Lote 2016.

FIGURA II.2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO



O rendimento do processo fermentativo para a produção de AC foi calculado a partir da relação de conversão do substrato (açúcares totais) em produto (AC), considerando o rendimento teórico máximo, em massa molecular, da conversão de glicose em AC, equivalente a 1,167.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE CACAU

Para o trabalho foi utilizada a casca com tamanho de partícula entre 0,84 e 2,00 mm, pois as partículas em tamanho menor dificultavam a obtenção de um extrato aquoso da casca de cacau tornando inviável uma filtração convencional por apresentar bastante viscosidade. As cascas processadas em diferentes etapas podem ser visualizadas na FIGURA II.3.

FIGURA II.3 – PROCESSAMENTO DAS CASCAS DE CACAU



LEGENDA: As imagens indicam, em sequência, da esquerda para a direita: cascas após secagem em estufa, cascas em tamanhos de partícula de 0,84 mm e de 2,00 mm.

FONTE: A AUTORA (2017).

Pouco se sabe acerca da composição das cascas de cacau, sendo encontrados estudos envolvendo outras partes do cacau, tais como amêndoas e polpa. Os resultados encontrados para as determinações de umidade, pH, cinzas, atividade de água, quantificação de açúcares redutores e totais, concentração de proteínas solúveis, e análise dos íons solúveis de cascas de cacau da variedade *Forastero*, provenientes do Estado do Pará – Lote 2015, estão relacionados na TABELA II.1.

TABELA II.1 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DO FRUTO DE CACAU

PARÂMETRO	RESULTADO	PARÂMETRO	RESULTADO	PARÂMETRO	RESULTADO
pH	6,18 ± 0,01	Ânions solúveis (mg 100 g ⁻¹)	F ⁻ 10,46 ± 0,01	Cátions solúveis (mg 100 g ⁻¹)	
Atividade de água	0,283 ± 0,004		Cl ⁻ 26,68 ± 0,01		Na ⁺ 2,19 ± 0,003
Cinzas (%)	8,2 ± 0,04		Br ⁻ 14,78 ± 0,003		NH ₄ ⁺ 0,18 ± 0,001
Umidade (%)	3,4 ± 0,003		NO ₂ ⁻ 37,56 ± 0,02		K ⁺ 43,98 ± 0,03
Proteínas solúveis (g 100 g ⁻¹)	11,7 ± 0,001		NO ₃ ⁻ n.d.		Mg ⁺² 3,18 ± 0,002
Açúcares redutores (g 100 g ⁻¹)	23 ± 0,03		SO ₄ ⁻² 112,89 ± 0,05		Ca ⁺ 4,53 ± 0,02
Açúcares totais (g 100 g ⁻¹)	63 ± 0,01	PO ₄ ⁻³ 23,44 ± 0,003			

LEGENDA: n.d. não detectado

A determinação do pH auxilia na caracterização de amostras e no estabelecimento de padrões para reações químicas ou bioquímicas, principalmente para identificar faixas ótimas de atuação de enzimas e também desempenha importante papel no controle de um processo fermentativo (FERNANDES; OLIVEIRA, 2015). A amostra encontra-se próximo à neutralidade, indicando se tratar de um bom material para uso em alguns processos fermentativos, uma vez que está na faixa de interesse para o crescimento de microrganismos, descartando a necessidade de correção do pH (BARROS; DIONISIO; SILVA, 2013).

O valor de umidade encontrado indica que as cascas de cacau estão em condições para o armazenamento. A umidade caracteriza uma amostra que pode conter substâncias voláteis além de água ligada. Também está relacionada com a sua estabilidade, pois o volume pode ser alterado em decorrência de uma decomposição durante a estocagem ou etapas posteriores de tratamento (ZORZETO, 2011).

A determinação da atividade de água é importante para uma avaliação do estado em que se encontra a amostra e a medida de conservação a ser adotada, prevenindo as transformações físicas e a ação de microrganismos. O resultado indica que a atividade de água está contida na faixa limite para a estocagem da amostra, sendo que, para valores acima de 0,600, a amostra necessitaria ser submetida a uma etapa de secagem antes da armazenagem – o que evita a proliferação de microrganismos (RODRIGUES, 2006).

A cromatografia de troca de íons é um método seletivo. Os resultados detectaram uma alta concentração de sulfato na casca de cacau, com o uso da coluna para a análise de ânions, e de potássio com a coluna para análise de cátions. Não foram detectados níveis de nitrato. Esses resultados podem ter relação com o solo da região em que o cacau é cultivado (VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011). A determinação dos cátions e ânions na casca é importante, pois estes podem auxiliar ou inibir o desenvolvimento do microrganismo em um processo fermentativo. Dependendo do processo no qual o resíduo será utilizado, não é necessária a suplementação de determinados sais ao meio contendo casca de cacau.

Em cascas de frutos provenientes da Bahia, Vriesmann, Amboni e Petkowicz (2011) encontraram a concentração de $2768 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de potássio em análises dos íons totais. Foram encontrados, também, os íons Cu, Mn, Se e Zn, sendo o zinco o elemento mais significativo deste grupo, em concentração de $3974 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Em seus estudos, Donkoh et al. (1991) analisaram os íons totais em cascas do fruto de cacau proveniente de Gana por espectrometria de absorção atômica. Detectaram a presença dos íons Ca, P, Mg, Fe, K, Mn, Zn, Cu e Na. O íon em maior concentração também foi o potássio, com $718 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, e em pequenas quantidades estão zinco, manganês, sódio e ferro, com concentrações de 100, 150,

170 e 330 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Tais teores elevados de íons, relatados pela literatura, se devem por conta da análise dos íons totais ser realizada através da espectrometria de absorção atômica, por meio da qual podem ser quantificados todos os íons presentes em uma amostra. No presente estudo, foram analisados somente os íons solúveis do extrato aquoso da casca de cacau, por meio de cromatografia de troca iônica.

A determinação da concentração de proteínas solúveis mostra que o valor obtido se aproxima ao conteúdo encontrado por autores citados na literatura em análise de proteínas totais. Bonvehí e Coll (1999) analisaram as cascas de cacau quanto ao teor de proteínas em frutos cultivados na Costa do Marfim, Nigéria, Camarões, Colômbia, Equador, Guiné e Brasil. Encontraram que a concentração de proteína varia entre 9,6 a 13,4%. Vriesmann, Amboni e Petkowicz (2011) encontraram 8,6% de proteínas para as cascas dos frutos provenientes do estado da Bahia.

O teor de cinzas encontrado está próximo ao obtido por Martínez et al. (2012), que analisaram a composição química das cascas de frutos originários do Equador (8,4%). Nsor-Atindana et al. (2012) obtiveram 5,9% de cinzas para cascas de cacau adquiridas da China; 6,7% de cinzas foram quantificadas em cascas da Bahia (VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011). Esta análise permite acompanhar o comportamento da amostra em relação às suas alterações físicas, onde, características como granulometria, tamanho e espessura da partícula influenciam no tempo e temperatura de incineração a ser utilizado (IAL, 2008).

Os açúcares são fonte de energia para os microrganismos, sendo a glicose, a frutose e a sacarose mais simples e de mais fácil assimilação. Neste estudo, foram determinados 23 g 100 g⁻¹ de açúcares redutores correspondentes em glicose e 63 g 100 g⁻¹ de açúcares totais. Os açúcares mais complexos são originários de estruturas poliméricas, tais como celulose, hemicelulose, pectina, entre outros, para os quais o microrganismo necessita de um mecanismo enzimático adequado. A quantificação dos açúcares é um parâmetro de referência que informa a disponibilidade de substrato em processos fermentativos. Em baixa concentração do substrato, a eficiência do processo será baixa e, industrialmente falando, não proverá lucro. Por outro lado, uma alta concentração de substrato pode prejudicar o processo de fermentação pela alta concentração osmótica do meio, por danificar o citoplasma dos microrganismos, o que, por sua vez, promove a lise celular (PASTORE; BICAS; MARÓSTICA, 2013).

Neste trabalho, o valor de açúcares redutores foi superior aos valores detectados por Vriesmann, Amboni e Petkowicz (2011) de 10,4 g 100 g⁻¹ de açúcares redutores. Os autores

também quantificaram a composição de monossacarídeos. A glicose foi predominante, com 8,6% m/m, seguida do ácido urônico, proveniente da degradação pécica, com 6,7% m/m. Bonvehí e Coll (1999) também observaram a glicose como açúcar majoritário (teor máximo de 1,32 g 100 g⁻¹) na casca e não identificaram níveis satisfatórios de sacarose; o teor total de açúcares livres foi de 2,8 g 100 g⁻¹.

As diferenças entre as características obtidas para a casca utilizada no presente trabalho e as encontradas na literatura, devem-se possivelmente às condições variadas de análises, bem como as diferenças de regiões onde o cacau foi cultivado.

3.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

Os resultados do teste de produção de AC, após 96 horas, pelas duas cepas de *A. niger* analisados em espectrofotometria UV-vis a 420 nm, determinação de pH e porcentagem de umidade, estão dispostos na TABELA II.2.

TABELA II.2 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE CASCAS DE CACAU POR DIFERENTES CEPAS DE *Aspergillus niger*

LINHAGEM	pH	UMIDADE (%)	PRODUÇÃO (g AC kg ⁻¹)
<i>A. niger</i> LPB BC (CCT 7716)	3,30 ± 0,03	64,87 ± 0,03	390,29
<i>A. niger</i> LPB B6 (CCT 7717)	3,25 ± 0,02	67,48 ± 0,003	413,66

FONTE: A AUTORA (2017).

A casca de cacau foi utilizada como fonte direta de carbono e mostrou-se ser um bom substrato com a suplementação da solução nutritiva composta por KH₂PO₄ 1g l⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0,2 g l⁻¹ e 4% (v/v) de metanol. A linhagem *A. niger* LPB BC (CCT 7716) produziu 390,29 g AC kg⁻¹ de casca de cacau seca, enquanto que, em trabalho anterior (RODRIGUES, 2006), a mesma linhagem produziu 450 g de AC kg⁻¹ de polpa cítrica seca. A melhor linhagem produtora de AC foi *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717), com uma produção de 413,66 g AC kg⁻¹ de casca de cacau seco e a produtividade durante 96 horas de fermentação foi de 4,31 g AC kg h⁻¹. A mesma linhagem foi igualmente selecionada por Rodrigues (2006), com uma produção superior (537,6 g de AC kg⁻¹ de polpa cítrica seca). O valor de produção de AC foi obtido em condições não otimizadas, o que fornece excelentes perspectivas para o processo.

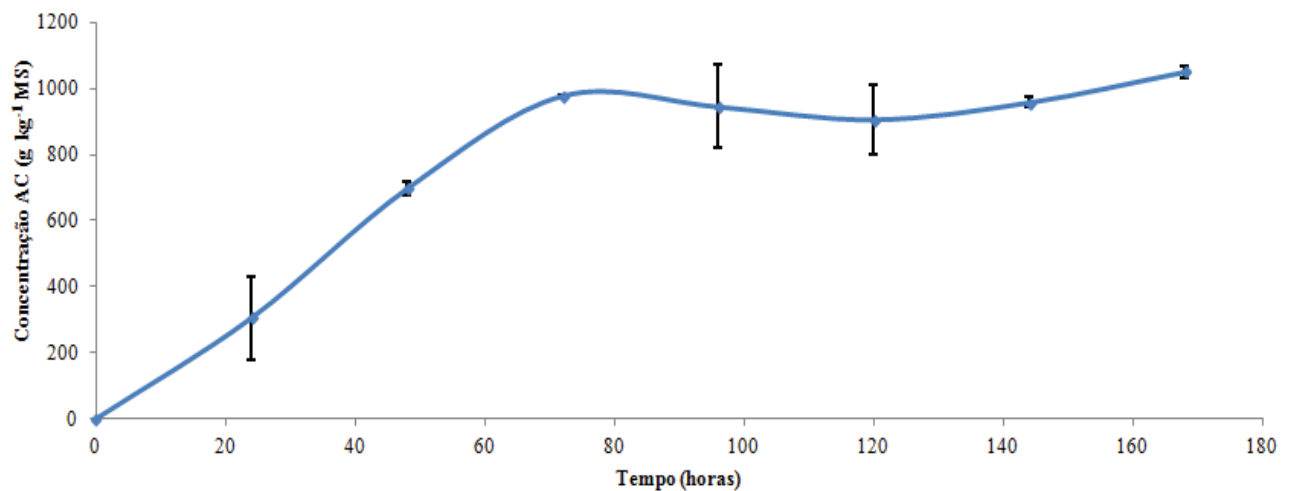
Comparando-se os resultados de produção de AC a estudos apresentados na literatura em condições otimizadas, o resultado obtido para a cepa *A. niger* LPB B6 (CCT 7717) se

aproxima do resultado para a melhor condição de produção alcançada por Dhillon et al. (2011c) onde se alcançou o rendimento de 449 g AC kg⁻¹ de substrato seco, com a cepa *A. niger* NRRL 567 utilizando bagaço de maçã em fermentação submersa e com adição de 3% de metanol. Comparando-se a outro substrato alternativo, também lignocelulósico, a produção ultrapassa a obtida por Bari et al. (2009) que utilizou cachos vazios de palma oleaginosa como substrato sólido, e após a otimização da composição do meio nutritivo, a sua produção máxima foi de 337,94 g de AC kg⁻¹ de cachos vazios secos.

3.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

A produção de AC em função do tempo por FES foi acompanhada durante 168 horas utilizando a cepa que apresentou melhor desempenho no teste de seleção, a *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717), consoante ao representado na FIGURA II.4.

FIGURA II.4 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO A PARTIR DE CASCAS DE CACAU



LEGENDA: As barras de erro correspondem aos valores de desvio padrão.

Conforme a FIGURA II.4, a produção iniciou com 306,12 g de AC por kg de substrato seco em 24 horas, período em que apresentou 34,3 g kg⁻¹ de açúcares redutores e um pH médio de 4,33. Apresentando diferenças significativas entre as médias de produção (TABELA II.3), observou-se que o pico de produção ocorreu em 72 horas atingindo 978,52 g AC kg⁻¹ de casca de cacau seca com uma produtividade de 13,59 g AC kg h⁻¹. Neste ponto, houve uma pequena formação de biomassa observada (não quantificada) necessária à produção de AC com a diminuição e quase estabilização do consumo de açúcares. O pH

médio neste momento foi de 3,11. A partir de 96 horas de processo, observou-se uma pequena variação na produção de AC e consumo de açúcares.

TABELA II.3 – ANOVA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO

CAUSA DA VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	TRATAMENTO
Tratamentos	7	2005697	286528,1	52,34	3,50	168h <i>a</i>
Residuo	8	43798,06	5474,76			72h <i>ab</i>
Total	15	2049495				144h <i>ab</i>
C. V.	10,15%					96h <i>ab</i>
						120h <i>ab</i>
						48h <i>b</i>
						24h <i>c</i>
						0h <i>d</i>

LEGENDA: G.L. graus de liberdade; S.Q. soma dos quadrados; Q.M. quadrado médio; F: valor calculado; F (5%): valor tabelado; C. V. coeficiente de variação; *a, ab, b, c e d*: Teste de Tukey. Os dados foram gerados em *software* SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Os resultados dos parâmetros avaliados durante a produção de AC em função do tempo estão dispostos na TABELA II.4, lembrando que para a produção de AC durante 168 horas foram utilizadas as cascas referentes ao Lote de 2016.

TABELA II.4 – RESULTADOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FUNÇÃO DO TEMPO A PARTIR DE CASCA DE CACAU COM A CEPA DE *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717)

TEMPO (h)	pH	UMIDADE (%)	AÇÚCARES REDUTORES (g kg ⁻¹)	AÇÚCARES TOTAIS (g kg ⁻¹)
0	5,55 ± 0,01	65,83 ± 0,003	40,1 ± 0,006	48,9 ± 0,002
24	4,33 ± 0,07	66,21 ± 0,01	34,3 ± 0,008	37,2 ± 0,003
48	3,32 ± 0,06	68,22 ± 0,01	25,8 ± 0,001	24,7 ± 0,001
72	3,12 ± 0,04	66,91 ± 0,005	19,6 ± 0,01	24,8 ± 0,003
96	3,10 ± 0,02	66,99 ± 0,013	19,7 ± 0,01	24,8 ± 0,001
120	2,88 ± 0,05	66,65 ± 0,02	16,6 ± 0,02	22,2 ± 0,004
144	3,24 ± 0,06	65,69 ± 0,01	19,1 ± 0,03	25,7 ± 0,004
168	3,42 ± 0,02	67,38 ± 0,003	21,2 ± 0,001	24,3 ± 0,003

Os resultados de produção de AC pelo fungo *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) com o uso de casca de cacau como substrato/suporte, superam as maiores produções de AC já relatadas (QUADRO II.1), com um rendimento de processo de 0,8542 g AC kg⁻¹ de substrato. Esses dados corroboram a literatura, que descreve o processo de produção de AC, onde, em um primeiro momento ocorre a adaptação do fungo ao substrato. O início do consumo de açúcares foi detectado em pH entre 5 e 4. Como neste estudo não foi necessário o ajuste de pH do meio fermentativo, o consumo se iniciou em pH 5,55. Após 48 horas, o pH diminuiu para em torno de 4 e, seguindo este padrão, nas próximas horas, diminuiu sequencialmente até

a faixa ótima que vai de 3 a 2. Essas mudanças ocorrem devido ao metabolismo do fungo e também ao tipo do substrato. A presença de zinco no meio fermentativo proporciona um alto acúmulo de AC. Os sais, por sua vez, além de interferirem no pH do meio, interferem também nas regulações enzimáticas (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; MAX et al., 2010; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

QUADRO II.1 – MAIORES TAXAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO RELATADAS NA LITERATURA

MICROORGANISMO	SUBSTRATO	PRODUÇÃO g kg ⁻¹	REFERÊNCIA
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Bagaço de maçã	766 ^a	Hang e Woodams (1984)
<i>A. niger</i> NRRL 2270		816 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 599		771 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 328		798 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 567		883 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 567	Bagaço de uva	600 ^a	Hang e Woodams (1985)
<i>A. niger</i> B3 mutante	Polpa cítrica	616,5 ^b	Rodrigues et al. (2009)

LEGENDA : a: baseado em açúcar consumido; b: baseado em substrato seco.

FONTE: A AUTORA (2017).

Conforme visto anteriormente, é notável o consumo de açúcares disponíveis no substrato, o qual iniciou em 24 horas mantendo-se em declínio até 48 horas. Estatisticamente existem evidências de uma diferença significativa, ao nível de $\alpha = 5\%$, entre o consumo de açúcares redutores e açúcares totais (TABELA II.5). Além disso, o microrganismo consegue assimilar, fora o carbono já disponível, o carbono presente em formas poliméricas, tais como a celulose, hemicelulose e a pectina, cuja disponibilidade é abundante. O substrato é degradado após a formação de enzimas específicas para a estrutura polimérica, liberando os açúcares redutores. Ao final ocorreu um ligeiro aumento dos níveis de açúcares redutores, que possivelmente sejam unidades das estruturas poliméricas da casca resultantes da hidrólise enzimática, as quais são assimiladas pelo microrganismo após o consumo dos açúcares disponíveis. Por outro lado, em relação aos açúcares totais, os valores tenderam à estabilidade, provavelmente devido ao crescimento do fungo que é limitado nas condições de produção de AC.

TABELA II.5 – ANOVA PARA A COMPARAÇÃO DE CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES TOTAIS

CAUSA DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	TRATAMENTO
Tratamentos	7	1056,36	150,91	10,75	3,50	0h <i>a</i>
Resíduo	8	112,32	14,04			24h <i>ab</i>
Total	15	1168,68				48h <i>bc</i>
C.V.	13,97%					168h <i>bc</i>
						144h <i>bc</i>
						96h <i>bc</i>
						72h <i>bc</i>
						120h <i>c</i>

LEGENDA: G.L. graus de liberdade; S.Q. soma dos quadrados; Q.M. quadrado médio; F: valor calculado; F (5%): valor tabelado; C.V. coeficiente de variação; *a, ab, bc, e c*: Teste de Tukey. Os dados foram gerados em *software* SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

A obtenção de AC por fermentação no estado sólido não requer grande formação de biomassa, sendo o crescimento limitado pela baixa presença de nitrogênio no meio, ou seja, pelas condições de alta relação C/N (SOCCOL et al., 2006).

A água exerce forte influência no processo de FES, sendo importante durante o metabolismo de produção de AC e também na interação entre componentes do meio. A umidade representa a quantidade de água presente na matriz sólida, portanto, ao se realizar a análise deste parâmetro, é possível determinar não somente o quanto de água foi evaporado, mas também a quantidade dos componentes voláteis presentes na amostra evaporados pela secagem em um período de 24 horas (VANDENBERGHE et al., 2013). A produção de AC em função do tempo apresentou em média, ao longo dos 7 dias, 66,86% de umidade, não havendo variações consideráveis durante o processo. Tal ocorrência representa um ponto positivo, pois em FES a umidade é uma variável difícil de ser controlada para manter-se o processo estável.

O *Aspergillus niger* é conhecido como um microrganismo capaz de degradar substratos com estruturas moleculares de difícil acesso ao carbono, o que resulta na produção de diversas enzimas. Maciel et al. (2008) alcançaram a produção de xilanase, através de *A. niger* LPB 326, com atividade enzimática de 3099 IU g⁻¹, a partir de bagaço de cana como substrato em fermentação no estado sólido. Utilizando palha de arroz e *A. niger* HN-1, Sandhu et al. (2013) encontraram várias enzimas celulolíticas, dentre as principais são a β-glucosidase (252,3 IU g⁻¹), endoglucanase (416,3 IU g⁻¹) e xilanase (2593,5 IU g⁻¹) – também em FES. Ncube et al. (2012) utilizaram sementes de *Jatropha curcas*, conhecida como pinhão-mansô, como substrato em FES e *A. niger* FGSCA733 e encontraram as enzimas xilanase e celulase, com atividades de 6087 U g⁻¹ e 3974 U g⁻¹, respectivamente. Ainda não se tem o conhecimento sobre quais enzimas a espécie utilizada neste trabalho – *A. niger* LPB B6

(CCT 7717) – pode secretar utilizando a casca de cacau como substrato, o que torna interessante realizar uma caracterização das mesmas.

Como sugestão para trabalhos futuros, pode-se testar a produção de AC utilizando as cascas de cacau como fonte de carbono em fermentação submersa, na forma de extrato ou em sólidos suspensos. Com isso, poderia se realizar o estudo de aumento de escala de produção até atingir volumes de interesse industrial. Com o objetivo de reduzir o custo de produção, seria profícuo analisar a influência da adição de diferentes sais nestes processos, bem como as concentrações de nitrogênio e de carbono presentes na casca.

Em conclusão, a produção de AC em função do tempo logrou grande êxito ao demonstrar o possível emprego da casca de cacau como um substrato alternativo aos resíduos frequentemente utilizados em processos fermentativos, bem como o potencial da casca de cacau para a produção de uma biomolécula de grande interesse industrial.

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

1 INTRODUÇÃO

Conforme já visto, o cacau possui grande importância comercial, e gera toneladas de resíduos durante seu processamento para a produção de chocolate. Com um elevado teor nutritivo, os resíduos – principalmente a casca do cacau – quando descartados no ambiente rapidamente iniciam seu processo de decomposição. Dessa forma, a casca de cacau possui nutrientes de interesse aos microrganismos, tornando possível o seu uso como substrato direto em um processo fermentativo gerando produtos de alto valor comercial, tais como as biomoléculas.

O ácido elágico (AE) é um ácido orgânico formado a partir da hidrólise do seu precursor, denominado elagitanino, pertence ao grupo dos taninos hidrolisáveis juntamente com os galotaninos (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989). Na natureza, o AE apresenta-se na forma de seu precursor, sendo as formas AE livre e AE glicosídico as menos frequentes. É encontrado principalmente nas frutas *berries* e também em romã, uva muscadine, amêndoas, castanhas, e bebidas envelhecidas em barris de carvalho (HÄKKINEN et al., 2000; ZAFRILLA; FERRERES; TOMÁS-BARBERÁN, 2001; BALA et al., 2006; SHARMA et al., 2010).

A romã é relatada pela literatura como a fruta que apresenta uma concentração de AE superior às demais tradicionais. Assim como o cacau, a romã (*Punica granatum*) é uma fruta ancestral, pertence à família Punicaceae, cuja origem remonta ao Império Romano. Geralmente, é uma fruta consumida para fins medicinais, ajudando no alívio do desconforto estomacal e intestinal. Nos últimos anos, a romã tem atraído o interesse de pesquisas na área da saúde por apresentar propriedades antioxidantes. Tais propriedades se devem à presença de elagitaninos e AE na fruta, e seus efeitos podem reduzir o avanço de doenças cardíacas, de doenças degenerativas e o câncer, além de possuir propriedades que podem inibir a ação de vírus e bactérias no organismo humano (AGUILERA-CARBÓ, 2009).

Para a síntese do AE é necessária uma ação sinérgica de enzimas da classe das hidrolases, tais como celulases, xilanases e tanino acil hidrolases, as quais atuam nas ligações ésteres, ligações C-glicosídicas e ligações carbono-carbono da estrutura de elagitanino. Tal estrutura também pode ser convertida em AE por enzimas secretadas por fungos filamentosos (HUANG et al., 2007).

Comercialmente, o AE é aplicado na indústria de cosméticos por agir como um antioxidante. Tais produtos possuem valor elevado, isso se deve ao fato de o AE ser produzido por síntese química, exigindo, por isso, alta demanda energética em equipamentos sofisticados. Neste sentido, a sua produção é de baixo rendimento, e o alto custo do método sintético se traduz na baixa exploração do ácido pela indústria atualmente. Para superar este cenário, pesquisadores têm testado microrganismos produtores de enzimas para atuarem como catalisadores da hidrólise de elagitaninos até o AE. O intuito é aumentar o rendimento e a qualidade do produto, além de facilitar o processo de obtenção do ácido orgânico com o possível estudo das enzimas produzidas (AGUILERA-CARBÓ, 2009; CRUZ-ANTONIO et al., 2010). Até o momento, tais microrganismos, relatados pela literatura, são fungos, dentre os quais podem ser enumerados: o *Lentinus edodes* com produção de 350 $\mu\text{g AE g}^{-1}$ bagaço de mirtilo (VATTEM; SHETTY, 2003); o *Rhizopus oligosporus* também utilizando bagaço de mirtilo como substrato para produzir 375 $\mu\text{g AE g}^{-1}$ (VATTEM; SHETTY, 2002); o *Aspergillus niger* SHL 6 160 mg AE g^{-1} de casca de carvalho (HUANG; NI; BORTHWICK, 2005) e o *Aspergillus niger* GH1 utilizando casca de romã com produção de 12,39 mg AE g^{-1} de substrato (AGUILERA-CARBÓ, 2009).

A extração em fase sólida (SPE) tem sido utilizada para a purificação e concentração de amostras em etapa anterior à análise cromatográfica. Essa técnica é relatada, ao mesmo tempo, como de alta eficiência na recuperação de determinados compostos, fácil manuseio, constituindo-se em uma alternativa para economizar tempo em preparações de amostras. A coluna de SPE possui um comportamento semelhante ao das colunas de CLAE de fase reversa. Consistindo em uma fase ligada à base de sílica com forte propriedade hidrofóbica, utilizada para isolar compostos específicos para fins qualitativos e quantitativos. O método objetiva remover compostos interferentes de amostras, concentrar analitos para uma maior sensibilidade, ou modificar a amostra para compatibilidade com a análise (YAN et al., 2014; APPLIED SEPARATIONS, 2017).

O objetivo deste capítulo é a produção de AE em fermentação submersa, a partir do extrato aquoso de cascas de cacau. Com este intuito, alternativas são propostas para a obtenção de uma biomolécula de interesse industrial, visando contribuir para a construção de uma solução ambiental para o problema do descarte inadequado das cascas na própria lavoura. Até o momento, não existem relatos na literatura sobre a produção de AE a partir de resíduos do processamento do cacau.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CASCAS DE CACAU

As cascas de cacau utilizadas como substrato no processo de produção de AE são provenientes de fazendas cacaueiras da região Norte do Brasil, lotes 2015 e 2016.

Neste estudo foram utilizadas as cascas moídas e classificadas com tamanho de partícula entre 0,84 e 2,00 mm, conforme indicado no Capítulo II página 42 (anteriormente).

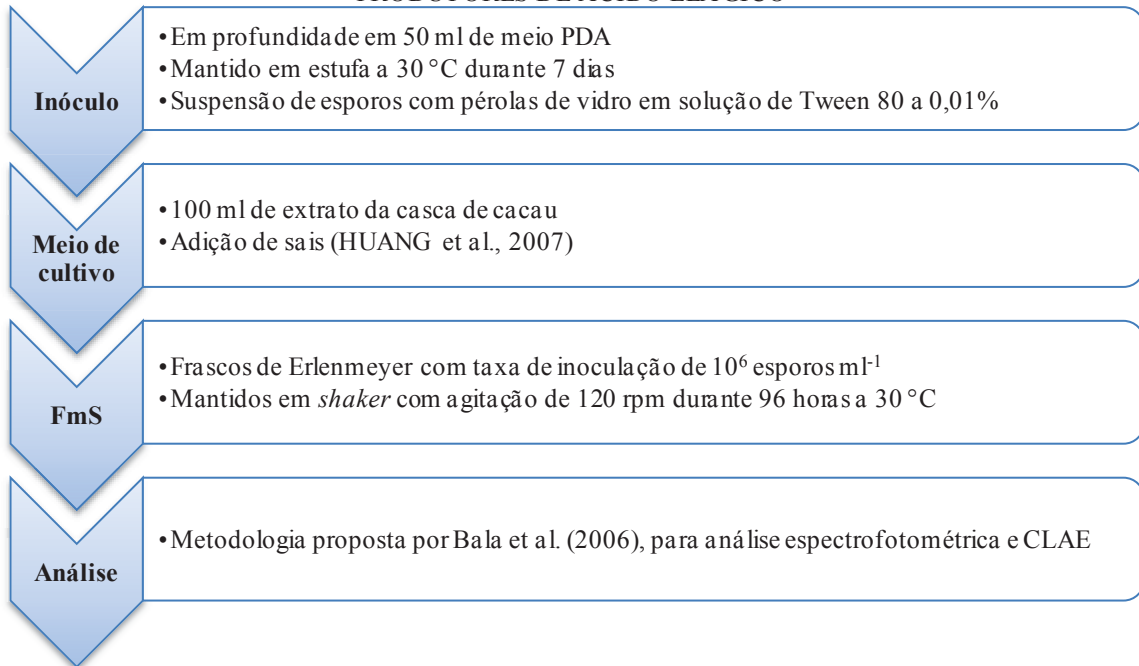
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU

Vinte e uma linhagens de microrganismos do gênero *Aspergillus* pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (QUADRO III.1), foram testadas em cultivo submerso com o uso de extrato aquoso de casca de cacau como fonte de carbono. As etapas do processo de produção estão apresentadas na FIGURA III.1.

QUADRO III.1 – SCREENING DE LINHAGENS DE *Aspergillus* PRODUTORAS DE ÁCIDO ELÁGICO EM CULTIVO SUBMERSO

LINHAGENS DE MICRORGANISMOS	
<i>Aspergillus oryzae</i> IZ9	<i>Aspergillus niger</i> LPB B6 (CCT 7717)
<i>Aspergillus niger</i> F3	<i>Aspergillus niger</i> LPB S
<i>Aspergillus niger</i> 593	<i>Aspergillus niger</i> LPB 336
<i>Aspergillus niger</i> F20MS	<i>Aspergillus niger</i> NRRL3 – LPB 335
<i>Aspergillus niger</i> 326	<i>Aspergillus niger</i> LPB 330
<i>Aspergillus niger</i> MUT 34	<i>Aspergillus niger</i> LPB 28
<i>Aspergillus niger</i> MUT 37	<i>Aspergillus niger</i> LPB 328
<i>Aspergillus niger</i> MUT 47	<i>Aspergillus niger</i> LPB 12
<i>Aspergillus niger</i> LPB BC (CCT 7716)	<i>Aspergillus niger</i> LPB 21
<i>Aspergillus niger</i> LPB B3	<i>Aspergillus niger</i> LPB 340
<i>Aspergillus niger</i> LPB 329	

FIGURA III.1 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO ELÁGICO



O inóculo foi preparado pela técnica de profundidade em 50 ml de meio de cultivo PDA, e mantido em estufa a 30 °C durante 7 dias. A suspensão dos esporos foi preparada a partir da solução extratora de Tween 80 a 0,01%, contendo pérolas de vidro.

Para o meio de cultivo foi realizado um extrato aquoso de casca de cacau Lote 2015, na proporção de 10 g de casca para 100 ml de água deionizada. Esta mistura foi mantida em banho-maria a 96 °C durante 15 minutos, para em seguida ser filtrada em um não-tecido TNT.

O extrato aquoso foi utilizado com o objetivo de estimular a produção enzimática relacionada à produção de AE, em conformidade ao relatado por Huang et al. (2007). Estes autores adicionaram ao meio contendo extrato de noz de carvalho – para a produção das enzimas xilanase, celulase e β -glicosidase – os seguintes sais: NaNO_3 (2 g l^{-1}); KH_2PO_4 (0,5 g l^{-1}); K_2HPO_4 (0,5 g l^{-1}); KCl (0,5 g l^{-1}); MgSO_4 (0,5 g l^{-1}) e FeSO_4 (0,001 g l^{-1}). Foram utilizados os mesmos sais no presente experimento, adicionados ao extrato aquoso de casca de cacau para a fermentação submersa.

A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer 250 ml, em duplicata, com taxa de inoculação de 10^6 esporos ml^{-1} . Os frascos foram incubados em *shaker* e mantidos a 30 °C durante 96 horas, com agitação de 120 rpm.

2.2.1 Determinação da concentração de ácido elágico produzida a partir de extrato aquoso de cacau

As análises iniciais de espectrofotometria e CLAE seguiram a metodologia proposta por Bala et al. (2006). O padrão de AE foi adquirido pela Sigma-Aldrich, com 95% de pureza. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico para cromatografia. A água ultrapura foi obtida pelo sistema MilliQ (Direct-Q[®]3).

Para a análise em espectrofotômetro UV-vis Shimadzu UV-1601PC, a absorbância do AE foi mensurada em comprimento de onda de 255 nm utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Soluções tampão de fosfato de sódio em diferentes pHs (6,2; 7,0; 7,4 e 8,0) foram utilizadas durante a análise a fim de se testar a solubilidade do AE.

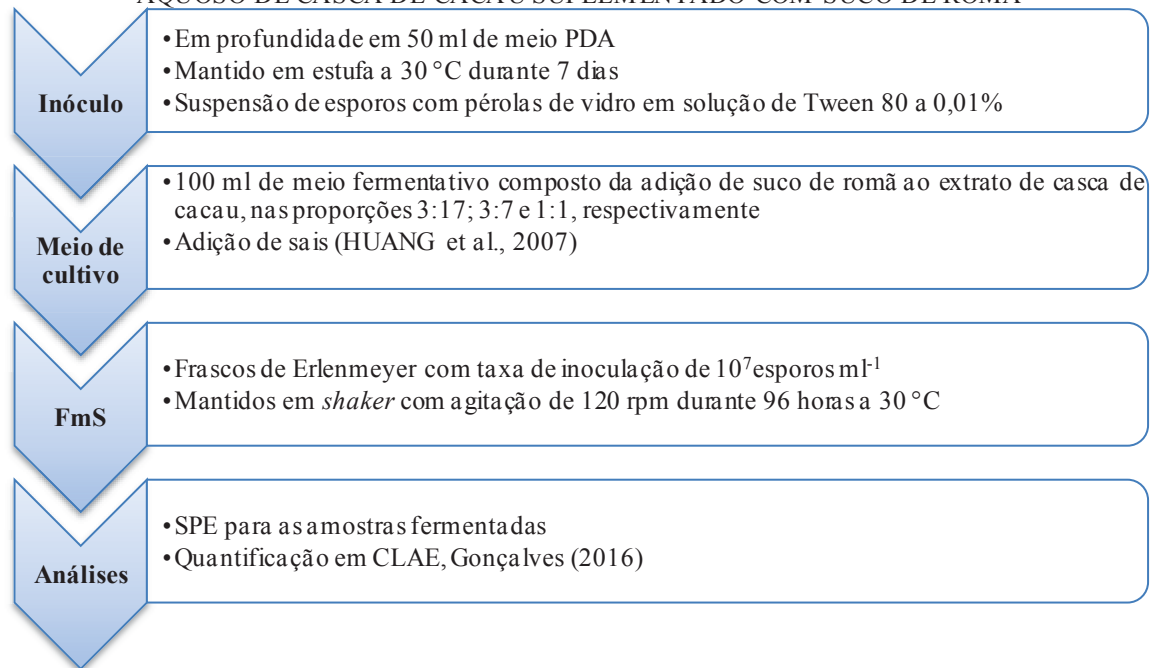
Para a análise de AE em CLAE, foi utilizado o equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna C18 Zorbax Eclipse XDB 4,6 x 150 mm, 5 µm, mantida a 40 °C. O AE foi eluído em regime isocrático, com taxa de fluxo de 1 ml min⁻¹ em fase móvel que consistiu em solução de água acidificada a 0,1% de ácido fosfórico, e acetonitrila (20:80, v/v). A leitura da absorbância ocorreu em comprimento de onda de 254 nm.

2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ

Após a seleção da cepa do microrganismo com melhor desempenho de produção, foi realizada nova fermentação submersa com a adição do suco de romã. O suco de romã foi adicionado ao meio fermentativo com o propósito de atuar como um indutor, a fim de se alavancar a produção do AE.

As etapas do processo fermentativo utilizando suco de romã adicionado ao extrato aquoso de casca de cacau (Lote 2016) podem ser visualizadas na FIGURA III.2.

FIGURA III.2 – PROCEDIMENTO PARA A FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE CACAU SUPLEMENTADO COM SUCO DE ROMÃ



O suco da romã foi obtido a partir da polpa e das sementes da fruta, processadas em liquidificador; o bagaço foi separado do suco por filtração simples. O extrato aquoso das cascas de cacau (Lote 2016) permaneceu como meio base para a fermentação, suplementado com os sais (HUANG et al., 2007). Dessa forma, foram estabelecidas três condições de meio fermentativo:

- 15 ml de suco de romã + 85 ml de extrato de casca de cacau – proporção 3:17;
- 30 ml de suco de romã + 70 ml de extrato de casca de cacau – proporção 3:7;
- 50 ml de suco de romã + 50 ml de extrato de casca de cacau – proporção 1:1.

A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer 250 ml, em duplicata, com taxa de inoculação de 10^7 esporos/ml. Os frascos foram incubados em *shaker* e mantidos a 30 °C durante 96 horas, com agitação de 120 rpm.

2.4.1 Produção de ácido elágico em fermentação no estado sólido a partir de casca de cacau suplementada com casca de romã

Para efeitos comparativos, foi realizada uma fermentação no estado sólido (FES) para, dessa forma, encontrar a melhor técnica para a produção de AE. A FES foi realizada nas seguintes condições:

O inóculo foi previamente preparado pela técnica de profundidade em 50 ml de meio de cultivo PDA, mantido em estufa a 30 °C durante 7 dias. A suspensão dos esporos foi preparada a partir de solução extratora Tween 80 a 0,01%, com agitação magnética.

A solução nutritiva foi preparada em conformidade com o descrito em trabalho de Carbó (2009), utilizando os sais Czapeck, sendo eles: NaNO_3 (7,65 g Γ^1); KH_2PO_4 (3,04 g Γ^1); KCl (1,52 g Γ^1) e MgSO_4 (1,52 g Γ^1).

Como substrato/suporte foram utilizados 3 g de cascas no total com 70% de umidade – sendo 1,5 g de casca de cacau (Lote 2016) e 1,5 g de casca de romã – em frascos de Erlenmeyer 150 ml, duplicata, com taxa de inoculação de 10^7 esporos g^{-1} . Os frascos foram incubados em estufa e mantidos a 30 °C durante 96 horas.

Em um primeiro momento, por se tratar de testes iniciais, a extração foi realizada em 20 ml de água deionizada contendo 2 g de material fermentado. Esta suspensão foi mantida em agitação magnética durante 15 minutos, com posterior filtração simples em um não-tecido TNT. As amostras foram analisadas por CLAE, de acordo com a metodologia de Gonçalves (2016) – esta metodologia é descrita no item 2.5.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO PRODUZIDA A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ

A metodologia com melhor resposta para a quantificação do AE foi a metodologia empregada por Gonçalves (2016). O método consistiu em fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) acidificados com 2,5% de ácido acético. O gradiente de eluição seguiu:

- 0-18 minutos a 5% do solvente B;
- 18-25 minutos a 25% do solvente B;
- 25-27 minutos a 95% do solvente B;
- 27-27,5 minutos a 95% do solvente B;
- 27,5-32 minutos a 5% do solvente B.

Foi utilizado um fluxo de 1 ml min^{-1} , o volume de injeção da amostra foi 20 μl e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 280 nm. As análises foram realizadas em equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna C18 Zorbax Eclipse XDB 4,6 x 150 mm, 5 μm .

A curva padrão de AE para as análises em CLAE foi construída com intervalos de concentração de 5 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O padrão de AE em pó na concentração de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ foi solubilizado em 2 ml de NaOH a 0,005 M e posterior aferição em água Milli-Q. A concentração final da solução de NaOH manteve-se em 0,001 M.

2.5.1 Teste de solubilidade do padrão de ácido elágico

Assim como Bala et al. (2006) relataram a dificuldade de solubilização do AE, neste estudo foi observada a ocorrência visível de resuspensão do padrão analítico de AE após um período de tempo e em diversos solventes utilizados para a fase móvel em CLAE. Para isso, foi realizado um teste de solubilidade do padrão com o fim de encontrar-se o solvente adequado de solubilização.

O NaOH é referenciado como o solvente de solubilização pelo fabricante do padrão. O teste consistiu na tentativa de encontrar a solubilização de 100 μg do padrão de AE, em pó, na menor concentração de NaOH possível, para que não ocorresse interação entre o padrão solubilizado em ambiente alcalino com a fase móvel de ambiente ácido a 2,5% de ácido acético. As concentrações de NaOH utilizadas foram: 0,1 M; 0,01 M; 0,005 M e 0,001 M e comparadas após 24 horas.

2.6 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM FASE SÓLIDA

A extração do AE em fase sólida (SPE) teve como objetivo a clarificação e a eliminação de possíveis interferentes em amostras fermentadas para análises posteriores por cromatografia.

Poucas são as referências na literatura (Mininel et al., 2014; Yan et al., 2014) que descrevam metodologias de SPE específicas ao AE. Para efeitos de comparação, foram utilizadas duas colunas de extração com adsorventes de porosidades diferentes:

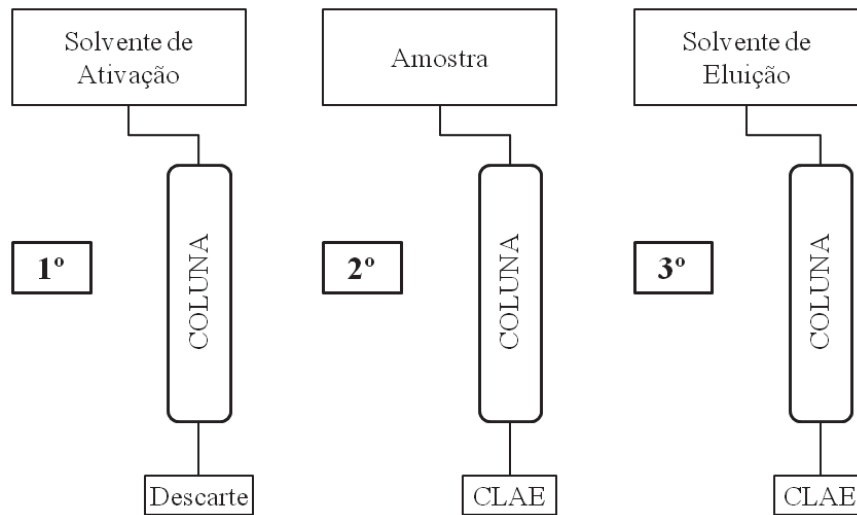
- Coluna Waters Sep-Pak Vac 35cc C18, 10 g, 60 ml, tamanho de partícula 55-105 μm ;
- Coluna Spe-ed C18/18 Applied Separations, 500 mg, 3 ml, tamanho de partícula 55 μm .

Para testar a eficiência da SPE para posterior quantificação do AE em CLAE, foram testadas as condições de ativação da coluna e as condições de eluição com diversos solventes e volumes – 10 ml, 20 ml e 25 ml – de acordo com a necessidade de eluição da amostra de padrão AE 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Os testes com a coluna de 60 ml foram baseados na metodologia de SPE utilizada no trabalho de Mininel et al. (2014), onde objetivaram a quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcolico da planta *Terminalia catappa* Linn. Para a coluna de 3 ml, a metodologia foi baseada no trabalho de Gonçalves (2016), que avaliou os compostos fenólicos presentes nas amêndoas de cacau.

As amostras fermentadas passaram por uma filtração simples prévia, visando à remoção de biomassa, e o fluxo através da coluna seguiu pela ação da força da gravidade. O procedimento é esquematizado na FIGURA III.3.

FIGURA III.3 – SEQUÊNCIA DO TESTE PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA



Para os testes com a coluna de 60 ml, o procedimento de ativação da coluna seguiu com volume padronizado de 10 ml para cada solvente. Tal procedimento consiste na passagem de solvente capaz de acionar os sítios ativos da coluna de adsorção. Os testes de ativação foram realizados com os solventes metanol e acetonitrila. Após a passagem do solvente de ativação, a coluna foi lavada com 10 ml de água – que atua como fase reversa – em todas as ocasiões.

A passagem das amostras foi padronizada em volume de 10 ml. Para a eluição dos seus componentes, que ficaram retidos na coluna, foram testados os solventes elencados na TABELA III.1.

TABELA III.1 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A SPE COM A COLUNA SEP-PAK 35 CC

CONDIÇÃO	SOLVENTE DE ATIVAÇÃO	AMOSTRA	SOLVENTE DE ELUIÇÃO
1	10 ml metanol 10 ml água	10 ml	10 ml metanol:água acidificada a 0,1% ácido fórmico (2:1)
2	10 ml metanol 10 ml água	10 ml	10 ml metanol
			20 ml metanol
3	10 ml acetonitrila 10 ml água	10 ml	10 ml ácido acético:acetonitrila (70:30)
4	10 ml metanol 10 ml água	10 ml	10 ml metanol:água (1:1)
			20 ml metanol:água (1:1)
			25 ml metanol:água (1:1)

Todas as amostras passadas pela coluna SPE e seus respectivos solventes de eluição foram analisados em CLAE (metodologia descrita no item 2.5), a sequência das análises está disponível no QUADRO III.2. Para os testes com a coluna de 3 ml, foram padronizados volumes de 2 ml e foi utilizada a melhor condição de extração encontrada para a coluna Sep-Pak 35 cc, seguindo a sequência anteriormente esquematizada na FIGURA III.3. Foram utilizados 2 ml de metanol e 2 ml de água para a etapa de ativação, passagem de 2 ml de amostra, e 2 ml do solvente de eluição metanol-água (1:1), com posterior análise em CLAE.

QUADRO III.2 – SEQUÊNCIA DE AMOSTRAS DESTINADAS À ANÁLISE EM CLAE

(Continua)

AMOSTRAS DESTINADAS À ANÁLISE EM CLAE				
COLUNA SEP-PAK 35 CC				
TESTE DE EFICIÊNCIA	Amostra contendo AE 100 µg ml ⁻¹ após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição testado na condição 1	Amostra contendo AE 100 µg ml ⁻¹ após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição testado na condição 2	Amostra contendo AE 100 µg ml ⁻¹ após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição testado na condição 3	Amostra contendo AE 100 µg ml ⁻¹ após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição testado na condição 4
AMOSTRAS FERMENTADAS	Amostra fermentada com adição de suco de romã (3:17) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 25 ml metanol:água (1:1)	Amostra fermentada com adição de suco de romã (3:7) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 25 ml metanol:água (1:1)	Amostra fermentada com adição de suco de romã (1:1) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 25 ml metanol:água (1:1)	Os solventes de eluição passados pela coluna e submetidos a uma etapa de concentração do conteúdo de AE em estufa a vácuo

QUADRO III.2 – SEQUÊNCIA DE AMOSTRAS DESTINADAS À ANÁLISE EM CLAE

(Termina)

COLUNA SPE-ED C18/18			
TESTE DE EFICIÊNCIA	Amostra contendo AE 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição metanol:água (1:1)		
AMOSTRAS FERMENTADAS	Amostra fermentada com adição de suco de romã (3:17) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 2 ml metanol:água (1:1)	Amostra fermentada com adição de suco de romã (3:7) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 2 ml metanol:água (1:1)	Amostra fermentada com adição de suco de romã (1:1) após a passagem pela coluna, e seu respectivo solvente de eluição – 2 ml metanol:água (1:1)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises por cromatografia, o extrato aquoso da casca de cacau apresentou uma pequena concentração correspondente ao AE – de ocorrência natural – de 0,0272 mg AE g^{-1} de casca de cacau e um pH de 6,18. É possível que essa concentração seja representada pelo AE na forma livre, no entanto, não se tem o conhecimento sobre quais elagitaninos estão presentes na casca de cacau. Por este motivo, um método alternativo para a quantificação do precursor elagitanino seria mais adequado, pois, conforme observado anteriormente, o precursor elagitanino em meio aquoso sofre hidrólise e se lactoniza em AE (HAGERMAN, 2002). A literatura relata concentrações mais elevadas de AE de ocorrência natural em frutas diversas, plantas e madeiras. O valor obtido para a casca de cacau se equipara ao encontrado em banana (0,02 mg g^{-1}) por Williner, Pirovani e Güemes (2003) que também encontraram valores superiores para pera e tangerina (0,04 mg g^{-1}), abacaxi (0,06 mg g^{-1}), maçã verde e ameixa (0,07 mg g^{-1}). No presente experimento foi encontrada a concentração de 0,0086 mg g^{-1} para o suco da romã, obtido a partir do processamento da polpa e sementes.

3.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU

A TABELA III.2 indica a produção de AE encontrada para quatro cepas de *Aspergillus*, não sendo detectada a produção de AE para os demais microrganismos testados.

TABELA III.2 – SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO ELÁGICO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

MICROORGANISMO	PRODUÇÃO (mg AE g ⁻¹)	pH
<i>Aspergillus niger</i> LPB B6 (CCT 7717)	0,1511	6,24
<i>Aspergillus niger</i> LPB BC (CCT7716)	0,0523	6,22
<i>Aspergillus oryzae</i> IZ9	0,0115	6,16
<i>Aspergillus niger</i> S	0,0046	6,12

Na presente pesquisa, a produção obtida por *A. niger* LPB B6 (CCT 7717), de 0,1511 mg AE g⁻¹ casca, supera a produção de AE alcançada por Vattem e Shetty (2003), que utilizou *cranberry* como substrato a partir do fungo *Lentinus edodes*. Em extração aquosa de AE, eles obtiveram a concentração de 0,116 mg g⁻¹ e 0,107 mg g⁻¹, utilizando NH₄NO₃ e proteína hidrolisada de peixe como fontes de nitrogênio, respectivamente. Os autores alcançaram concentrações mais elevadas de 0,320 mg g⁻¹ e 0,350 mg g⁻¹, quando realizada a extração de AE com etanol.

Os demais relatos apresentaram a produção de 4,74 mg g⁻¹ e 7,56 mg g⁻¹ para as plantas *creosote* e *tar bush*, respectivamente, a partir do *Aspergillus niger* PSH (VENTURA et al., 2008); 12,39 mg g⁻¹ de casca de romã com o fungo *Aspergillus niger* GH1 (AGUILERA-CARBÓ, 2009); e 160 mg g⁻¹ utilizando noz de carvalho pela cepa de *Aspergillus niger* SHL6 (HUANG; NI; BORTHWICK, 2005).

Testes em espectrofotômetro com comprimento de onda a 255 nm foram realizados, seguindo o descrito por Bala et al. (2006). Durante as leituras foi observada a interação entre as soluções tampão e a amostra padrão de AE, dessa forma, não foram observadas bandas correspondentes ao AE quando do uso de solução tampão em baixos pHs.

A metodologia inicial utilizada para CLAE, também descrita por Bala et al. (2006), detectou o pico correspondente ao padrão de AE aos 1,856 minutos. Porém, o método apresentava um tempo de retenção muito curto e as amostras apresentavam picos com muitos ruídos interferentes. É possível que tais interferências tenham ocorrido devido à presença de viscosidade observada nas amostras, possivelmente devido à pectina presente na casca de cacau relatada por Vriesmann, Amboni e Petkowicz (2011).

3.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM SUCO DE ROMÃ

A produção de AE foi realizada conforme as condições descritas no item 2.4. Ela foi determinada pelas análises em CLAE, conforme metodologia de Gonçalves (2016) e está ilustrada na TABELA III.3.

TABELA III.3 – PRODUÇÃO DE AE A PARTIR DE EXTRATO DE CASCA DE CACAU SUPLEMENTADA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE SUCO DE ROMÃ E ANÁLISE EM CLAE

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg AE g ⁻¹)	pH
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:17)	0,0861 ± 0,05	6,16
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:7)	0,0297 ± 0,03	5,48
Suco romã – extrato de casca de cacau (1:1)	n.d.	4,75

LEGENDA : n.d. não detectado.

O suco da romã foi adicionado ao meio fermentativo com o objetivo de atuar como agente indutor para elevar os níveis de produção de AE. Comparando este resultado de 0,0861 mg g⁻¹ casca de cacau com o anterior obtido durante a seleção de microrganismos (0,1511 mg g⁻¹ casca de cacau), não foi alcançado o aumento de produção esperado. Observa-se um declínio no pH conforme foram adicionados volumes maiores do suco da romã. Isso se deve à romã ser muito ácida – o suco possui um pH de 3,95 – o que pode ter interferido com o metabolismo do fungo, pois o extrato aquoso da casca de cacau possui um pH de 6,18 próximo à neutralidade – pH este que foi mantido na faixa de 6 por todos os microrganismos durante as fermentações para a seleção de cepas. Não foi detectada produção de AE para a proporção de suco-extrato 1:1, possivelmente devido à questão do pH. A biotransformação de elagitanino a AE é altamente influenciada pelo pH, uma vez que depende da atuação de enzimas xilanases, celulases e tanino acil hidrolases, cujo pH ótimo gira em torno de 4 a 5 (HUANG et al., 2007).

Mantendo a romã como agente indutor, a sugestão seria testar um extrato aquoso da casca da fruta e realizar a correção do pH.

Comparando-se com a literatura, este resultado de 0,0861 mg g⁻¹ extrato da casca de cacau está em concentração mais baixa do que aqueles valores obtidos por Vatterm e Shetty (2003). Os autores produziram AE em *cranberry* como substrato pelo intermédio do fungo *Lentinus edodes* e alcançaram as concentrações de 0,116 mg g⁻¹ e 0,107 mg g⁻¹ utilizando NH₄NO₃ e proteína hidrolisada de peixe como fonte de nitrogênio, respectivamente, em extrato aquoso. Os demais relatos de produção ainda permanecem superiores.

Ressalta-se que, nesta pesquisa, não foram realizados estudos visando à otimização de processo. Portanto, em continuidade aos experimentos, concentrações mais elevadas de AE podem ser obtidas.

3.2.1 Produção de ácido elágico em fermentação no estado sólido a partir de casca de cacau suplementada com casca de romã

A extração do conteúdo de AE a partir do material fermentado foi realizada em água deionizada; com isso, não foram detectados picos correspondentes. O AE pode ter sido produzido por FES, mas pode não ter sido quantificado devido a limitações analíticas. Como sugestão para a extração aquosa, seria proveitoso realizar a recuperação de seu possível conteúdo de AE através de uma extração em fase sólida. Podem-se testar, também, solventes de extração variados como solução de NaOH 0,001 M, metanol e etanol, bem como em solução hidroalcoólica, variando suas proporções.

3.2.2 Teste de solubilidade do padrão de ácido elágico

Um teste de solubilidade do padrão analítico de AE foi realizado para que não houvesse interação entre a fase móvel que utiliza ácido acético 2,5% (GONÇALVES, 2016) e o padrão, evitando-se assim sua precipitação durante as análises em CLAE. No rótulo do padrão de AE o fabricante recomenda sua solubilização em NaOH 1N. O teste de solubilidade visou, em primeiro lugar, a solubilização do padrão na menor concentração possível de solução de NaOH, e em segundo, que o padrão AE solubilizado em NaOH mantivesse uma estabilidade durante as leituras em CLAE, impedindo sua precipitação.

Dessa forma, condições foram testadas utilizando 100 µg do padrão analítico em pó sendo solubilizados em quatro diferentes concentrações de NaOH. Foram realizadas aferições do volume com água Milli-Q, pois a aferição em metanol resultou em resuspensão do padrão AE. Os resultados podem ser observados na TABELA III.4.

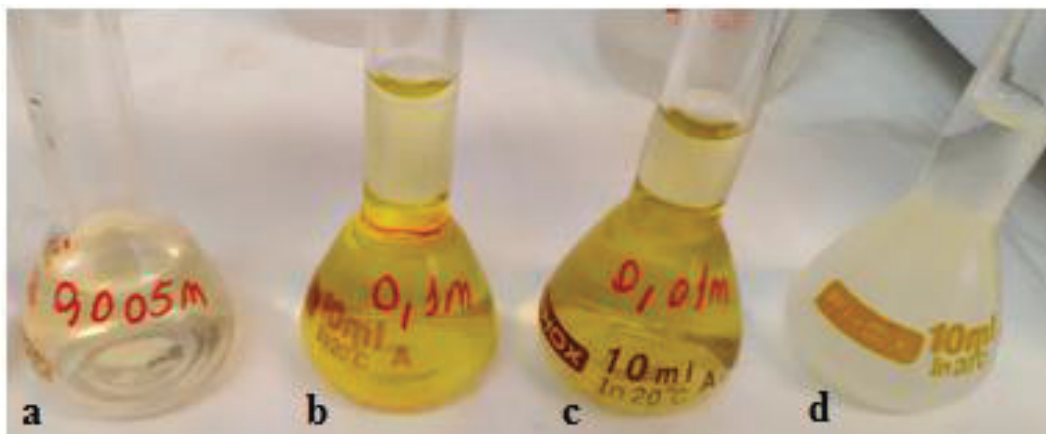
TABELA III.4 – RESULTADOS OBSERVADOS PARA O TESTE DE SOLUBILIDADE DO PADRÃO AE 100 µg

ENSAIO	CONCENTRAÇÃO NaOH	VOLUME NaOH	pH
1	0,1 M	200 µl	6
2	0,01 M	900 µl	7
3	0,005 M	2 ml	6
4	0,001 M	10 ml	6

Os volumes utilizados nas condições 1, 2 e 3 foram aceitáveis e possibilitaram solubilizar 100 µg do padrão analítico de AE. A quarta condição utilizou 10 ml de NaOH e partículas de pó ficaram remanescentes em suspensão. Para solubilizá-las seria necessária a adição de um maior volume, o que ultrapassaria o volume de 10 ml utilizado para as aferições. Como o teste visava utilizar a menor concentração possível de NaOH para a solubilização do padrão, de forma a evitar a precipitação resultante da reação entre o padrão solubilizado em pH básico e a fase móvel acidificada, a melhor condição observada após 24 horas foi a terceira. Após a aferição em 10 ml não houve resuspensão do padrão; a concentração de NaOH se manteve em 0,001 M, pH 6, e não interagiu com a fase móvel.

Durante a execução da diluição, foi observada uma mudança de coloração do padrão (FIGURA III.4). À medida que se adicionava a solução de NaOH ao padrão, a sua coloração passava de um tom mais escuro (amarronzado) para um mais claro (amarelado) – provavelmente em razão do aumento do pH que favorece a hidrólise das lactonas. O mesmo foi observado por Bala et al. (2006), que relataram que, para solubilizar 5 mg de AE, foram necessários 0,2 ml de N-metil pirrolidona, 2,5 ml de piridina, e 25 ml de etanol. Por ser um ácido de natureza fraca, a solubilização do AE é melhor em solventes básicos. Como sugestão, pode-se testar a solubilização do padrão analítico de AE em solução de metanol-água (1:1), bem como variar suas proporções.

FIGURA III.4 – MUDANÇA DE COR OBSERVADA CONFORME A ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE NaOH AO PADRÃO DE ÁCIDO ELÁGICO



LEGENDA: **a:** padrão de AE ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) solubilizado em NaOH 0,005 M; **b:** padrão de AE ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) solubilizado em NaOH 0,1 M; **c:** padrão de AE ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) solubilizado em NaOH 0,01 M. **a, b e c** foram aferidos em água Milli-Q, respectivamente. **d:** padrão de AE ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) solubilizado em NaOH 0,1 M aferido em metanol, com ocorrência de resuspensão do padrão.

3.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM FASE SÓLIDA

Com o objetivo de eliminar possíveis componentes interferentes nas amostras, foram testadas diversas condições de ativação e eluição em duas colunas, anteriormente apresentadas na FIGURA III.3 e TABELA III.1. As análises em CLAE seguiram a metodologia de acordo com a utilizada por Gonçalves (2016).

Após a passagem de 10 ml da amostra de padrão AE 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pela coluna Sep-Pak Vac 35 cc, foi observado que o conteúdo de AE da amostra ficou retido na coluna, posteriormente confirmado com a análise dessa amostra e de seu solvente de eluição em CLAE (TABELA III.5).

TABELA III.5 – TESTE DE EFICIÊNCIA DA COLUNA SEP-PAK E ANÁLISE EM CLAE

AMOSTRA	A.P.	S.P.
Padrão AE 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,9275 $\mu\text{g ml}^{-1}$	45,8802 $\mu\text{g ml}^{-1}$

LEGENDA: **A.P.:** amostra passada pela coluna – AE não retido.
S.P.: solvente passado pela coluna – AE recuperado.

A quarta condição testada (TABELA III.1) apresentou o melhor solvente de extração do AE da coluna Sep-Pak Vac 35 cc, que conseguiu recuperar 46% do conteúdo de AE retido. Tal condição consistiu na ativação da coluna com metanol e água e 25 ml de solvente de eluição metanol – água (1:1). A quarta condição foi então utilizada para a SPE das amostras fermentadas e foi utilizada também para a coluna Spe-ed C18/18 em volume de 2 ml.

Diante dos resultados obtidos anteriormente pela fermentação submersa, uma SPE foi realizada para as amostras fermentadas com o objetivo de realizar um *clean-up* nas mesmas. Os dados das análises em CLAE para a extração em coluna Sep-Pak Vac 35 cc estão disponíveis na TABELA III.6. Tais dados relacionam-se às amostras fermentadas submetidas à SPE, ao solvente de eluição utilizado metanol-água (1:1), e ao mesmo solvente de eluição submetido a uma etapa de concentração do conteúdo de AE em estufa a vácuo. Na mesma constam os resultados para o procedimento de SPE com a coluna Spe-ed C18/18, após análises em CLAE.

TABELA III.6 – AMOSTRAS FERMENTADAS APÓS SPE EM COLUNA SEP-PAK VAC 35 CC E SPE-ED C18/C18 COM ANÁLISE EM CLAE

AMOSTRAS FERMENTADAS	SEP-PAK 35 CC	A.P.	S.P.	S.P.C.	SPE-ED C18/C18	A.P.	S.P.
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:17)		n.d.	n.d.	2,3463 mg g ⁻¹ ± 0,5		n.d.	0,0145 mg g ⁻¹ ± 0,03
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:7)		n.d.	n.d.	0,2117 mg g ⁻¹ ± 0,3		n.d.	0,0602 mg g ⁻¹ ± 0,01
Suco romã – extrato de casca de cacau (1:1)		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.

LEGENDA: A.P.: amostra passada pela coluna – AE não retido.

S.P.: solvente passado pela coluna – AE recuperado.

S.P.C.: solvente passado pela coluna e concentrado em estufa à vácuo – AE recuperado.

n.d. não detectado.

A recuperação de 46% do padrão de AE durante os testes iniciais, indicou a viabilidade do uso de uma SPE e que suas condições devem ser otimizadas. Conforme apresentado no teste de solubilidade, o padrão analítico de AE foi solubilizado em solução de NaOH 0,005M. Assim, como sugestão para trabalhos posteriores, em testes para a otimização da SPE o conteúdo de AE retido na coluna pode ser extraído utilizando a solução de NaOH-água (1:1) como solvente de eluição, ou metanol-NaOH.

As amostras fermentadas, após a passagem pelas colunas de SPE, foram analisadas em CLAE e apresentaram um baixo ou nenhum conteúdo de AE. Tal fato é esperado em um procedimento SPE, pois os componentes das amostras devem interagir com a coluna para, dessa forma, ficarem retidos e serem, posteriormente, eluídos com a passagem de solvente de maior afinidade. Para a extração desses componentes foi utilizado 25 ml de solvente metanol-água (1:1), sendo este solvente eluído da coluna de SPE também analisado em CLAE.

A passagem do solvente de eluição pelas colunas apresentou uma baixa ou nenhuma concentração de AE. Esse resultado demonstrou que o conteúdo de AE pode ter ficado retido na coluna ou, também, que pode ter havido um maior conteúdo de AE nos solventes eluídos. Para a sua quantificação, esses solventes eluídos necessitariam de uma evaporação da água e componentes voláteis que causam a dispersão das moléculas do ácido na amostra. Visando a recuperação do conteúdo de AE, neste trabalho, os eluídos foram concentrados em estufa a vácuo reduzindo-os de um volume de 10 ml para 5 ml. A SPE em coluna Sep-Pak mostrou resultados mais satisfatórios, a concentração do eluído, por sua vez, alcançou um teor de AE de 2,3 mg g⁻¹ casca. Já a coluna Spe-ed C18/18 não foi tão eficiente. Houve uma baixa ou nenhuma interação dos compostos presentes no fermentado com a coluna, provavelmente isso se deve a sua porosidade, de 55 µm. As amostras podem ter apresentado um baixo conteúdo

de AE devido ao pH ácido do suco da romã, como observado anteriormente. Também é possível que outros componentes presentes nas amostras tenham interferido durante a SPE.

Na FIGURA III.5 podem ser visualizadas as colunas Sep-Pak e Spe-ed antes e depois da passagem das amostras fermentadas. Nota-se que o conteúdo da amostra ficou retido na coluna.

FIGURA III.5 – COLUNAS SEP-PAK VAC 35CC E SPE-ED C18/18 ANTES E DEPOIS DA PASSAGEM DE AMOSTRAS FERMENTADAS



LEGENDA: **a** e **b** mostram a coluna Sep-Pak Vac 35 cc antes e após a passagem das amostras fermentadas, respectivamente. **c** e **d** mostram a coluna Spe-ed C18/18 antes e após a passagem das amostras fermentadas, respectivamente. Em ambos os casos, é visível a diferença de coloração na resina das colunas decorrente da retenção do conteúdo amostral.

Mininel et al. (2014) utilizaram a SPE, em uma etapa pré-cromatográfica, para remover contaminantes do extrato hidroalcoólico da planta *Terminalia catappa*. A purificação foi realizada em coluna Phenomenex Strata C18 com o seguinte procedimento: ativação em 5 ml de metanol, equilíbrio com 5 ml de metanol-água (1:1), eluição dos compostos com 1 ml de metanol-água (1:1). Após etapas de secagem, resuspensão e análise, o resultado foi confirmado por coinjeção de amostras que obtiveram uma taxa de recuperação de 87% do AE.

Yan et al. (2014) também utilizaram a SPE como uma etapa pré-cromatográfica, em coluna ProELut PLS, para a remoção de impurezas em amostras de plasma e tecidos. Primeiramente, as colunas foram acondicionadas em 3 ml de metanol e 3 ml de água. Após a passagem de amostra, elas foram lavadas com 3 ml de água deionizada e 3 ml de solução água acidificada a 0,1% ácido fórmico-metanol (60:40). Em seguida, o conteúdo da coluna foi

novamente eluído com 0,5 ml de água acidificada 0,1% ácido fórmico-metanol (10:90). A análise em CLAE mostrou que a recuperação do AE com metanol foi de 3%, e, após testes de gradiente – com ácido tricloroacético, H_3PO_4 , e NaOH – e otimizações, concluíram que o melhor solvente de eluição foi água acidificada 0,1% ácido fórmico-metanol (10:90), com 98,5%.

A proposta do presente trabalho foi testar a produção direta de AE por fermentação submersa, a qual, até o momento, é relatada apenas como adequada para a síntese enzimática que degrada os elagitaninos tais como elagitanases, celulases, β -glucosidases e demais enzimas ainda desconhecidas da rota metabólica. Essa técnica é compensatória pela facilidade de escalonamento em relação à FES, a qual é justificada pela alta concentração de substrato e seu contato direto com o microrganismo.

Estes dados de produção relacionam-se a condições ainda não otimizadas, e ainda não foi relatada a produção de AE a partir de cascas de cacau como substrato. O processo fermentativo conseguiu elevar a concentração de AE através da bioconversão do substrato pelo *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) em relação à concentração presente na casca de cacau.

A extração em fase sólida (SPE), tal como desenvolvida no presente trabalho, indicou a sua viabilidade de uso. Os estudos e testes de otimização da SPE para o AE devem ser continuados, pois são poucas as metodologias disponíveis na literatura abordando o assunto.

A necessidade dos sais utilizados na fermentação submersa deve ser avaliada, podendo-se avaliar também a concentração de nitrogênio e a relação de carbono disponível na casca de cacau. Pode-se testar em FES outras condições de processo, extração do AE e de análise para se alcançar melhores resultados. Os resultados obtidos neste trabalho, por meio da fermentação submersa, apresentam-se ainda em baixas concentrações; porém, pode-se recuperar o AE por meio da SPE para efetivar a análise em CLAE.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

Não existem relatos na literatura onde se utilizam cascas de cacau como meio de cultivo para a produção de biomoléculas, e, atualmente, a casca apresenta grande potencial para produção de ácidos orgânicos. De maneira geral, a casca apresentou composição físico-química de interesse a microrganismos e pH próximo à neutralidade, indicando se tratar de um material recomendado para uso em alguns processos fermentativos por não apresentar necessidade da correção do pH de substrato. Dependendo do processo onde será utilizada, não há a necessidade de suplementação de determinados sais ao meio contendo casca de cacau.

Com a constante demanda por AC pelo mercado e a perspectiva de alta na sua procura, novas formas de produção devem ser exploradas. A principal delas é o uso de microrganismos adaptáveis a condições variadas de produção e com alto rendimento em menor tempo de fermentação. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) apresentou um alto rendimento de produção – 0,8542 g AC kg⁻¹ de substrato – atingindo o pico de produção em 72 horas. Tal resultado mostrou ser possível o emprego da casca de cacau como uma alternativa de substrato em um processo fermentativo para a produção de uma biomolécula de grande interesse industrial.

Dentre os possíveis desdobramentos da presente pesquisa podem ser elencados os seguintes:

- Buscar caracterizar as enzimas secretadas pela espécie *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) utilizando a casca de cacau como substrato;
- Testar a produção de AC utilizando as cascas de cacau em fermentação submersa – na forma de extrato ou sólidos suspensos – visando um aumento de escala de produção;
- Analisar a influência da adição de diferentes sais, variação de fonte de nitrogênio e a concentração de carbono presente na casca;
- Dado o grande acúmulo de viscosidade observado nas amostras, uma ideia seria a caracterização de pectina e também a sua extração para fins comerciais, ou o uso do meio diretamente para a produção de pectinases.

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

O AE apresenta propriedades e funções fundamentais na dieta humana, e por apresentar muitos tópicos ainda a serem explorados, suas referências na literatura são poucas e na sua maioria antigas. A pesquisa acerca dele precisa ser retomada, atualizada e difundida em todas as áreas. O ácido possui diversas propriedades, porém ainda não se sabe exatamente como elas atuam e como devem ser aproveitadas.

Em relação aos resultados do presente trabalho, é possível que a concentração de AE encontrada no extrato aquoso da casca de cacau seja representada pelo AE na forma livre; por outro lado, também é possível que ele seja um produto da hidrólise em meio aquoso do(s) precursor(es) e lagitanino(s) – ainda desconhecido(s).

Como ainda não foram encontrados relatos sobre a produção de AE a partir de cascas de cacau como substrato, os dados de produção relacionam-se a testes iniciais e a condições ainda não otimizadas. Através da bioconversão do substrato pelo *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) foi possível elevar a concentração de AE em relação à concentração presente no extrato da casca de cacau. A SPE indicou a sua viabilidade com a recuperação de 46% do conteúdo presente nas amostras, e são necessários estudos para a sua otimização, pois se trata de uma alternativa de recuperação do conteúdo de AE em amostras com baixas concentrações.

Assim, como sugestões para o avanço da pesquisa são sugeridos os seguintes:

- Determinar quais são os precursores do AE existentes na casca de cacau;
- Encontrar um método para a quantificação dos elagitaninos presentes na casca de cacau;
- Determinar as várias enzimas da rota de transformação dos precursores até o AE;
- Otimizar as condições da FES e de extração do conteúdo de AE;
- Avaliar a necessidade dos sais utilizados, bem como a concentração de nitrogênio e carbono disponíveis na casca de cacau, para a produção de AE;
- Verificar a influência da romã para a produção de AE utilizando extrato aquoso da casca de cacau;
- Otimizar as condições de extração de AE em SPE.

REFERÊNCIAS

- ABE, I. et al. **Ellagitannins and hexahydroxydiphenoyl esters as inhibitors of vertebrate squalene epoxidase.** Journal of Natural Products, v. 64, n. 8, p. 1010-1014, 2001.
- ADAMAFIO, N. A. **Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview.** Journal of Biological Sciences, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013.
- ADOMAKO, D. **Cocoa pod husk pectin.** Phytochemistry, v. 11, n. 3, p. 1145-1148, 1972.
- AFOAKWA, E. O. Chocolate production and consumption patterns. In: **Chocolate science and technology.** New York: Wiley-Blackwell, p. 2-11. 2010.
- AGUILERA-CARBÓ, A. F. et al. **Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 78, n. 2, p. 189-199, 2008a.
- AGUILERA-CARBÓ, A. F. et al. **Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources.** Chemical Papers, v. 62, n. 4, p. 440-444, 2008b.
- AGUILERA-CARBÓ, A. F. **Producción de ácido elágico: estudios enzimáticos.** 2009. 131 f. Tesis (Doctorado en Biotecnología) - Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F., 2009.
- AHN, D. et al. **The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes.** Carcinogenesis, 17, v. 4, p. 821-828. 1996.
- AJIBOYE, A. E.; SANI, A. **Fermentation of the fruit pulp of *Dialium guineense* (velvet tamarind) for citric acid production using naturally occurring fungi.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences v. 4, n. 7, p. 432-440. 2015.
- ALBRECHT, M. et al. **Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells.** Journal of Medicinal Food, v. 7, n. 3, p. 274-283, 2004.
- ALCAIDE, R. L. M; FORTI, M. C. **Protocolo de determinação de cátions inorgânicos em soluções aquosas por cromatografia líquida de íons.** Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São José dos Campos, 2014.
- ALEMAWOR, F. et al. **Broiler performance on finisher diets containing different levels of either *Pleurotus ostreatus*-fermented dried cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes.** Tropical Animal Health and Production v. 42, p. 933-939. 2010.

- ALVAREZ-VASQUEZ, F.; GONZÁLEZ-ALCÓN, C.; TORRES, N.V. **Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger***: model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, n. 1, p.82–108, 2000.
- ANDERSEN, M. R.; LEHMANN, L.; NIELSEN, J. **Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH**. *Genome Biology*, v. 10, n. 5, p. 47, 2009.
- ANGUMEENAL, A. R. et al. **Effect of transition metal cations and anions on the production of citric acid by *Aspergillus niger***. *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 9, p. 508-512. 2002.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. **An overview of citric acid production**. *LWT – Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 367-370. 2013.
- ANTTONEN, J. M.; KARJALAINEN, O. R. **Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry**. *Journal of Food Composition and Analysis* v. 18, n. 8, p. 759-769. 2005.
- APPLIED SEPARATIONS. **SPE products**. Labicom. Disponível em: < <https://www.labicom.cz/cogwpsogd/uploads/2016/07/SPE-Catalog.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2017.
- APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. **Flavor chemistry of cocoa and cocoa products - An overview**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016.
- ARLORIO, M. et al. **Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂**. *Food Research International*, v. 38, n. 8, p. 1009-1014, 2005.
- BADIYANI, B. K. et al. **Chocolate disinfectant: effectiveness of cocoa bean husk extract on *Streptococcus mutans* in used toothbrushes**. *International Journal of Oral Care and Research*, v. 1, n. 1, p. 7-10. 2013.
- BALA, I. et al. **Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006.
- BARAZARTE, H.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. **La cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.): uma possible fuente comercial de pectinas**. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 58, n. 1, 2008.

- BARI, M. N. et al. **Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches**: Optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 12, p. 3113-3120, 2009.
- BARROS, F. F. C.; DIONISIO, A. P.; SILVA, J. C. Princípios de Microbiologia. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA, M. R. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, v. 12. 2013.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L, K.; MACEDO, G, A. **Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos**. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.
- BATISTA, R. R. et al. **Routes of technological exploitation of agricultural waste for power generation**. *Latin American Journal of Energy Research*, v. 2, n. 1, p. 15-27, 2015.
- BELLO, O. S.; AHMADA, M. A. **Adsorptive removal of a synthetic textile dye using cocoa pod husks**. *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 93, n. 7, p. 1298-1308, 2011.
- BEROVIC, M.; LEGISA, M. **Citric acid production**. *Biotechnology Annual Review*, v. 13, p. 303-343, 2007.
- BHARGAVA, U. C.; WESTFALL, B. A. **Antitumor activity of Juglans nigra (black walnut) extractives**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 57, n. 10, p. 1674-1677, 1968.
- BIALONSKA, D. et al. **Urolithins, microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell based assay**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 21, p. 10181-10186, 2009.
- BIALONSKA, D. et al. **The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, n. 2, p. 175-182, 2010.
- BIANCO, M. A.; HANDAJI, A.; SAVOLAINEN, H. **Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples**. *Science of the Total Environment*, v. 222, n. 1, p. 123-126, 1998.
- BLAIR, G.; STAAL, P. Haarmann and Reimer Corporation. Citric acid. In: KROSCHWITZ, J. I.; HOWE-GRANT, M. (Eds.), **Encyclopedia of chemical technology**. John Wiley & Sons Inc, p.354–380. 1991.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. **Protein quality assessment in cocoa husk**. *Food Research International*, v. 32, n. 3, p. 201-208, 1999.

- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Método de Ensaio – MET.** Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO. Rio Grande do Sul, 2014.
- CANTERI, M. G. et al. **SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft – Knott, Tukey e Duncan.** Revista Brasileira de Agrocomputação, v.1, n.2, p.18-24. 2001.
- CHAN, S. Y.; CHOO, W. S. **Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks.** Food Chemistry, v. 141, n. 4, p. 3752-3758, 2013.
- CHUNDAKKADU, K. **Solid-state fermentation systems—An overview.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.
- CLELAND, W. W.; JOHNSON, M. J. **Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*.** Journal of Biological Chemistry, v. 208, n. 2, p. 679-690, 1954.
- CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. **Review: ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 7, p. 1118-1125, 2000.
- Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 02 maio. 2016.
- Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/sitemda/noticias/cacau-da-bahia-70-da-produ%C3%A7%C3%A3o-nacional>>. Acesso em: 28 mar. 2017.
- CRUZ-ANTONIO, F. V. et al. **Propiedades químicas e industriales del ácido elágico.** Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2, n. 3, p. 1. 2010.
- CRUZ, R. et al. **Biodegradación microbiana de elagitaninos.** Bio Tecnología, v. 15, n. 3, p. 11-18, 2011.
- CURRIE, J. N. **The citric acid fermentation of *A. niger*.** The Journal of Biological Chemistry, v. 31, p. 15-37, 1917.
- DANIEL, E. M. et al. **Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 2, n. 4, p. 338-349, 1989.

- DELLA, V. P.; KÜHN, I.; HOTZA, D. **Reciclagem de resíduos agro-industriais: Cinza de casca de arroz como fonte alternativa de sílica.** *Cerâmica Industrial*, v. 10, n. 2, p. 22-25, 2005.
- DHILLON, G. S. et al. **Recent advances in citric acid bio-production and recovery.** *Food Bioprocess Technology*, v. 4, n. 4, p. 505-529, 2011a.
- DHILLON, G. S. et al. **Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, n. 2, p. 83-92, 2011b.
- DHILLON, G. S. et al. **Apple pomace ultrafiltration sludge – A novel substrate for fungal bioproduction of citric acid: Optimisation studies.** *Food Chemistry*, v. 128, n. 4, p. 864-871, 2011c.
- DHILLON, G. S. et al. **Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor.** *Industrial Crops and Products*, v. 41, p. 78-84, 2013.
- DINIZ, D. M.; DRUZIAN, J. I.; AUDIBERT, S. **Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite.** *Polímeros*, v. 22, n. 3, p. 278-281, 2012.
- DONALD, P. F. **Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems.** *Conservation Biology*, v. 18, n. 1, p. 17-38, 2004.
- DONKOH, A. et al. **Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks.** *Animal Feed Science and Technology*, v. 35, n. 1-2, p. 161-169, 1991.
- ENDRAIYANI, V. et al. **Total phenolics and antioxidant capacity of cocoa pulp: processing and storage study.** *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016.
- FERNANDES, C.; OLIVEIRA, R. **Estudo e determinação do “pH”.** Universidade Federal de Campina Grande. Paraíba, 2015. Disponível em: <<http://www.dec.ufcg.edu.br/saneamento/PH.html>>. Acesso em: 12 jul. 2015.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BEMILLER, J. N. **New products from *Theobroma cacao*: seed pulp and pod gum.** *New Crops*. New York: Wiley, p. 475-8, 1993.

Food and Agriculture Organization – FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e0x.htm>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

FRANZEN, M.; MULDER, M. B. **Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide.** *Biodiversity and Conservation*, v. 16, n. 13, p. 3835-3849, 2007.

GARG, N.; HANG, Y. D. **Microbial production of organic acids from carrot processing waste.** *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, v. 32, n. 2, p. 119-121, 1995.

GIL, M. I. et al. **Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica.** 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Bromatologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

GONÇALVES, C. G. **Avaliação do impacto da fermentação, secagem e torração sobre o perfil dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de sementes de cacau (*Theobroma cacao* var. Forasteiro) produzidos no Estado do Pará.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará. Belém, 2016. Não publicado.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. et al. **Dissimilar *in vitro* and *in vivo* effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 12, p. 5623-5632, 2009.

GOWTHAMAN, M. K.; KRISHNA, C.; MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation—An overview. In: KHACHATOURIANS, G. G.; ARORA D. K. (Eds.), **Applied Mycology and Biotechnology**, v.1. Agriculture and Food Productions p. 305–352. 2001.

GRIMOUX, E.; ADAM, P. **Synthese del'acide citrique.** *CR Acad Sci Paris*, 90, p.252–1256, 1880.

HAGERMAN, A. E. **Hydrolyzable tannin structural chemistry.** *Tannin Handbook*. 2002.

HÄKKINEN, S. H. et al. **Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage.** *European Food Research and Technology*, v. 212, n. 1, p. 75-80, 2000.

- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. **Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger***. Biotechnology Letters, v. 6, n. 11, p. 763-764, 1984.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. **Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid**. Biotechnology Letters, v. 7, n. 4, p. 253-254, 1985.
- HANG, Y. D.; WOODAMS E. E. **Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger***. Bioresource Technology, v. 65, n. 3, p. 251-253, 1998.
- HARTZFELD, P. W. et al. **Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 7, p. 1785-1790, 2002.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols, vegetable tannins revisited**. Cambridge University Press. Cambridge, 1989.
- HAYOUNI, E. A. et al. **Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum L.* peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds**. Phytomedicine, v. 18, n. 11, p. 976-984, 2011.
- HENNING, S. M. et al. **Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum**. Journal of Medicinal Food, v. 13, n. 1, p. 116-122, 2010.
- HOSEYINI, M.; ASEFI, N.; MOZAFFARI, M. **Production of citric acid from apple pomace by using surface culture method**. Agricultural Journal, v. 6, n. 5, p. 226-230, 2011.
- HUANG, W.; NI, J.; BORTHWICK, A. G. L. **Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6**. Process Biochemistry, v. 40, n. 3, p. 1245-1249, 2005.
- HUANG, H. et al. **Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns**. Process Biochemistry, v. 42, n. 9, p. 1291-1295, 2007.
- Instituto Adolfo Lutz – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 4 ed, 2008.
- KAMEI, M. et al. **Anti-influenza virus effects of cocoa**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 96, n. 4, p. 1150-1158, 2016.

- KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. ***Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 61, n. 3, p. 189-196, 2003.
- KAREEM, S. O.; AKPAN, I.; ALEBIOWU, O. O. **Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste.** Malaysian Journal of Microbiology, v. 6, n. 2, p. 161-165, 2010.
- KAREEM, S. O.; RAHMAN, R. A. **Utilization of banana peels for citric acid production by *Aspergillus niger*.** Agriculture and Biology Journal of North America, v. 4, n. 4, p. 384-387, 2013.
- KARIM, A. A. et al. **Efficay of cocoa pod extract as antiwrinkle gel on human skin surface.** Journal of Cosmetic Dermatology, v. 15, n. 3, p. 283-295, 2016.
- KHAN, S. U. et al. **The dark chocolate against angiogenesis?** J. Cancer Prev. Curr. Res, v. 2, n. 5, p. 00050, 2015.
- KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. **Tannins: classification and definition.** Natural Product Reports, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.
- KLEIN, A. C. **Cromatografia iônica como método analítico alternativo para a análise quantitativa de analitos.** 2010. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.
- KRISHNA, C. **Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes.** Bioresource Technology, v. 69, n. 3, p. 231-239, 1999.
- KRISHNA, J. I. G.; CHANDRASEKARAN, M. Biochemical and nutritional aspects of food processing by-products. In: **Valorization of Food Processing By-Products.** CRC Press, p. 167, 2013.
- KRISHNA, C. **A research on cocoa pod husk activated carbon for textile industrial wastewater colour removal.** International Journal of Research in Engineering and Technology, v. 3, n. 3, 2014.
- KUBICEK, C. P.; PUNT, P.; VISSER, J. Production of organic acids by filamentous fungi. In: **Industrial Applications**, Cap. 10, 2 ed, Springer Berlin Heidelberg, p. 215-234. 2011.

- LANDETE, J. M. **Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health.** Food Research International, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.
- LARROSA, M. et al. **Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 5, p. 1611-1620, 2006.
- LEE, J. E.; TALCOTT, T. S. **Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 2, p. 361-366, 2004.
- LEGISA, M.; MATTEY, M. **Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 8, n. 5, p. 258-259, 1986.
- LEGISA, M.; MATTEY, M. **Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*.** Biotechnology Letters, v. 29, n. 2, p. 181-190, 2007.
- LEI, Z.; JERVIS, J.; HELM, R. F. **Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic Acid contents of wood and food products.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 3, p. 1165-1168, 2001.
- MACIEL, G. M. et al. **Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation using Statistical Experimental Designs.** Food Technology and Biotechnology, v. 46, n. 2, p. 183-189, 2008.
- MARIER, J. R.; BOULET, M. **Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method.** Journal of Dairy Science, v. 41, n. 12, p. 1683-1692, 1958.
- MARKETS; MARKETS. **Citric Acid Market worth USD 3.6 Billion USD by 2020.** Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/citric-acid.asp>>. Acesso em: 01 dez. 2016.
- MARTÍNEZ, R. et al. **Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products.** Food Research International, v. 49, n. 1, p. 39-45, 2012.
- MATTEY, M. **The production of organic acids.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 12, n. 1-2, p. 87-132, 1992.

- MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. **Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 13, p. 3660-3667, 2002.
- MAX, B. et al. **Biotechnological production of citric acid.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 4, p. 862-875, 2010.
- MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis.** 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MILSOM, P. E.; MEERS, J. L. Citric acid. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.), **Comprehensive biotechnology**, vol. 3, p.665–680. 1985.
- MININEL, F. J. et al. **Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 676902. 2014.
- MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. **Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: a preliminary study.** Food Chemistry, v. 107, n. 3, p. 1353-1356, 2008.
- MORAES, C. S. et al. **Métodos experimentais no estudo de proteínas.** Série em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.
- MUELLER-HARVEY, I. **Analysis of hydrolysable tannins.** Animal Feed Science and Technology, v. 91, n. 1, p. 3-20, 2001.
- MURUGAN, K.; AL-SOHAIBANI, S. Coffee, tea, and cocoa. In: **Valorization of Food Processing By-Products.** CRC Press. 2013.
- NASCIMENTO, M. F. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn.** 2013. 166 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes. Aracaju, 2013.
- National Renewable Energy Laboratory – NREL. **Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP).** Technical Report, 2008.

- NCUBE, T. et al. ***Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation.** *Industrial Crops and Products*, v. 37, n. 1, p. 118-123, 2012.
- NSOR-ATINDANA, J. et al. **Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells.** *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 11, n. 7, p. 574, 2012.
- ODDOYE, E. O. K. et al. **Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs.** *Scientific Research and Essays*, v. 5, n. 10, p. 1141-1144, 2010.
- ODDOYE, E. O. K.; AGYENTE-BADU, C. K.; AKOTO, E. G. Cocoa and its by-products: identification and utilization. In: **Chocolate in Health and Nutrition**, Humana Press, p. 23-37, 2013.
- OETTERER, M. et al. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Ed. Manole. 2006.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. **Ellagitannins as active constituents of medicinal plants.** *Planta Medica*, v. 55, n. 02, p. 117-122, 1989.
- PANDEY, A. et al. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation:** in bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A. et al. **Solid-state fermentation in biotechnology—Fundamentals and applications.** New Delhi: Asiatech. p. 100–221. 2001.
- PANSERA, M. R. et al. **Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.
- PAPAGIANNI, M. **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*:** biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnological Advances*, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007.
- PAPAGIANNI, M. Organic acids. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Comprehensive Biotechnology.** 2 ed, Elsevier, p. 109-119. 2011.

- PAPOUTSI, Z. et al. **Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β .** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 20, p. 7715-7720, 2005.
- PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA, M. R. **Biotecnologia de Alimentos.** São Paulo: v 12, Editora Atheneu, 2013.
- PENG, S.; SCALBERT, A.; MONTIES, B. **Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods.** Phytochemistry, v. 30, n. 3, p. 775-778, 1991.
- PINTADO, J. et al. **Joint effect of nitrogen and phosphorus concentrations on citric acid production by different strains of *Aspergillus niger* grown on an effluent.** Biotechnology Letters, v. 15, n. 11, p. 1157-1162, 1993.
- PINTO, M. S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico.** 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.
- 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. 2005a.
- PRADO, F. C. et al. **Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, n. 4, p. 547-555, 2005b.
- PREZA, A. M. et al. **Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cocoa* L.) seeds in relation with in vitro antioxidant activity.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 10, n. 1, p. 61, 2010.
- RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.
- RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

- RAMACHANDRA, Y. L. et al. **Production of Citric Acid in Basal Coffee Husk Medium by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation.** Advances in Biological Research v. 7, n. 6, p. 234-240, 2013.
- RAMACHANDRAN, S. et al. **Coconut oil cake—A potential raw material for the production of α -amylase.** Bioresource Technology, v. 93, n. 2, p. 169-174, 2004.
- RAO, P. R.; REDDY, M. K. **Production of Citric Acid by *Aspergillus Niger* Using Oat Bran as Substrate.** International Journal of Chemistry and Chemical Engineering. v. 3, n. 3, p. 181-190, 2013.
- REDDY, M. K. et al. **Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L.** Planta Medica, v. 53, n. 05, p. 461-467, 2007.
- ROBLEDO, A. et al. **Ellagic acid production by *Aspergillus Niger* in solid state fermentation of pomegranate residues.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 35, n. 6, p. 507-513, 2008.
- RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- RODRIGUES, C. et al. **Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp.** Applied Biochemistry Biotechnology, v. 158, n. 1, p. 72-87, 2009.
- RODRIGUES, C. et al. **Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus niger* sp. Mutants in SSF.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 29, n. 12, p. 2317-2324, 2013.
- ROUKAS, T. **Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation.** Enzyme and Microbial Technology, v. 24, n. 1, p. 54-59, 1999.
- SALINAS-MORENO, Y. et al. **Ácido elágico y perfil de antocianinas em frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) com diferente grado de maduración.** Revista Chapingo, Serie Horticultura, v. 15, n. 1, p. 97-101, 2009.
- SANDHU, S. K. et al. **Two-stage statistical medium optimization for augmented cellulase production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and**

application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 61, n. 51, p. 12653-12661, 2013.

SANTOS, C. O. **Aproveitamento industrial de "mel" de cacau (*Theobroma cacao* L) na produção de geléia sem adição de açúcar.** 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

SATO, K.; SUDO, S. Small scale solid state fermentations. In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. (Eds.), **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, 2 ed., p.61–79. 1999.

SAUER, M.; MATTANOVICH, D.; MARX, H. Microbial production of organic acids for use in food. In: **Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals.** Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, n 246, p. 288-320. 2013.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins.** Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. **The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 44, n. 4, p. 205-221, 2004.

SEERAM, N. et al. **Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry.** Separation and Purification Technology, v. 41, n. 1, p. 49-55, 2005.

SEVIOUR, R. J. et al. Production of foods and food components by microbial fermentation: an introduction. In: **Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals.** Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, n 246, p. 97-124, 2013.

SHARMA, M. et al. **Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 7, p. 3965-3969, 2009.

SMULLEN, J. et al. **The antibacterial activity of plants extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*.** Caries Research, v. 41, n. 5, p. 342-349, 2007.

SOCCOL, C. R. et al. Citric Acid. In: **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**, New York: The Haworth Press, p.617-628. 2004.

SOCCOL, C. R. et al. **New perspectives for citric acid production and application.** Food Technology & Biotechnology, v. 44, n. 2, 2006.

SOCCOL, C. R. et al. **Recent developments and innovations in solid state fermentation.** Biotechnology Research and Innovation, 2017. Enviado para submissão.

Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária – SBDA. **Pará deve se consolidar como maior produtor de cacau nos próximos anos.** Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.net/single-post/2017/01/03/adepar%81-par%81-deve-se-consolidar-como-maior-produtor-de-cacau-nos-pr%93ximos-anos>>. Acesso em: 06 maio 2017.

Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <<http://sna.agr.br/wp-content/uploads/cacau-640x475.jpg>>. Acesso em: 22 abr. 2017.

SODRÉ, G. A. et al. **Extrato da casca do fruto do cacau como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacau.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, n. 3, p. 881-887, 2012.

STONER, G.D. **Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 2, n. 4, p. 338-349, 1989.

SYAMSIRO, M. et al. **A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia.** Energy for Sustainable Development, v. 16, n. 1, p. 74-77, 2012.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. **Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

TORRADO, A. M. et al. **Citric Acid Production from Orange Peel Wastes by Solid-State Fermentation.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, n. 1, p. 394-409, 2011.

TU, C. **Study about stability of cacao husk pigment and its dyeing properties on cotton.** In: Key Engineering Materials. Trans Tech Publications, p. 133-138. 2016.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. **Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 107, n. 2, p. 650-655, 2010.

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia. Disponível em:

< http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau/estrutura/imagem/cacau_ini.jpg>. Acesso em: 22 abr. 2017.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. **Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger***. *Bioresource Technology* v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. **Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray and drum bioreactor**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, n. 1, p. 293-303, 2004.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Fermentação no Estado Sólido. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA, M. R. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: v 12, Editora Atheneu, 2013.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Production and application of citric acid. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Elsevier, Cap 25. 2016.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. **Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus***. *Food Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 189-210, 2002.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. **Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system**. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 3, p. 367-379, 2003.

VEKIARI, S. A. et al. **Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit**. *Food Chemistry*, v. 110, n. 4, p. 1007-1011, 2008.

VENTURA, J. et al. **Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata*) and tar bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production**. *Food Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 2, p. 213, 2008.

VIESTURS, U. F. et al. **Solid state fermentation of wheat straw with *Chaetomium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum***. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 11, p.359–369. 1981.

- VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. M. C.; PETKOWICZ, C. L. O. **Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): composition and hot-water-soluble pectins.** *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1173-1181, 2011.
- WEHMER, C. **Darstellung von Citronensaure mittels Gärung.** *Chem Zentr*, v. 2, p. 457-462, 1893.
- WILLINER, M. R.; PIROVANI, M. E.; GÜEMES, D. R. **Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages.** *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 83, n. 8, p. 842-845, 2003.
- WILSON, E.; HAGERMAN, A. **Ellagitannins in plant are hydrolyzed to release ellagic acid, which forms a colored product upon reaction with nitrous acid.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 16787, p. 1683, 1990.
- WOOD, A. W. et al. **Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenolics: exceptional activity of ellagic acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 79, n. 18, p. 5513-5517, 1982.
- YADAV, J. S. **SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, n. 5, p. 414-417, 1988.
- YADAV, V. et al. **Evaluation of solid phase extraction efficiency of functionalized biochar for polyphenols from *Punica granatum*.** *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v. 11, n. 2, p. 200-208, 2016.
- YADEGARY, M. et al. **Citric acid production from sugarcane bagasse through solid state fermentation method using *Aspergillus niger* mold and optimization of citric acid production by Taguchi Method.** *Jundishapur Journal Microbiology*, v. 6, n. 9, 2013.
- YAN, L. et al. **Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).** *Molecules*, v. 19, n. 11, p. 18923-18935, 2014.
- ZAFRILLA, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. **Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 3651-3655, 2001.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZORZETO, T., Q. **Caracterização física e química de substratos para plantas e sua avaliação no rendimento do morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.).** 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico. Campinas, 2011.