



**MAYSA COSTA ALVES**

**FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS  
PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E  
DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA  
DE ÁGUA RESIDUÁRIA DO CAFÉ (*Coffea  
arabica* L.)**

**LAVRAS – MG  
2019**

**MAYSA COSTA ALVES**

**FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO  
DE ÁCIDO CÍTRICO E DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA  
ORGÂNICA DE ÁGUA RESIDUÁRIA DO CAFÉ (COFFEA  
ARABICA L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, área de concentração em Café, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

Coorientadora:

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

**LAVRAS – MG**

**2019**

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

Alves, Maysa Costa.

Fungos filamentosos utilizados para produção de ácido cítrico e degradação de matéria orgânica de água residuária do café (*Coffea arabica L.*) / Maysa Costa Alves. - 2019.

149 p. : il.

Orientador(a): Carlos José Pimenta.

Coorientador(a): Sara Maria Chalfoun de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Fungos filamentosos. 2. Água residuária do café.  
3. Fermentação. I. Pimenta, Carlos José. II. Souza, Sara Maria Chalfoun de. III. Título.

**MAYSA COSTA ALVES**

**FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO  
DE ÁCIDO CÍTRICO E DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA  
ORGÂNICA DE ÁGUA RESIDUÁRIA DO CAFÉ (COFFEA  
ARABICA L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 16 de Agosto de 2019.

Dr<sup>a</sup>. Angélica Cristina de souza - UFLA

Dr<sup>a</sup>. Caroline Lima angélico - EPAMIG

Dr. Elifas Nunes de Alcântara - EPAMIG

Dr<sup>a</sup>. Fabiana Reinis Franca Passamani - UFLA



Prof. Dr. Carlos José Pimenta  
Orientador

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza  
Coorientadora:

**LAVRAS – MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por permitir a conclusão de mais uma etapa em minha vida. Por sempre me dar forças para realizar e correr atrás dos meus sonhos.

À minha amada família que sempre acreditaram que eu chegaria até aqui, por toda paciência e amor incondicional! Nunca serei capaz de agradecer suficiente tudo que fazem por mim.

À Universidade Federal de Lavras, e ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

À EPAMIG Três Pontas pela concessão do material de estudo.

Ao meu orientador Carlos José Pimenta pelo apoio, ensinamentos e paciência nesse período.

À pesquisadora Sara Maria Chalfoun por toda receptividade, auxílios e ensinamentos valiosos de sempre.

À todos do laboratório de Micologia de Alimentos por todos os ensinamentos e amizade.

À parceria dos meus amigos Giovanni Aleixo e Déborah por terem me auxiliado de uma forma grandiosa e valiosa.

À técnica de laboratório, Vicentina por todo o auxílio

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Muito obrigada!

## RESUMO GERAL

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica no agronegócio brasileiro. Durante o beneficiamento dos grãos, são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. O Processamento do café por via úmida gera grandes volumes de águas residuárias ricas em materiais orgânicos e inorgânicos com alto poder poluente, além de uma grande quantidade de sólidos sedimentáveis, açúcares, compostos fenólicos, elevada demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de ácido cítrico por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em fermentação submersa utilizando a água residuária do processamento úmido do café como meio fermentativo a fim de agregar valor à esse resíduo e propor uma alternativa para a redução dos níveis de matéria orgânica presentes. Foram avaliados vinte isolados produtores de acidez em meio contendo a água residuária do café e em meio controle. Durante a fermentação, foram analisados os teores de açúcares tatais, pH, peso micelial e produção de ácido cítrico. Como resultado, verificou-se que a produção máxima de ácido cítrico no meio contendo água residuária do café foi de  $5,250 \text{ mgL}^{-1}$  e no meio controle foi de  $20,102 \text{ mgL}^{-1}$  após 196 h de fermentação para a espécie *Aspergillus niger*. Portanto, é possível a utilização desses resíduos agroindustriais para a produção de ácido cítrico. Do gênero *Penicillium*, a espécie mais produtora de ácido cítrico foi *Penicillium citrinum* que apresentou teores de  $3,086 \text{ mgL}^{-1}$  no meio com água residuária e de  $12,584 \text{ mgL}^{-1}$  no meio controle, para o mesmo tempo de fermentação. Em relação à degradação da matéria orgânica presente na água residuária, a espécie *Aspergillus niger* (A. niger 00194) apresentou a maior degradação. Os valores de DBO e DQO encontrados após a fermentação foram de  $8655,00 \text{ mgL}^{-1}$  e  $9156,30 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. Sendo assim, uma etapa preliminar no tratamento da água residuária do café, seria a utilização desses isolados para auxiliar na degradação da matéria orgânica presente.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Água residuária do café. Fermentação

## ABSTRACT

Coffee is one of the most economically important agricultural products in Brazilian agribusiness. During grain processing, waste is generated, which is disposed of in inappropriate ways in the environment. Wet coffee processing generates large volumes of wastewater rich in organic and inorganic materials with high pollutant power, as well as a large amount of sedimentable solids, sugars, phenolic compounds, high chemical oxygen demand (COD) and biochemical demand oxygen (BOD). The objective of this work was to evaluate the production of citric acid by *Aspergillus* and *Penicillium* fungi in submerged fermentation using the wet processing wastewater as a fermentative medium in order to add value to this residue and to propose an alternative for this residue. reduction of the levels of organic matter present. Twenty acidity producing isolates were evaluated in medium containing coffee wastewater and in control medium. During fermentation, the sugar content, pH, mycelial weight and citric acid production were analyzed. As a result, it was found that the maximum yield of citric acid in coffee wastewater containing medium was 5,250 mgL<sup>-1</sup> and in the control medium it was 20,102 mgL<sup>-1</sup> after 196 h of fermentation for specie *Aspergillus niger* (A. niger 00194). Therefore, it is possible to use these agroindustrial residues for the production of citric acid. Of the genus *Penicillium*, the most citric acid producing species was *Penicillium citrinum*, which presented levels of 3,086 mgL<sup>-1</sup> in the wastewater medium and 12,584 mgL<sup>-1</sup> in the control medium, for the same fermentation time. Regarding the degradation of the organic matter present in the wastewater, *Aspergillus niger* (A. niger 00194) showed the highest degradation. BOD and COD values after fermentation were 8655,00 mgL<sup>-1</sup> and 9156,30 mgL<sup>-1</sup>, respectively. Thus, a preliminary step in the treatment of coffee wastewater would be the use of these isolates to assist in the degradation of the organic matter present.

Keywords: Filamentous fungi. Coffee wastewater. Fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 Componentes do fruto do cafeeiro.....	23
Figura 2 Sequências de operações dos tipos de processamento pós-colheita do café.....	30
Figura 3 Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos.....	37
Figura 4 Representação da estrutura química do ácido cítrico.....	41
Figura 5 Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs.....	50
Figura 6 Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs.....	51
Figura 7 Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível.....	53

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

Figura 1 Produção de ácido em meio Foster & Davis .....	92
Figura 2 Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de ocratoxina.....	97
Figura 3 Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de Citrinina.....	97
Figura 4 Mapa bidimensional de agrupamento.....	112
Figura 5 Mapas de componentes para cada análise realizada e a matriz U.....	113

### TERCEIRA PARTE - ARTIGO 2

Figura 1 Formação do halo de degradação de pectina para os isolados estudados.....	134
--	-----



## **LISTA DE TABELAS**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

Tabela 1 Microorganismos produtores de ácido cítrico.....43

### **SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1**

Tabela 1 Caracterização da água residuária do processamento do café.....88

Tabela 2 Valores dos diâmetros dos halos de produção de ácido, das colônias de crescimento dos isolados e dos índices de acidez.....95

Tabela 3 Correlação de Pearson envolvendo os dois meios utilizados e os tempos de fermentação.....107

### **TERCEIRA PARTE - ARTIGO 2**

Tabela 1 Caracterização da água residuária do processamento do café.....134

Tabela 2 Valores dos diâmetros dos halos de degradação de pectina (H.D.) das colônias dos isolados (H.C.) e dos índices enzimáticos (I.E.).....139

## LISTA DE GRÁFICOS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Gráfico 1 Estimativa da produção total de café (arábica e conilon) .....22

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

Gráfico 1 Ácido cítrico (gL-1) para o meio com água residuária do café ..... 98

Gráfico 2 Ácido cítrico (gL-1) para o meio controle .....99

Gráfico 3 pH para o meio contendo água residuária do café ..... 100

Gráfico 4 pH para o meio controle..... 101

Gráfico 5 Peso micelial (gL-1) para o meio com água residuária do café..... 102

Gráfico 6 Peso micelial (gL-1) para o meio controle..... 103

Gráfico 7 Açúcar total (gL-1) para o meio com água residuária do café..... 104

Gráfico 8 Açúcar total (gL-1) para o meio controle ..... 105

### TERCEIRA PARTE - ARTIGO 2

Gráfico 1 Teores de Pectina total, DBO e DQO (mgL-1)..... 136

## LISTA DE ABREVIATURAS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
%	Por cento
gL <sup>-1</sup>	Gramas por litro
mgL <sup>-1</sup>	Miligramas por litro
mL.L <sup>-1</sup>	Mililitro por Litro
g	Gramas
pH	Potencial Hidrogeniônico
cm	Centímetro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amônio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fostato monopotássico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotássico
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sódio
KCl	Cloreto de potássio
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de ferro heptahidratado
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinco heptahidratado
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado
P	Fóforo
K	Potássio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
S	Enxofre
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Zn	Zinco
Mn	Manganês
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
SD	Sólidos Dissolvidos
SS	Sólidos Suspensos
APHA	American Public Health Association
AOAC	Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists
A. niger	Aspergillus niger
B.O.D.	Biochemical oxygen demand
C.O.D.	Chemical oxygen demand
RPM	Rotação Por Minuto

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>CAFÉ</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Considerações gerais</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Componentes do fruto do cafeeiro</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Processamento pós-colheita do café</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Água residuária do processamento úmido do café</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspectos ambientais</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3</b>	<b>COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4</b>	<b>ÁCIDO CÍTRICO</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Evolução Histórica</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Característica e Aplicações</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5</b>	<b>PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO</b> .....	<b>43</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Microorganismos Produtores de Ácido Cítrico</b> .....	<b>43</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Matéria-prima e Substrato</b> .....	<b>45</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Formas de condução do processo</b> .....	<b>46</b>
<b>2.6</b>	<b>Bioquímica de produção de ácido cítrico</b> .....	<b>49</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Citrato sintase</b> .....	<b>52</b>
<b>2.7</b>	<b>Fermentação Submersa</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>

## SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>79</b>
<b>2.1</b>	<b>Água residuária do processamento úmido do café</b>	<b>79</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização da água residuária do café</b>	<b>79</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Demanda bioquímica de oxigênio (DBO5 20°C)</b>	<b>79</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Demanda química de oxigênio (DQO)</b>	<b>80</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SV) e sólidos dissolvidos</b>	<b>80</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Sólidos suspensos (SS)</b>	<b>80</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Compostos fenólicos (FenolT)</b>	<b>80</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Nitrogênio</b>	<b>80</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) e Micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn)</b>	<b>80</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Acidez total</b>	<b>80</b>
<b>2.2.9</b>	<b>Oxigênio Dissolvido</b>	<b>81</b>
<b>2.2.10</b>	<b>pH</b>	<b>81</b>
<b>2.2.11</b>	<b>Condutividade elétrica (CE)</b>	<b>81</b>
<b>2.2.12</b>	<b>Umidade</b>	<b>81</b>
<b>2.2.13</b>	<b>Proteína</b>	<b>81</b>
<b>2.2.14</b>	<b>Extrato etéreo</b>	<b>82</b>
<b>2.2.15</b>	<b>Cinzas</b>	<b>82</b>
<b>2.2.16</b>	<b>Pectina total e pectina solúvel</b>	<b>82</b>
<b>2.2.17</b>	<b>Açúcares Totais</b>	<b>82</b>
<b>2.3</b>	<b>Microorganismos</b>	<b>82</b>
<b>2.4</b>	<b>Seleção dos isolados produtores de ácido cítrico</b>	<b>83</b>

2.4.1	Formação do halo de produção de ácido em meio Foster.....	83
2.5	Detecção da produção de ocratoxina A (OTA) e Citrinina pelo método de Plug Agar.....	83
2.6	Composição do meio fermentativo .....	84
2.6.1	Meio fermentativo com água residuária do café .....	84
2.6.2	Meio controle.....	85
2.7	Descrição do experimento.....	85
2.8	Métodos analíticos.....	85
2.8.1	Quantificação do ácido cítrico .....	85
2.8.2	2.8.2 pH.....	86
2.8.3	Açúcar total.....	86
2.8.4	Peso micelial.....	86
2.9	Análise estatística .....	86
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
3.1	Caracterização da água residuária do café .....	92
3.2	Seleção dos isolados produtores de ácido cítrico .....	92
3.3	Potencial toxigênico dos isolados.....	96
3.4	Processo fermentativo.....	98
3.4.1	Ácido cítrico.....	98
3.4.2	pH.....	100
3.4.3	Peso micelial.....	102
3.4.4	Açúcar total.....	104
4	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>

## TERCEIRA PARTE - ARTIGO 2

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>126</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>127</b>
<b>2.1</b>	<b>Água residuária do processamento úmido do café</b>	<b>127</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização da água residuária do café</b>	<b>128</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>20°C)</b>	<b>128</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Demanda química de oxigênio (DQO)</b>	<b>128</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SV) e sólidos dissolvidos</b>	<b>128</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Sólidos suspensos (SS)</b>	<b>128</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Compostos fenólicos (FenolT)</b>	<b>129</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Nitrogênio</b>	<b>129</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) e Micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn)</b>	<b>129</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Acidez total</b>	<b>129</b>
<b>2.2.9</b>	<b>Oxigênio Dissolvido</b>	<b>129</b>
<b>2.2.10</b>	<b>pH</b>	<b>129</b>
<b>2.2.11</b>	<b>Condutividade elétrica (CE)</b>	<b>130</b>
<b>2.2.12</b>	<b>Umidade</b>	<b>130</b>
<b>2.2.13</b>	<b>Proteína</b>	<b>130</b>
<b>2.2.14</b>	<b>Extrato etéreo</b>	<b>130</b>
<b>2.2.15</b>	<b>Cinzas</b>	<b>130</b>
<b>2.2.16</b>	<b>Pectina total e solúvel</b>	<b>130</b>
<b>2.2.17</b>	<b>Açúcares Totais</b>	<b>131</b>
<b>2.3</b>	<b>Microorganismos</b>	<b>131</b>
<b>2.4</b>	<b>Seleção dos isolados quanto à capacidade de produzir pectinases</b>	<b>131</b>
<b>2.5</b>	<b>Composição do meio fermentativo</b>	<b>132</b>

<b>2.5.1</b>	<b>Meio fermentativo com água residuária do café.....</b>	<b>132</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Meio controle .....</b>	<b>132</b>
<b>2.6</b>	<b>Descrição do experimento.....</b>	<b>132</b>
<b>2.7</b>	<b>Determinação da matéria orgânica após fermentação .....</b>	<b>132</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub><sup>20°C</sup>).....</b>	<b>133</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Demanda química de oxigênio (DQO).....</b>	<b>133</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Pectina total .....</b>	<b>133</b>
<b>2.8</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>133</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>134</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterização da água residuária do café .....</b>	<b>134</b>
<b>3.2</b>	<b>Seleção dos isolados quanto à degradação de pectina .....</b>	<b>136</b>
<b>3.3</b>	<b>Processo fermentativo.....</b>	<b>140</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>144</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>145</b>



## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

O café é uma das principais culturas de plantação em crescimento em todo o mundo e é uma das bebidas populares mais consumidas (BISHT; SISODIA, 2010; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). O Brasil é o maior produtor e exportador de café, sendo que a maior produção encontra-se no estado de Minas Gerais (BRASIL, 2013).

O café é processado por via úmida ou por via seca. No método de processamento via seca, o café é processado na sua forma intacta, produzindo frutos secos, como café em coco ou café natural (PIMENTA 2003). O método de processamento via úmida apesar de reduzir o custo de secagem dos grãos e proporcionar uma bebida de maior qualidade, gera grandes volumes de águas residuárias ricas em materiais orgânicos e inorgânicos com alto poder poluente, além de uma grande quantidade de sólidos sedimentáveis, açúcares, compostos fenólicos, elevada demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (SAENGER et al., 2001).

Algumas alternativas são propostas para a destinação e/ou diminuição da água residuária do processamento do café, como a implantação de lagoas anaeróbicas, filtros anaeróbicos, reatores, entre outros. Porém, como cada alternativa apresenta diversas limitações ou desvantagens, vários aspectos devem ser levados em consideração para a escolha do melhor método (MELO, 2009).

Alguns métodos são ineficazes na remoção de poluentes específicos em águas residuárias tais como os compostos fenólicos, e por esta razão, mais atenção tem sido dada ao desenvolvimento de alternativas e/ou tecnologias complementares.

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada na produção de ácido cítrico por fermentação, principalmente os subprodutos e resíduos da agroindústria. No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL e VANDENBERGHE, 2000).

O uso de resíduos agroindustriais como suporte na fermentação é economicamente importante do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causa sobre a natureza, valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais. Visando maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado algumas alternativas de utilização dos subprodutos da agroindústria, seleção de microrganismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos para a fermentação cítrica (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL e VANDENBERGHE, 2000).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a viabilidade da utilização da água residuária do processamento úmido do café como substrato para a produção de ácido cítrico por fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 CAFÉ**

#### **Considerações gerais**

A Etiópia é o país onde o café se originou e, posteriormente, ele teria migrado para Arábia, em data não estabelecida. Admite-se, contudo, que já no século XV os árabes tomavam café, cabendo a eles a exclusividade da lavoura até o século XVII. Assim, considerando-se esta a primeira região em que o uso do café se difundiu em larga escala, pode-se dizer que a denominação de uma de suas principais espécies comerciais – *Coffea arabica* - é bastante apropriada (FERRÃO, 2004).

A entrada das primeiras sementes de café plantadas no Brasil deu-se em 1727, por intermédio de Francisco de Melo Palheta, sargento-mor, oficial de linha do Exército Português, que na época veio ao Brasil a fim de resolver questões de fronteiras (FERRÃO, 2004). O café é uma das principais culturas de plantação em crescimento em todo o mundo, e é uma das bebidas populares mais consumidas (BISHT; SISODIA, 2010; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010).

Somente nos Estados Unidos, existem 108 milhões de consumidores de café, e esses números representam apenas uma fração da população global, um grande número de pessoas que incorporam o café como uma parte importante em suas práticas culturais (BISHT; SISODIA, 2010). Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente, sendo para alguns deles o principal produto de exportação agrícola (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

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

O café, no Brasil, destaca-se econômica e socialmente desde a chegada das primeiras mudas e diante de sua rápida adaptação ao solo e clima, o produto adquiriu importância no mercado, transformando-se em um dos principais itens de exportação, desde o Império até os dias atuais (BRASIL, 2019). É um dos produtos agrícolas de grande importância para o estado de Minas Gerais e para o país, e é sem dúvida de notória importância e expressividade para sua economia no que diz respeito ao mercado de trabalho e à geração de empregos diretos e indiretos, geração de impostos e fixação de mão de obra no meio rural, proporcionando melhoria nas condições financeiras regionais (RIGUEIRA et al., 2007).

Devido à diversidade de regiões ocupadas pela cultura do café, o país produz tipos variados do produto, fato que possibilita atender às diferentes demandas mundiais, referentes ao paladar e até aos preços (BRASIL, 2019). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo responsável por 35% da produção mundial, e segundo maior consumidor do produto, apresentando, atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares.

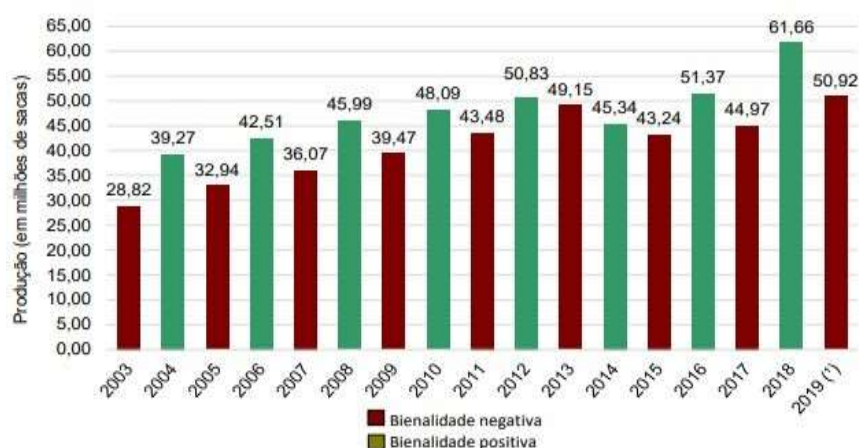
São cerca de 287 mil produtores que, fazendo parte de associações e cooperativas, distribuem-se em 15 estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Com dimensões continentais, o país possui uma variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes que permitem a produção de uma ampla gama de tipos e qualidades de cafés (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010).

A produção de café para a safra de 2018 foi de 61,7 milhões de sacas beneficiadas, um crescimento de 37% em relação ao ano anterior. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), foi a maior colheita registrada na série histórica do grão, superando em cerca de 10 milhões de sacas o melhor desempenho registrado em 2016. A quantidade total engloba o café arábica e o conilon. Com relação ao arábica, a produção foi de 47,5 milhões de sacas, um acréscimo de 38,6%. Já a quantidade de conilon chegou a 14,2 milhões de sacas, com aumento de 32,2%. Os números confirmam o Brasil na posição de maior produtor de café no mundo.

O estado de Minas Gerais registra uma colheita de 32,97 milhões de sacas de arábica e 390,3 mil sacas de conilon. No estado que possui os maiores números do país, destaca-se a região do cerrado mineiro que apresentou uma produção 95% superior ao ano passado, devido ao aumento de área e produtividade, bem como o norte de Minas, que mesmo com queda na área de plantio, a colheita é 22,7% superior à de 2017. Já o Espírito Santo registra aumento de 52% na produção do conilon, chegando a uma colheita de aproximadamente 9 milhões de sacas. O estado capixaba ainda registra uma produção de 4,7 milhões de sacas de arábica, mantendo-se como o segundo

maior produtor da cultura. A estimativa para a produção de café em 2019 (espécies arábica e conilon) indica que o país deverá colher cerca de 50,92 milhões de sacas de café beneficiado como ilustrada no Gráfico 1.

**Gráfico 1** Estimativa da produção total de café (arábica e conilon)



Fonte: CONAB (2019)

O resultado representa diminuição de 17,4%, quando comparado à produção obtida em 2018. Estima-se que são geradas aproximadamente 225 milhões de toneladas de resíduos líquidos (25 toneladas de águas residuárias por tonelada de grãos de café) e 9,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos, incluindo casca, polpa, mucilagem, pergaminho, película prateada e borra de café (1,1 t de resíduos sólidos por tonelada de grãos de café) (MUSSATTO et al., 2011).

### 2.1.2 Componentes do fruto do cafeeiro

O fruto do café (Figura 1) é ovóide e é formado por:

a) **Epicarpo**: formado pela casca do grão de café. A casca com o amadurecimento passa de verde a vermelha ou amarela.

O epicarpo é constituído principalmente por material lignocelulósico;

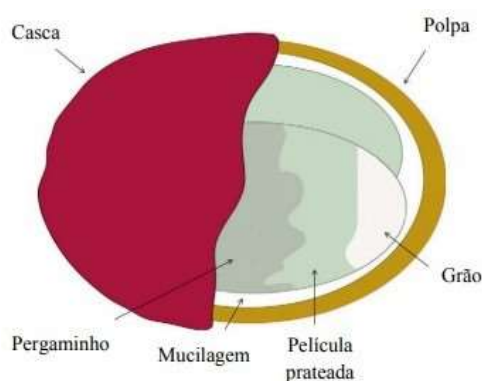
**b) Mesocarpo ou Mucilagem:** É uma camada de espessura de 0,5 a 2 mm; é um sistema coloidal líquido, um hidrogel. Quimicamente constituído por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos;

**c) Endocarpo:** conhecido como pergaminho. É uma membrana cartilaginosa que recobre a semente ou grão de café. Constituído essencialmente de material celulósico;

**d) Espermoderma:** conhecido como película prateada, que rodeia o endosperma, e é eliminado quando o grão entra no processo de torra;

**e) Endosperma:** é o grão de café, parte utilizada na preparação da bebida de café. A dimensão dos grãos varia no comprimento de 7 a 15 mm, na largura de 6 a 8 mm e no peso de 0,1 e 0,2 g.

**Figura 1** Componentes do fruto do cafeeiro



**Fonte:** (MUSSATTO et al., 2011).

No processamento do café, existem principalmente dois métodos, um por via seca e outro por via úmida.

Na via seca, os frutos frescos colhidos são espalhados

uniformemente em um terreiro limpo (de terra ou concreto) até uma espessura de 8 cm, onde são fermentados e secos com revolvimento constante. O café cereja fica totalmente seco em 12-15 dias com boas condições meteorológicas, dando origem ao café natural e gerando o subproduto conhecido como casca (MURTHY; NAIDU, 2012). Esta prática é preferida na Etiópia, Haiti, Indonésia e Brasil (MUSSATTO et al., 2011).

Na via úmida, o café cereja colhido é mecanicamente descascado, despulpado, desmucilado e transferido para tanques de fermentação, onde é digerida a camada de mucilagem que fica aderida no grão. Este processo pode durar de 24 a 72 horas a 30 - 35 °C. Finalmente os grãos com pergaminho são secos ao sol até uma umidade de 11 - 12% para continuar com o processamento. Este processo dá origem ao café descascado, despulpado e desmucilado, gerando como subproduto a polpa de café. A via úmida é utilizada na Colômbia, países de América Central, Etiópia, Havaí e Índia (MURTHY; NAIDU, 2012).

Com base na literatura, observa-se uma grande diversidade sobre a composição química dos componentes do fruto do cafeeiro. Brum (2007) avaliou os teores dos constituintes da polpa em g/100 g de matéria seca, sendo: 25,90 de celulose; 16,48 de lignina insolúvel; 1,07 de lignina solúvel; 26,60 de hemiceluloses; 9,65 de cinzas; 3,90 de tanino condensado; 1,85 de nitrogênio; 0,16 de fósforo; 3,65 de potássio; 0,30 de cálcio; 0,07 de magnésio; 0,18 de enxofre. Para o pergaminho os níveis em g/100 de matéria seca foram: 41,20 de celulose; 20,49 de lignina insolúvel; 1,50 de lignina solúvel; 34,77 de hemiceluloses; 1,37 de cinza; 0,70 de tanino condensado; 0,59 de nitrogênio; 0,02 de fósforo; 0,38 de potássio; 0,14 de cálcio; 0,03 de magnésio; 0,06 de enxofre.

De acordo com a revisão de Murthy e Naidu (2012), os



componentes orgânicos presentes na polpa de café (em peso seco) incluem celulose (63%), lignina (17%), proteínas (11,5%), hemiceluloses (2,3%),

taninos (1,80 a 8,56%), substâncias pécticas (6,5%), açúcares redutores

(12,4%), açúcares não redutores (2,0%), cafeína (1,3%), ácido clorogênico (2,6%) e ácido cafeico (1,6%). Informações sobre os taninos na polpa de café são algumas vezes contraditórias e os dados que estão disponíveis são difíceis de interpretar, uma vez que diferentes métodos analíticos têm sido utilizados.

Dependendo do tipo de cultivar, o conteúdo de taninos também pode diferir (PANDEY et al., 2000). Parra et al. (2008) determinaram a composição química da casca dos frutos do cafeeiro melosa em g/100 de matéria seca sendo: 9,69 de proteína bruta; 5,95 de matéria mineral; 85,80 de matéria orgânica; 39,37 de fibra detergente neutro; 31,36 de fibra detergente ácido; 1,34 de extrato etéreo; 7,39 de hemicelulose; 8,69 de lignina; 0,30 de cálcio; 0,13 de fósforo total; 0,66 de cafeína; 0,92 de taninos. Pode haver diferenças nos teores dos constituintes da polpa e das cascas de café, dependendo da eficiência e do modo de processamento, da variedade de culturas, das condições de cultivo, tal como, tipo de solo, etc. (PANDEY et al., 2000).

A mucilagem é composta de 84,2% de água, 8,9% de proteína, 4,1% de açúcar, 0,9% de substâncias pécticas e 0,7% de cinzas (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). O pergaminho é composto por 40 a 49% de  $\alpha$ -celulose, 25 a 32% de hemicelulose, 33 a 35% de lignina e 0,5 a 1,0% de cinzas (BEKALO; REINHARDT, 2010).

A película prateada pode ser facilmente encontrada como

um subproduto do processamento dos frutos do cafeeiro em plantas de torrefação do café, e é atualmente utilizada como combustível ou recomendados como ingrediente funcional para compostagem devido à baixa quantidade de gorduras e açúcares redutores, alto teor de fibras dietéticas solúveis (60%) e marcada atividade antioxidante (BORRELLI et al., 2004).

A caracterização de compostos fenólicos na polpa de café vem sendo estudada e vários tipos de fenóis foram encontrados, como os de baixo peso molecular e taninos, os quais são responsáveis por efeitos anti- nutritivos ou tóxicos quando esta polpa foi testada como ração animal (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991; RAMIREZ-MARTINEZ, 1988).

É conhecido que o processamento pós-colheita tem efeitos pronunciados sobre a composição química de sementes de café, especialmente em componentes solúveis em água tais como açúcares, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (SMITH, 1985). Enquanto taninos condensados são os principais compostos fenólicos encontrados na polpa de café, nas sementes, os ácidos clorogênicos estão presentes como uma grande família de compostos fenólicos que representam 6 a 12% dos constituintes do café em massa (FARAH et al., 2006) e são conhecidos por serem responsáveis pela adstringência e pigmentação do café (FARAH; DONANGELO, 2006).

Esses ácidos são compostos fenólicos formados pela esterificação de determinados ácidos hidroxicinâmicos, tais como, ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico com o ácido quínico.

Os principais subgrupos de isômeros de ácidos clorogênicos são os ácidos cafeoilquínicos, feruloilquínicos, dicafeoilquínicos e, em menor quantidade, p-cumaroilquínicos (CLIFFORD, 1999; TRUGO; MACRAE, 1984). Outros compostos fenólicos, tais como taninos, lignanas e antocianinas também

estão presentes nas sementes de café, embora em pequenas quantidades (FARAH; DONAGELO, 2006).

Duarte, Pereira e Farah (2010) compararam a composição de alguns tipos de ácidos clorogênicos em sementes de café verdes processados por via úmida e pelo método semi-seco. Os autores observaram que apesar do perfil de distribuição das classes de ácidos clorogênicos em amostras de cafés processados pelo método semi-seco tenha sido semelhante aos processados por via úmida, em média, os processados por via úmida apresentam teores totais de ácidos clorogênicos significativamente mais altos do que os processados pelo método semi-seco. Esta diferença foi observada em todas as classes de ácidos clorogênicos, com exceção do ácido dicafeoilquínico.

O conteúdo total de ácido clorogênico em grãos de café verde pode variar de acordo com a genética (espécie e cultivar), grau de maturação e, menos importante, as práticas agrícolas, clima e solo. Além disso, esses níveis também podem variar de acordo com a metodologia de análise empregada (FARAH; DONAGELO, 2006). Não só o conteúdo total de ácido clorogênico, mas a sua composição também pode variar consideravelmente durante a maturação dos frutos. Considerando as variações entre espécies e cultivares, um aumento no teor total de ácido clorogênico é observado com a maturação (CLIFFORD; KASI, 1987).

Em um certo estágio antes da completa maturação, o conteúdo de ácido clorogênico começa a cair devido a oxidação.

Deste ponto em diante, uma associação inversa entre os níveis de ácido clorogênico e a maturação dos frutos de café é observado (FARAH; DONAGELO, 2006). O mais alto teor de ácido clorogênico no café *Canephora* comparado com o café *Arabica* tem sido amplamente relatado (CLIFFORD;

RAMIREZMARTINEZ, 1991; FARAH; DONANGELO, 2006).

Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns em café são os ácidos cafeico, seguido do ácido ferúlico e do p-cumárico (CLIFFORD et al., 2003). Ramirez-Martinez (1988), mediante a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, estudou a caracterização de compostos fenólicos na polpa de café e o ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) foi o principal constituinte (42,2%), seguido da epicatequina (21,6%), catequina (2,2%), rutina (2,1%), ácido protocatecuico (1,6%) e ácido ferúlico (1,0%). O autor observou que estes teores não devem ser considerados como valores absolutos, já que o conteúdo dos compostos na polpa de café pode variar de tempos em tempos.

Ramirez-Coronel et al. (2004) quantificaram e caracterizaram os compostos fenólicos presentes na polpa fresca de café, sendo que os que apresentaram os maiores teores em g.kg-1 de matéria seca foram: ácido cafeoilquínico (11,8), ácido p-cumaroilquínico (0,6) e derivados dos ácidos cafeoilquínicos (2,4) respectivamente, seguido dos flavonoides com 0,6 e antocianidinas com 0,4. Para os flavan-3-óis os níveis (g.kg-1 de matéria seca) foram de 0,2 para os monômeros e 20,1 para as protocianidinas. A presença de cafeína, taninos e outros fenólicos na polpa do fruto do cafeeiro, embora em pequenas quantidades, tem causado sérios problemas de poluição ambiental, uma vez que estes compostos são altamente tóxicos (PANDEY et al., 2000).

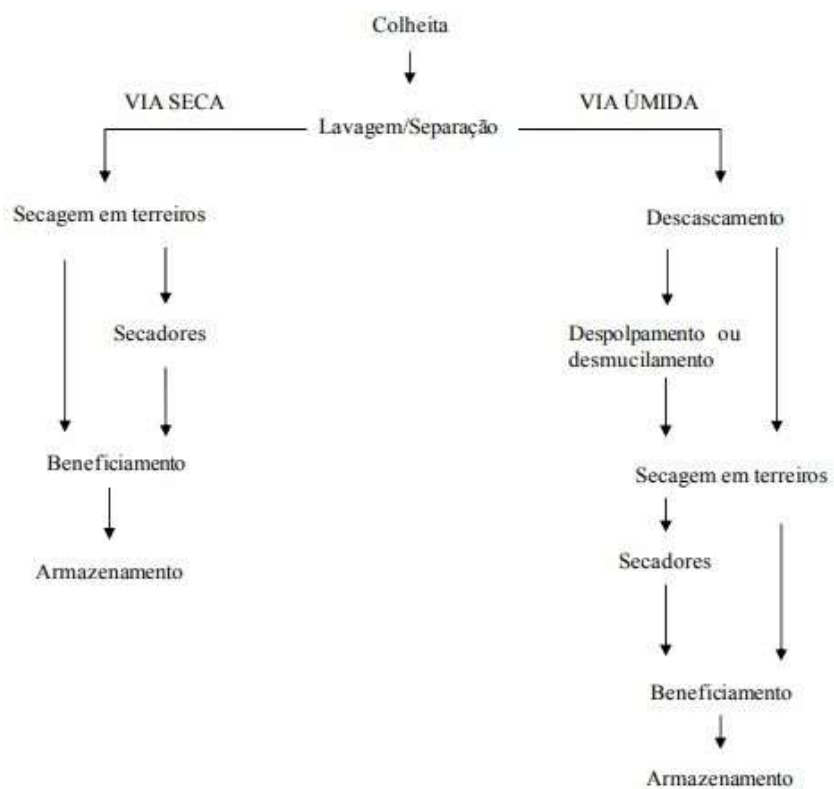
### **2.1.3 Processamento pós-colheita do café**

O método escolhido para preparar o grão de café nos países produtores depende das espécies cultivadas, das condições e dos recursos de cada região (GONZALEZ-RIOS et

al., 2007). O processamento dos frutos do cafeeiro pode ser de duas formas: processamento por via seca ou via úmida é mostrado no esquema da Figura 2.

No processamento via seca os frutos são secos na íntegra dando origem ao café natural (também chamado de café coco ou de terreiro). Após o recebimento do café colhido, este passa por um processo de limpeza para a separação de impurezas, como folhas, paus, pedras, terra e selecionado nos seus diversos estágios de maturação (verde, cereja, coco e passa). Esta limpeza, geralmente, é feita com a realização da lavagem do café, utilizando-se lavadores de alvenaria ou metálicos pré-fabricados gerando uma pequena parte de resíduos. Posteriormente, o café passa pela etapa de secagem em terreiros ou secadores mecânicos.

**Figura 2** Sequências de operações dos tipos de processamento pós-colheita do café.



Fonte: Pimenta (2003).

O processamento por via úmida consiste na utilização de água no processo de lavagem, separação e retirada da casca (exocarpo) e da mucilagem (mesocarpo), dando origem aos cafés descascados, despulpados e desmucilados (PRADO; CAMPOS, 2008). Além de fazer uso do lavador/separador, usam-se também descascador, peneiras de separação, tanques de fermentação e/ou desmucilador (PIMENTA, 2003). A primeira etapa do processo de lavagem visa à eliminação de impurezas contidas no café colhido assim como no processamento via seca. A etapa seguinte consiste na separação dos cafés verdes e cereja do café seco ou “bóia”, nome dado por se tratar de um processo em que envolve a densidade do café, logo o café seco acaba boiando na água enquanto os cafés verdes e os cereja afundam. Com isso já se ganha em qualidade, visto que cafés de diferentes teores de água serão secos separadamente (MATIELLO et al., 2005).

Quando se faz o processo de descascamento, há uma separação dos frutos cerejas (frutos que serão descascados) e dos frutos verdes (MATIELLO et al., 2005). O descascador utilizado no processamento via úmida são máquinas que pressionam os frutos (cereja e verde) contra um cilindro de chapa metálica, contendo “mamilos”, e um encosto de borracha, fazendo com que as cascas e os grãos dos frutos cerejas saiam por um lado, enquanto os frutos verdes que não rompem suas cascas, por tê-las bem aderidas, acabam saindo por outro (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997; MATIELLO, 1999; MATIELLO et al., 2005).

A seguir, os frutos cerejas descascados e as cascas passam por outro cilindro coberto por uma lâmina de cobre, com mamilos, que aprisionam os grãos e os pressionam em um movimento rotativo contra uma barra de borracha, separando assim os grãos ainda com um pouco de mucilagem de um lado, e a polpa com casca e parte da mucilagem do outro (MATIELLO et al.,

2005). O despulpamento é o processo de retirada da mucilagem através de um tanque de fermentação, onde o café após ser descascado, permanece neste tanque de 12 a 36 horas juntamente com a água.

A mucilagem é rica em açúcares que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos nos grãos, podendo depreciar sua qualidade (MOREIRA, 1999). Nesta etapa, a mucilagem é hidrolisada por enzimas dos tecidos do café e por microrganismos encontrados nas cascas dos frutos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). O desmucilamento também é um processo de retirada da mucilagem, porém ocorre de forma mecânica, sendo que logo após o descascamento o café passa pelo desmucilador, que retira a mucilagem por atrito entre os grãos e a parede do implemento e ainda pela injeção de água sob pressão (LEITE, 2007).

No final da fermentação, os grãos são lavados e secos (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). É um processo ainda pouco usado no Brasil, mas que vem ganhando mais adeptos devido a sujeitar os grãos de café a menores fermentações (PIMENTA, 2003). O processamento via seca, geralmente utilizado para o café Robusta, é tecnologicamente mais simples do que o processamento via úmida, que é geralmente usado para os grãos de café Arábica (GONZALEZ-RIOS et al., 2007). A maior vantagem da despulpa completa (retirada da casca, polpa e mucilagem) é evitar a fermentação e o desenvolvimento de fungos nos grãos, que prejudicam a qualidade da bebida do café (MOREIRA, 1999).



#### **2.1.4 Água residuária do processamento úmido do café**

A geração de resíduos e subprodutos é inerente em qualquer setor produtivo. Os setores agroindustriais e alimentícios produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Entre os produtos mais comercializados no mundo, destaca-se o café, sendo superado apenas pelo petróleo e, portanto, a indústria do café é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos, como as polpas, cascas e água residuária do processamento úmido dos grãos (MUSSATO et al., 2011; NABAIS et al., 2008), representando uma ameaça ao meio ambiente devido à disposição insegura destes resíduos, que levam a uma poluição da água e da terra em torno das unidades de tratamento (MURTHY; NAIDU, 2012).

O processamento via úmida resulta em um café de qualidade superior quando comparado ao processamento via seca. Atualmente na Índia, cerca de 75% a 80% do café Arábica e 15% a 20% do café Robusta são processados por este método (SELVAMURUGAN et al., 2010). Apesar das inúmeras vantagens como redução dos custos e do espaço de secagem, este tipo de processamento utiliza uma grande quantidade de água nas suas diferentes fases. De acordo com Delgado e Barois (1999), para cada tonelada de grãos de café processados são consumidos, em média, 4.000 L de água.

A água residuária desse processamento é rica em sólidos suspensos totais e dissolvidos contendo uma grande variedade de compostos orgânicos, tais como açúcares (frutose, galactose e glicose), pectinas e compostos fenólicos (ácidos clorogênico, cafeico e taninos). Devido à alta concentração de poluentes, a sua disposição diretamente em corpos d'água naturais sem tratamento prévio tornou-se indesejável, pois além de poluir o

corpo hídrico receptor pode ser perigoso à vida aquática e à saúde humana (BRUNO; OLIVEIRA, 2008; DEVI; SINGH; KUMAR, 2008; GONÇALVES et al., 2008; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010).

Haddis e Devi (2008) avaliaram a carga poluente das águas residuárias geradas por uma planta de processamento de café na Etiópia, seu efeito em corpos d'água localizado nas proximidades, além do efeito sobre a saúde das comunidades que residem na vizinhança. Todos os parâmetros analisados como pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais, fosfato e nitrato, excederam os limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Os autores relataram muitos problemas de saúde graves entre os moradores de áreas próximas, como sensações de tontura, irritações nos olhos, ouvidos e pele, dores no estômago, náuseas e problemas respiratórios.

Segundo Fia et al. (2007), o lançamento de resíduos orgânicos em corpos d'água leva à depleção do oxigênio dissolvido no meio, devido à utilização desse gás pelos microrganismos, durante a decomposição aeróbica. Este decréscimo na concentração do oxigênio dissolvido pode ser fatal para peixes e outros animais aquáticos. As águas residuárias também podem produzir gases como o metano, dióxido de carbono, gás sulfídrico e amônia, como resultado da atividade bacteriana, poluindo o ar. Além de existir o risco de poluição das águas subterrâneas

Devido à pressão exercida nos frutos para descascamento dos grãos, espera-se encontrar na água residuária muito dos componentes encontrados na polpa (GONÇALVES, 2006). Estudos realizados na distribuição dos macrocomponentes do fruto do cafeeiro do tipo cereja, desde o

início do processamento pós-colheita até a sua infusão, permitem constatar que somente 6% do peso do fruto fresco são aproveitados na preparação da bebida. Os 94% restantes, constituídos por água e subprodutos do processo de beneficiamento, na maioria dos casos não recuperados, podem ser fonte de contaminação do meio ambiente (LO MONACO, 2005).

A ideia do aproveitamento dos resíduos do processamento do café surge da necessidade de minimizar seus efeitos negativos no ambiente, dando-lhes um destino alternativo com geração de produtos com valor agregado (NAVIA; VELASCO; HOYOS, 2011). Atualmente, a alta produtividade de café por hectare, as rigorosas legislações ambientais, o alto custo dos combustíveis e dos fertilizantes favorecem o uso desses resíduos para sua transformação em produtos de valor agregado (DIAS et al., 2014).

## **2.2 ASPECTOS AMBIENTAIS**

Para devolver a água residuária do café ao corpo hídrico, é necessário que seja tratada de modo que remova os resíduos e atenda às condições e padrões para o lançamento de efluentes estabelecidos pela legislação (CONAMA, 2005).

De acordo com a legislação ambiental vigente, é proibido o lançamento da água residuária do café em corpos hídricos por não atenderem aos parâmetros de lançamentos de classe 2 e 3, tornando a fertirrigação a forma mais difundida para destinação (CAMPOS, PRADO e PEREIRA, 2010). A legislação tem como principal objetivo minimizar os problemas de poluição causados pelo descarte de efluentes (MIERZWA, HESPANHOL, 2005).

A resolução Nº 430 dispõe sobre as condições, os

parâmetros, os padrões e as diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos d'água receptores. Estabelece como condição, dentre outras, pH entre 5 a 9 e materiais sedimentáveis até 1mL.L-1. Apesar de não abordar sobre a disposição de efluente no solo, mesmo tratados, caso seja feita, preconiza que essa ação não poderá causar poluição ou contaminação das águas superficiais ou subterrâneas (CONAMA, 2011).

A Instrução Normativa Nº 09, de 17 de setembro de 2008, estabelece diretrizes para o processo de licenciamento ambiental das atividades de descascamento e ou despulpamento de café, por considerar que essa etapa, se mal manejada, pode gerar sérios riscos ao meio ambiente e à saúde e bem estar da população. Orienta sobre a destinação adequada da água residuária do café, através de fertirrigação; da disposição em lagoas de estabilização; e tratamento através de qualquer outro sistema físico-químico-biológico, com comprovação de sua eficácia e eficiência (IDAF, 2008).

Também instrui sobre a lavagem dos grãos, permitindo o retorno da água aos mananciais, desde que seja implantado um adequado sistema de retenção de sólidos (Art. 6º); sobre a captação de água e para o lançamento de efluentes (Art. 8º); e sobre a destinação adequada das cascas de café, que não poderá ficar armazenada na área do empreendimento (IDAF, 2008). O lançamento da água residuária do café em corpos hídricos, sem tratamento adequado, é proibido (CONAMA, 2011).

### **2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólicos secundários de plantas envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta e na adaptação a condições de estresse



HUSAIN, 2009; LIU et al., 2002) estando presentes nas águas residuárias geradas por estes setores e notavelmente em águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro (FIA et al., 2010).

Essas substâncias causam uma constante preocupação do ponto de vista ambiental (KRINGSTAD; LINDSTROM, 1984), devido ao alto grau de toxicidade, bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares, mesmo em baixas concentrações e persistência no ambiente, além de ser altamente tóxicos aos microrganismos no tratamento biológico (GONÇALVES et al., 2008; NIELSON et al., 1991; OHLENBUSCH; KUMKE; FRIMMEL, 2000; PUIG; BARCELÓ, 1996). Se essas substâncias forem liberadas no meio ambiente elas podem se acumular em águas superficiais e subterrâneas e no solo (CONIGLIO et al., 2008; GIANFREDA et al., 2003).

O impacto ambiental e a toxicidade destes compostos fenólicos e seus derivados pode variar dependendo do número, tipo e posição dos grupos substituintes no anel do fenol. Muitos deles não são apenas tóxicos em baixas concentrações, mas são também possíveis cancerígenos e desreguladores endócrinos. Portanto, a remoção de tais compostos a partir de uma instalação industrial, antes da sua disposição final é necessária (GONZALEZ; AGOSTINI; MILRAD, 2008; SAKURAI; MASUDA; SAKAKIBARA, 2003; STEEVENSZ et al., 2009).

A Resolução no 430 do CONAMA, de 13/5/2011, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Esta resolução estabelece que o controle dos teores máximos de compostos fenólicos em corpos de água é sujeito à análise de “fenóis totais”. Segundo o

Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2011), os efluentes de quaisquer fontes poluidoras somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, em corpos de água se apresentarem concentrações máximas de fenóis totais de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Campos, Prado e Pereira (2010) caracterizaram as águas residuárias do processamento do café e encontraram a presença de compostos fenólicos (teor médio de 954,2 mgL<sup>-1</sup>), que ultrapassaram a resolução n° 430 do CONAMA.

Segundo os autores, estes compostos são considerados tóxicos, atuando como inibidores das atividades biológicas de microrganismos e de organismos vegetais e animais (peixes, crustáceos, entre outros), e em excesso, podem interferir no tratamento biológico destes efluentes, inibindo as bactérias e outros microrganismos presentes.

O fenol em uma concentração igual ou superior a 1 mgmL<sup>-1</sup> pode afetar a vida aquática (VEERESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005). Bruno e Oliveira (2008) encontraram concentrações médias de fenóis totais na água residuária do beneficiamento de café por via úmida de 80 a 97 mgL<sup>-1</sup>, que excede o permitido para lançamento de efluentes. Fia et al. (2010) também encontraram uma concentração elevada de compostos fenólicos nas águas do processamento dos frutos do cafeeiro, 127,00 mgL<sup>-1</sup>, que ultrapassa o limite permitido.

## **2.4ÁCIDO CÍTRICO**

### **2.4.1 Evolução Histórica**

A descoberta do ácido cítrico foi atribuída ao alquimista islâmico Jabir Ibn Hayyan no oitavo século depois de Cristo e foi isolado e cristalizado pela primeira vez a partir de suco de limão

pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele em 1784. Sua produção comercial começou na Inglaterra em 1860 na forma de citrato de cálcio extraído de limão importado da Itália (GREWAL e KALRA, 1995; PAPAGIANNI, 2007). Em 1880, Grimoux e Adams sintetizaram o ácido cítrico a partir de glicerol e Wehmer (1893) relatou que certos fungos do gênero *Citromyces* (hoje incluídos no gênero *Penicillium*) eram capazes de elaborar e secretar ácido cítrico a partir de açúcar (LIMA et al., 2001; SOCCOL et al., 2006; PAPAGIANNI, 2007).

Em 1917, o químico americano James Currie descobriu que certos cultivos de *Aspergillus niger* podiam ser produtores eficientes de ácido cítrico em processo de fermentação em superfície. *Aspergillus niger* era conhecido como produtor de ácido oxálico, mas o baixo pH (2,5 – 3,5) usado no trabalho de Currie suprimiu a formação dos ácidos oxálico e glucônico. Em 1923, a indústria Pfizer nos Estados Unidos iniciou a produção em escala industrial usando esta técnica (GREWAL e KALRA, 1995; PAPAGIANNI, 2007). Na década de 1950, foi desenvolvida nos Estados Unidos uma técnica mais eficiente que o processo anterior, a fermentação submersa (GREWAL e KALRA, 1995), que é atualmente o modo de condução mais utilizado no processo de obtenção de ácido cítrico em larga escala.

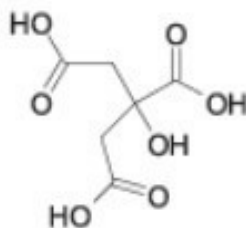
#### **2.4.2 Característica e Aplicações**

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2- hidroxí-1,2,3- propanotricarboxílico, é um ácido orgânico tricarboxílico fraco com peso molecular de 210,14 Da (PAPAGIANNI, 2007). Esse ácido é um metabólito intermediário pertencente ao ciclo de Krebs e é encontrado como um constituinte natural de uma variedade de frutas cítricas como limão, laranja, abacaxi, pêra, pêsego e figo (GREWAL e KALRA,



1995). Sua fórmula química é  $C_6H_8O_7$  conforme ilustrado na Figura 4.

**Figura 4** Representação da estrutura química do ácido cítrico



**Fonte:** (LIMA et al., 2010).

Na temperatura ambiente, o ácido cítrico é um pó cristalino branco. Pode existir na forma anidra e como monohidrato, que contém uma molécula de água para cada molécula de ácido cítrico (NELSON e COX, 2002). O ácido cítrico é amplamente utilizado em produtos alimentícios (70%), farmacêuticos (12%), cosméticos e em outros produtos industriais (18%) devido às suas propriedades como acidulante, conservante, regulador de pH, aromatizante e antioxidante. É utilizado também como aditivo funcional em detergentes e cosméticos (TRAN et al., 1998; WANG, 1998; RYMOWICZ et al., 2008; LAZAR et al., 2011). Seu emprego em alimentos representa 55 a 65% do mercado total de acidulantes, contra 20 a 25% pelo ácido fosfórico e 5% correspondendo ao ácido málico (MAGNUSON, LASURE, 2004). É comumente utilizado como conservante natural (antioxidante), conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante em alimentos e bebidas (RYMOWICZ et al., 2008).

O ácido cítrico é um aditivo alimentar versátil e inócuo. É aceito mundialmente como GRAS (Generally Recognized As Safe/ Geralmente Reconhecido como Seguro) pela United States Food and Drug Administration e aditivo alimentício seguro pelo

“Experts Committee FAO (Food and Agriculture Organization/Organização para Alimentação e Agricultura) e WHO (World Health Organization/Organização Mundial da Saúde), sem restrições à quantidade (SOCCOL et al., 2006).

Na indústria de alimentos, esse ácido é usado em larga escala na fabricação de refrigerantes, sobremesas, conservas de frutas, geléias, doces, vinhos, na composição de sabores artificiais de refrescos em pó e na preparação de alimentos gelatinosos (GREWAL e KALRA, 1995).

Na indústria farmacêutica, é usado como estabilizante do ácido ascórbico devido à sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar CO<sub>2</sub> (GREWAL e KALRA, 1995) e atua como coagulante em transfusão sanguínea (LIMA et al., 2001).

Na indústria de cosméticos é usado para ajustar o pH de loções adstringentes, como seqüestrante em cremes de lavagem (“rinse”) e fixadores de cabelo (LIMA et al., 2001).

No setor de embalagens, ésteres de ácido cítrico, como trietil, Tributil e acetildibutil, são usados como plastificantes não tóxicos nas películas plásticas de embalagens de alimentos (RODRIGUES, 2006).

Há um interesse crescente em aumentar a produção de ácido cítrico devido a muitas aplicações. Os estudos revelam o potencial uso de ácido cítrico em biopolímeros, em drug delivery, em engenharia de tecidos para o cultivo de uma variedade de células e em muitas outras aplicações biomédicas e ambientalmente sustentáveis, como o uso de ácido cítrico para a remoção eficiente de resíduos de fluxo pós-solda por militares (ROBIN et al., 1995; ASHKAN et al., 2010; GUILLERMO et al., 2010).

## 2.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

### 2.5.1 Microorganismos Produtores de Ácido Cítrico

Um grande número de microorganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras tem sido utilizados em uma variedade de substratos para a produção biológica de ácido cítrico, sendo indicados na Tabela 1 (CROLLA e KENNEDY, 2004; ANDRÉ et al., 2007; FORSTER, 2007; PAPAGIANNI, 2007).

**Tabela 1** Microorganismos produtores de ácido cítrico

<b>Fungos filamentosos</b>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. clavatus</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>Absidia sp.</i> , <i>Acremonium sp.</i> , <i>Botrytis sp.</i> , <i>Eupenicillium sp.</i> , <i>Mucor piriformis</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. janthinellu</i> , <i>P. luteum</i> , <i>P. restrictum</i> <i>Talaromyces sp.</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Ustilina vulgaris</i>
<b>Leveduras</b>	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. catenula</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. intermédia</i> , <i>Pichia</i> , <i>Debaromyces</i> , <i>Kloekera</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Torula</i> , <i>Torulopsis</i> ,
<b>Bactérias</b>	<i>Arthrobacter paraffinens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Corynebacterium ssp</i>

**Fonte:** DHILLON et al. (2011)

Entretanto, a maior parte destes microorganismos não é capaz de produzir rendimentos comercialmente aceitáveis devido ao fato de que o ácido cítrico é um metabólito do metabolismo de energia e o seu acúmulo em quantidades apreciáveis é o resultado de severas irregularidades no metabolismo causado por deficiências genéticas ou desequilíbrios metabólicos (SANCHEZ-RIERA, 2010). Entre as estirpes referidas, o fungo *Aspergillus niger*, devido à sua maior produção de ácido cítrico por unidade de tempo, é o principal microorganismo utilizado na produção industrial de ácido cítrico que ocorre principalmente por cultivo aeróbio submerso (YOKOYA, 1992; PAZOUKI et al., 2000;

CROLLA e KENNEDY, 2001; ANASTASSIADIS et al., 2008)

Linhagens de *Aspergillus niger* que são utilizadas industrialmente na produção de ácido cítrico não estão disponíveis gratuitamente e apenas algumas podem ser obtidas a partir de coleções de cultura internacionais (SOCCOL et al., 2006). Cepas mutantes de *Aspergillus niger* também são usadas na produção comercial de ácido cítrico (JIANLONG et al., 2000).

Os substratos mais utilizados são a beterraba e melão de cana-de-açúcar (ANASTASSIADIS et al., 2008). Entretanto, sua alta demanda tem implicado no emprego de novos processos, mais econômicos e sustentáveis, como a utilização de resíduos agroindustriais em cultivo em estado sólido, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar, que oferece inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais, pois além de reduzir os custos de produção e impactos ambientais, oferece uma extração mais eficiente do produto (JIANLONG et al., 2000).

Atualmente, o ácido cítrico é o segundo metabólito microbiano mais produzido no mundo, perdendo apenas para o etanol, sendo estimado em mais de 1,7 milhões de toneladas/ano, com um aumento anual em sua demanda de 5%, e valor de mercado ultrapassando 2 bilhões de dólares por ano (DHILLON et al., 2011).

Suas propriedades o tornam um produto multifuncional, cerca de 70% de sua produção total é utilizada na indústria alimentícia como acidificante e no melhoramento do sabor de alimentos e bebidas, seguida pela indústria farmacêutica que utiliza cerca de 12% do bioproduto na síntese de biopolímeros, e 18% são utilizados para outras aplicações como aditivos detergentes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, na agricultura para a biorremediação de metais pesados no solo (VANDENBERGHE et al., 2000; KAMZOLOVA et al., 2003;

KUBICEK, 2001; SOCCOL; VANDENBERGHE; RODRIGUES, 2006; DHILLON et al., 2011).

### **2.5.2 Matéria-prima e Substrato**

Os meios fermentativos devem conter todos os elementos imprescindíveis à síntese de material celular e formação de produto, além de serem economicamente viáveis (VENTER et al., 2004; RYMOWICZ et al., 2006; LAZAR, et al., 2011). Os microrganismos necessitam de carbono, nitrogênio, minerais, água, eventualmente fatores de crescimento e, caso seja aeróbio, oxigênio, para formar biomassa e impulsionar reações de biossíntese e manutenção celular (LEANGON et al., 2000; KUMAR et al., 2003).

Os substratos ricos em carboidratos são os melhores e as mais baratas fontes de carbono, uma vez que podem ser adquiridos a baixo custo como subprodutos ou resíduos da indústria alimentícia ou atividades agrícolas. Normalmente os carboidratos são as principais fontes de carbono acessíveis aos fungos, são metabolizados proporcionando energia, atuando também como precursores na síntese do material celular (LEANGON et al., 2000; KUMAR et al., 2003).

Atualmente, a produção de ácido cítrico em escala industrial por *Aspergillus niger* é realizada utilizando meios de produção contendo sacarose (VENTER et al., 2004; RYMOWICZ et al., 2006; LAZAR, et al., 2011), milho hidrolisado, caldo de cana, melaço decationizado e açúcar cristal usando fermentação submersa (LEANGON et al., 2000; KUMAR et al., 2003) por empresas como ADM (Archer, Daniels, Midland Company), Cargill, Tate & Lyle, DSM Nutritional Products, Junbunzlauer, Israel's Gadot Biochemical Industries, China's

Anhui BBCA Biochemical.

No Brasil, o melaço é preferencialmente utilizado como fonte de carbono para a produção microbiana de ácido cítrico devido ao seu custo relativamente baixo e elevado teor de açúcar (40-55%) (SOCCOL et al., 2006). Porém, a presença de metais traço (ferro, cálcio, magnésio, manganês, zinco) no melaço de cana retarda a síntese do ácido cítrico, portanto, há necessidade de algum pré-tratamento para redução dos mesmos na matéria-prima a fim de torna-la adequada para o uso na fermentação submersa (SOCCOL et al., 2006). O melaço de beterraba é preferível ao de cana de açúcar devido ao seu baixo conteúdo de metais traço, fornecendo melhores rendimentos de produção do que o melaço de cana. Entretanto, existem variações consideráveis de rendimento dentro de cada tipo.

Em escala laboratorial, estão sendo utilizados como matérias-primas hidrocarbonetos, resíduos agroindústrias, e materiais ricos em amido (HANG e WOODAMS, 1998; JIANLONG et al. 2000; MOURYA e JAUHRI, 2000; VANDENBERGHE et al., 2000; AMBATI e AYYANNA, 2001).

Uma variedade de subprodutos e resíduos agroindustriais também tem sido investigada como matéria-prima para a produção de ácido cítrico, como bagaço de mandioca, casca de café, farelo de trigo, bagaço de maçã, resíduos de abacaxi, casca de kiwi, bagaço de uva, resíduos de citrinos entre outros, utilizando técnicas de fermentação em estado sólido (SOCCOL et al., 2006).

### **2.5.3 Formas de condução do processo**

A síntese de ácido cítrico através da fermentação é o processo mais econômico e amplamente utilizado para obtenção

deste produto. Noventa e nove por cento do ácido cítrico produzido mundialmente são obtidos por fermentação (KUFORJI et al., 2010). O processo de obtenção de ácido cítrico por fermentação apresenta vantagens como operação simples e estável, requerimento de sistemas de controle menos sofisticados, menor consumo de energia e pouca influência de falhas de energia no funcionamento da planta (SOCCOL et al., 2006).

O fungo filamentososo *Aspergillus niger* é preferencialmente utilizado, pois possui alto potencial de produção de ácido cítrico (DHILLON et al., 2011). A produção industrial de ácido cítrico por fermentação pode ser conduzida por três formas: fermentação em estado sólido, fermentação em superfície e fermentação submersa (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000). A fermentação em estado sólido, originalmente desenvolvido no Japão, consiste em uma bioconversão em meio sólido empregando-se geralmente farelo de arroz ou resíduos de frutas, que após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos, sendo utilizada uma linhagem específica de *Aspergillus niger* (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000).

O processo de fermentação em superfície foi o primeiro método empregado para obtenção biotecnológica de ácido cítrico em grande escala (GREWAL e KALRA, 1995). Nesta operação, o micélio do fungo *Aspergillus niger* cresce sobre a superfície do meio de cultura líquido e estático, que se encontra em bandejas de alumínio de elevada pureza contendo uma camada de meio de 5 a 20 cm de altura. Estas bandejas são colocadas em câmaras ventiladas, onde há circulação de ar esterilizado, o qual é responsável pelo fornecimento de oxigênio assim como pela retirada do calor produzido durante o processo fermentativo e a temperatura é mantida entre 28 – 30°C (GREWAL e KALRA,

1995).

A fermentação submersa é a técnica mais utilizada para a produção de ácido cítrico, onde o fungo se desenvolve inteiramente submerso no meio de cultura líquido sob agitação, que serve para assegurar a homogeneidade tanto da distribuição dos microorganismos quanto dos nutrientes. Estima-se que cerca de 80% da produção mundial é obtida através deste modo de condução (SOCCOL et al., 2006) utilizando *Aspergillus niger* crescido em meio contendo glicose ou sacarose (VANDENBERGHE et al., 1999; KUMAR et al., 2003) em tanques agitados de 40-200 m<sup>3</sup> ou fermentadores airlift de 200-900 m<sup>3</sup> de capacidade (WAITES et al., 2001).

Este processo de fermentação empregado em larga escala requer instalações mais sofisticadas e controle rigoroso. Por outro lado, apresenta diversas vantagens, como maior produtividade e rendimento, custos operacionais mais baixos e menor risco de contaminação. A fermentação submersa pode ser realizada em batelada simples, batelada alimentada ou sistemas contínuos, embora seja mais freqüente o uso da batelada simples (SOCCOL et al., 2006).

Normalmente, a fermentação submersa para obtenção de ácido cítrico ocorre entre 5 e 12 dias, dependendo das condições de processo. O método de fermentação utilizado influencia no rendimento de produção de ácido cítrico com a mesma estirpe do fungo *Aspergillus niger*. Assim, uma estirpe que produz bons rendimentos na fermentação sólida ou superfície líquida não é necessariamente um bom produtor na fermentação submersa. Desse modo, cada um dos métodos e de matéria-prima de interesse industrial deve ser testado com a estirpe de estudo (YOKOYA, 1992) e uma ampla gama de substratos pode ser empregada para a produção eficiente e viável de ácido cítrico de



acordo com o tipo de fermentação (DHILLON et al., 2011).

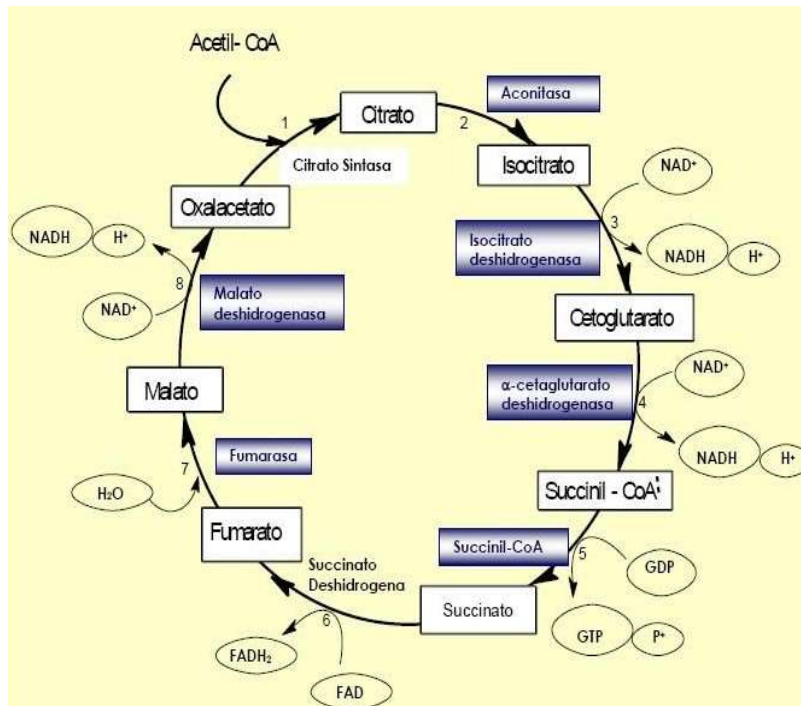
## **2.6BIOQUÍMICA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO**

A degradação da glicose (glicólise, sequência de reações bioquímicas catalisadas por enzimas específicas) produz energia e metabólitos. O produto final da glicólise é o ácido pirúvico que, na presença de oxigênio é metabolizado em acetil-CoA. Durante a fermentação do ácido cítrico duas vias têm evidências, a EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), também chamada de via glicolítica e a do HMP (monofosfato de hexose) (YOKOYA, 1992).

Na fermentação com *Aspergillus niger* ambas as vias são usadas durante todo o tempo. A de maior atividade durante a fase de crescimento, quando pouco ácido cítrico é produzido, é a HMP. Já a via EMP, cuja maior atividade ocorre durante a fase vegetativa, desempenha o principal papel na glicólise da fermentação cítrica, pois é através dela que a maior parte do citrato é formada (YOKOYA, 1992; PANDEY et al., 2001).

A via glicolítica tem duplo papel: degradação da glicose para geração de ATP e fornecimento de elementos para biossínteses celulares. A velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades. Em condições aeróbias, o piruvato gerado da glicose sofre descarboxilação oxidativa formando acetil-CoA. O acetil CoA derivado da via EMP condensa-se com o oxalacetato para formar citrato (Figura 5). Acredita-se que a entrada desse composto no ciclo de Krebs seja abortada, devido à excessiva acidez do meio (pH próximo de 2) (YOKOYA, 1992; PANDEY et al., 2001).

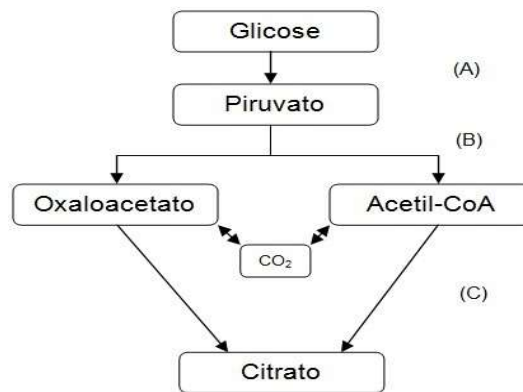
**Figura 5** Esquema geral do acúmulo de ácido cítrico no ciclo de Krebs



Fonte: PAGAGGIANI (2007)

Bioquimicamente, é possível simplificar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose (PAGAGGIANI, 2007). A Figura 6 demonstra o processo que envolve três etapas: (A) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA através da glicólise, (B) formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO<sub>2</sub> e (C) acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs.

**Figura 6** Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs



Fonte: KUBICEK, ROHR (1986)

O processo cinético de produção apresenta uma fase de crescimento rápido do fungo, e uma segunda fase em que o crescimento diminui e a produção de ácido cítrico é máxima, assim fica caracterizado um processo bifásico (PRATA, 1989). Rohr et al. (1981) e Kubicek e Rohr (1986) concluíram que a produção de ácido cítrico é realizada numa pequena proporção por células em crescimento e, na maior parte, por células em fase estacionária. Duas enzimas chaves foram estudadas em detalhe com relação à fermentação cítrica, que são a aconitase e a isocitrato desidrogenase.

A atividade dessas enzimas diminui para um nível muito baixo com o acúmulo de ácido cítrico. Rohr et al. (1981), verificam que a enzima isocitrato desidrogenase é inibida na presença de ácido cítrico, pH baixo (1,7-2,0) e de ferrocianeto. A adição de ferrocianeto de potássio ao meio inibe a atividade da aconitase e a da enzima isocitrato desidrogenase, estimulando assim o acúmulo de ácido cítrico.

Os valores de pH mais elevados (por exemplo 3,0) levam à uma condição que inativa a glicoseoxidase, que normalmente dá origem ao ácido glucônico (ácido orgânico indesejável). Em aproximadamente 4-5 dias, 80% do açúcar total é convertido para ácido cítrico, com picos que atingem cerca de 100 (g/L-1) (YOKOYA, 1992), dependendo da concentração inicial de sacarose.

### 2.6.1 Citrato sintase

O acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é acompanhado pela ação e inativação ou desaparecimento e redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs, tal como aconitase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase e succinato desidrogenase. Quase todas as enzimas do ciclo de Krebs estão presentes em extratos de células de micélio de *Aspergillus niger*, tal como a citrato sintase que desempenha um papel importante na produção de ácido cítrico, pois controla o primeiro passo do ciclo de Krebs, catalisando a entrada de carbono para formar citrato (YOKOYA, 1992).

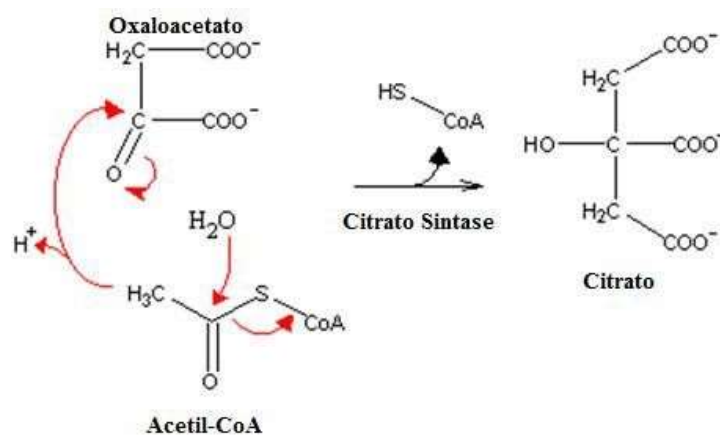
A via metabólica estabelecida envolvida na biossíntese do ácido cítrico inclui a citrato sintase e esta enzima é, muitas vezes, considerada como fundamental no ciclo de Krebs, talvez, porque pode ser considerada como o primeiro passo do ciclo (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

Kubicek e ROHR (1986) em estudo com enzimas envolvidas na produção de citrato por *Aspergillus niger*, avaliaram cepas produtoras de ácido cítrico e todas apresentaram atividade da citrato sintase. A biossíntese de citrato envolve pelo menos uma etapa mitocondrial, ou seja, a citrato sintase, está localizada exclusivamente na mitocôndria. A enzima cataliza a reação de

condensação de um resíduo de acetato contendo 2 carbonos de uma acetil coenzima A com uma molécula de oxaloacetato contendo quatro carbonos para formar um citrato de seis carbonos (Figura 7).

O oxaloacetato será regenerado após completada uma série do ciclo de Krebs. Esta reação de equilíbrio favorece a produção de citrato em consequência da tioéster que ocorre como parte da reação (KUBICEK; ROHR, 1986).

**Figura 7** Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível



**Fonte:** KUBICEK; RÖHR (1986)

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

## 2.7 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

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

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

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K. Enhanced production, purification and characterization of industrial enzyme by *Penicillium lilacinum* (Thom, 1910). **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, Abu Dhabi, v.5, n. 1, p. 2018, 2018.

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro

AMBATI, P., & AYYANNA, C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 331–335, 2001.

ANASTASSIADIS, S.; MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; FINOGENOVA, T. V. Citric Acid Production Patent Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 107-123(17), 2008.

ANDRÉ, F.; ANDREAS, A.; STEPHAN, M. & GEROLD, B. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1409–1417, 2007.

ARGOLLO, F. A. M. **Arquitetura do café**. Campinas: Imprensa Oficial do Estado, 2004.

ASHKAN, T. N.; ADELI, M.; VOSSOUGH, M. Poly(citric acid)-block- poly(ethylene glycol) copolymers—New candidates for nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. doi:10.1016/j.nano.2009.11.008, 2010.

ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Removal of  $\alpha$ -naphthol and other phenolic compounds from polluted water by white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in the presence of an additive, polyethylene glycol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 14, n. 4, p. 536-542, 11 Sept. 2009.

BÁRTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.

BEKALO, S. A.; REINHARDT, H. W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, New York, v. 43, n. 8, p. 1049-1060, Oct. 2010.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4th ed. Heidelberg: Springer, 2009. 1070 p.

BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, New York, v. 47, p. 669–687, 1955.

BENNET, J. W. **An overview of the genus Aspergillus**. 2010. Disponível em: <  
<http://openaccessbiology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf>>  
Acesso em: 22 jun. 2019.

BISHT, S.; SISODIA, S. S. Coffea arabica: a wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, Mumbai, v. 1, n. 1, p. 58-65, Dec. 2010. BORÉM, F. M. Pós colheita do café. In: \_\_. **Processamento do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

BORRELLI, R. C. et al. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1338-1343, Feb. 2004.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764 p.

BRANDÃO, V. S. et al. Tratamento de águas residuárias de suinocultura utilizando filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 327-333, set./dez. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. Acesso em: 26 jun. 2019.



BRUM, S. S. **Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do café para produção de novos materiais**. 2007. 152 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. Tratamento anaeróbio de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores UASB em dois estágios. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 364-377, abr./jun. 2008.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, M. A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físicoquímica, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, jul./ago. 2010.

CELESTINO, J. D. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, Singapore, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: UFMG/DESA, 1997. 246 p.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 372, n. 3, p. 362-372, Mar. 1999.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical Scheme for LC-MS n identification of Chlorogenic acids. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, Apr. 2003.

CLIFFORD, M. N.; KASI, T. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. **Food Chemistry**, Barking, v. 26, n. 1, p. 59-69, Feb. 1987.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wetprocessed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 40, n. 1, p. 35-42, May 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** café, safra 2019 segunda estimativa, maio 2019. Brasília, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 julho.2019.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Estabelece as condições de lançamento de efluentes, e da outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Acesso em: 14 de jul. 2019.

CONAMA. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispondo sobre as condições, parâmetros, padrões e diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução Nº 357 de 18 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 mai. 2011. Seção 1, p. 58-63. Acesso em: 23 de jun 2019.

CONIGLIO, M. S. et al. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 7, p. 1035-1042, July 2008.

CROLLA, A. & KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. **Journal of Biotechnology**, v. 89, no. 1, p. 27–40, 2001.

CROLLA, A. & KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on  $\eta$ -paraffins. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p.73-84, 2004.

DELGADO, E. A.; BAROIS, I. Lombricompostaje de la pulpa de café em México. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: UEM, 1999. p. 335-343.

DESPOT, D. J. et al. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. **Mycological Progress**, Tübingen, v. 16, n. 1, p. 63–72, 2017.

DEVI, R.; SINGH, V.; KUMAR, A. COD and BOD reduction from coffee processing wastewater using Avacado peel carbon. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 6, p. 1853-1860, Apr. 2008.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 505–529, 2011.

DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Org.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2014. Cap. 15, p. 376-382.

DIERCKX, R. P. Un essai de révision du genre *Penicillium*. **Annales de la Société scientifique de Bruxelles**, Bruxelles, v. 25, p. 83–89, 1901.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet postharvesting methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 118, n. 3, p. 851-855, Feb.2010.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee byproducts. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2012.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, Jan./Mar. 2006.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and waterdecaffeinated Arabica coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 54, n. 2, p. 374-381, Jan. 2006.

FENNELL, D. I.; RAPER, K. B. New species and varieties of *Aspergillus*. **Mycologia**, New York, v. 47, p. 68–89, 1955. FRIES EM (1832). *Systema Mycologicum*. E. Mauritius, Gryphiswald.

FERRÃO, A. M. A. **Arquitetura do café**. Campinas: UNICAMP; São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2004. 296 p.

FIA, R. et al. Tratamento das águas do processamento dos frutos

do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: II., remoção de nutrientes e compostos fenólicos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 6, p. 1203-1213, dez. 2010.

FÖRSTER, A.; AURICH, A.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbial and Cell Physiology Appl Microbiol Biotechnol** DOI 10.1007/s00253-007-0958-0, 2007.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Revision of *Penicillium subgenus* *Furcatum* based on secondary metabolites and conventional characters. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds.). **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. London: Springer US, 1989. p. 159–172.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p. 201–207, 2000.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 2004, n. 49, p. 1–173, 2004.

FRISVAD, J. C. et al. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

GIANFREDA, L. et al. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 3205-3215, July 2003.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in Microbiology**, New York, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2013.

GONÇALVES, M. **Caracterização e oxidação dos compostos orgânicos das águas residuárias da despolpa úmida dos frutos do cafeeiro**. 2006. 112 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GONÇALVES, M. et al. Materiais à base de óxido de ferro para oxidação de compostos presentes no efluente da despolpa do café. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1636-1640, set. 2008.

GONZALEZ, P. S.; AGOSTINI, E.; MILRAD, S. R. Comparison of the removal of 2, 4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 982-989, Jan. 2008.

GONZÁLEZ-RÍOS, O. et al. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I., green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3/4, p.289-296, May 2007.

GUILLERMO, A.; JIAN, Y.; RYAN, H. New biodegradable biocompatible citric acid nano polymers for cell culture growth & implantation engineered by Northwestern University Scientists. **Nano patents and innovations, US Patent Application** 20090325859, 2010.

GREWAL, H. S. & KALRA, K.L. Fungal Production of Citric Acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.

HA, T. M. et al. Anti-inflammatory effects of curvularin-type metabolites from a mariner-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5859 in lipopolysaccharide- induced RAW264.7 macrophages. **Marine Drugs**, Beijing, v. 15, n. 9, p. 1–12, 2017.

HADDIS, A.; DEVI, R. Effect of effluent generated from coffee processing plant on the water bodies and human health in its vicinity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 259-262, Mar. 2008.

HANG, Y. D. & WOODAMS, E. E. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 65(3), p. 251–253, 1998.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solidstate fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 5, p. 175-186, Aug. 2004.

HOUBRAKEN, J. et al. *Penicillium araracuarensense* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarajense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 1462–1475, 2011.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. **Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species**. 1. ed. [s.l.]. London: Elsevier Inc. All rights reserved., 2014. v. 86.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 70, p. 1–51, 2011.

HOUBRAKEN, J.; WANG, L.; LEE, H. B.; FRISVAD, J. C. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. **Persoonia**, v. 36, p. 299–314, 2016.

HUBBARD, R. D. et al. Surface runoff and shallow ground water quality as affected by center pivot applied dairy cattle waste. **Transactions of ASAE**, Saint Joseph, v. 30, n. 2, p. 430-437, 1987.

HUBKA, C. M. et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 63-139, 2014.

HUBKA, V. et al. Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. **Mycologia**, New York, v. 107, n. 1, p. 169-208, 2015.

IDAF - Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. Instrução Normativa Nº 09, de 17 de setembro de 2008, **Diretrizes para o processo de licenciamento ambiental das atividades de descascamento/despulpamento de café**. Acesso em: 20 de junho de 2019.

JIANLONG, W.; XIANGHUA, W.; DING, Z. Production of citric acid from molasses integrated with in situ product separation by ion-exchange resin adsorption. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 231–234, 2000.

KAMZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V.; MORGUNOV, I. G.; FINOGENOVA, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 217-222, 2003.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G.; AURICH, A.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; STOTTMEISTER, U.; FINOGENOVA, T. V. Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. **Food Technol. Biotechnol**, v. 43 (2), p. 113-122, 2005.

KAMZOLOVA, S.V.; FINOGENOVA, T.V.; MORGUNOV, I. **Biosynthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* grown on vegetable oils**, 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, Spain, p. 98, 2006.

KAMZOLOVA SV, FINOGENOVA, TV, MORGUNOV IG. Microbial production of citric and isocitric acids from sunflower oil. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, (1), p. 51-59, 2008.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 53, n. 74, p. 1–29, 2005.

KRINGSTAD, K. P.; LINDSTROM, K. Spent liquors from pulp bleaching. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 18, n. 8, p. 236A-248A, Aug. 1984.

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

KUBICEK, C. P. **Organic acids**. In: Ratledge C, Kristiansen B, eds. **Basic Biotechnology**. Cambridge, UK: Cambridge University Press; p. 17-44, 2001.

KUBICEK, C.P. & ROHR, M. Citric acid fermentation. **CRC Critical reviews in Biotechnology**, v.3 (4): p. 331-373, 1986.

KUFORIJ, O. O.; KUBOYE, A. O.; ODUNFA, S. A. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. **International Journal of Plant Biology**, 1, 4, 2010.

KUMAR, D.; JAIN V. K. SHANKER, G. & SRIVASTAVA A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731– 1738, 2003.

LATGÉ, J.-P. *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Heidelberg, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999.

LAZAR, Z.; WALCZAK, E.; ROBAK, M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6982–6989, 2011.

LEANGON, S.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. A proposed biochemical mechanism for citric acid accumulation by *Aspergillus niger* Yang no. 2 growing in solid state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 271–275, 2000.

LEITE, S. L. O futuro do café cereja descascado. In: SALVA, T. J. G. (Ed.). **Cafés de qualidade: aspectos tecnológicos, científicos e comerciais**. Campinas: IAC, 2007. p. 167-198.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Schmidell, W. Biotecnologia Industrial. **Processos Fermentativos e enzimáticos**. Volume 3. Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª edição. 2001.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, No. 5, p. 1186-1189, 2010.

LIU J. Z. et al. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.18, n. 4/6, p. 225-232, Oct. 2002.



LOBUGLIO, K. F.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among sexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 4, p. 592–604, 1993.

LO MONACO, P. A. **Fertirrigação do cafeeiro com águas residuárias da lavagem e despolpa de seus frutos**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

MALAVOLTA, E.; MOREIRA, A. **Nutrição e adubação do cafeeiro adensado**. **Piracicaba: Informações Agrônomicas**, n. 80, p. 1-7, dez. 1997. (Encarte técnico).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**. Kluwer Academic/Plenum Publishers., 2004.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MATIELLO, J. B. **Quentes como o café: indicações de uso de equipamentos, produtos e serviços para a cafeicultura**. Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 1999. 140 p.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Varginha: MAPA/PORCAFÉ, 2005. 438 p.

MATOS, A. T. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 647-708.

MATOS, A. T.; CABANELLAS, C. F. G.; BRASIL, M. S. Ensaio de sedimentação em água utilizada no descascamento/despolpa de frutos do cafeeiro. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 14, n. 3, p. 148-155, jul./set. 2006.

MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an opportunistic human pathogen. **Cellular Microbiology**, London, v. 12, n. 11, p. 1535–1543, 2010.

MCNEILL J, BARRIE FF, BUCK WR, et al. (eds) **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. Koeltz Scientific Books, Königstein. 2012. [Regnum vegetabile no. 154].

MELO, A. C. P. **Utilização de água residuária do processo pós-colheita do café na produção de mudas de cafeeiro**. 2009. 48 p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.

MIERZWA, J. C.; HESPANHOL, I. **Água na indústria: uso racional e reuso**. São Paulo: Oficina de textos. 2005. 144 p.

MICHELI, P. A. **Nova plantarvm genera jvxta Tovrnefortii methodvm disposita,..**, 1729.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid state fermentation: II., rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, May 2000.

MITCHELL, D. A.; MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. **Bioreactor design and operation for solid state fermentation**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2002. 102 p.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, nov. 2006.

MOREIRA, A. C. O tesouro redescoberto. **Revista Panorama Rural**, São Paulo, v. 1, n. 6, p. 16-41, 1999.

MOURYA, S. & JAUHRI, K. S. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. **Microbiological Research**, v. 155, p. 37–44, 2000.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by- products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 66, p. 45-58, Sept. 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 5, p. 661-672, Mar. 2011.

NABAIS, J. M. V. et al. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO<sub>2</sub> and steam activation. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 262-268, Mar. 2008.

NAVIA, D. P.; VELASCO, R. J.; HOYOS, J. L. **Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products**. Vitae, Medellín, v. 18, n. 3, p. 287-294, Sept. 2011.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lenhninger: Princípios da Bioquímica**, São Paulo. Sarvier, p. 441-464, 2002.

NICOLETTI, R. et al. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 295–301, 2007.

NIELSON, A. H. et al. Distribution, fate persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 1/2, p. 3-41, 1991.

OGAWA, H.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA, J. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 5, p. 756–771, 1997.

OHLENBUSCH, G.; KUMKE, M. U.; FRIMMEL, F. H. Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 253, n. 1/3, p. 63-74, May 2000.

PALLU, A. P. DE S. **Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010. Piracicaba.

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

PANDEY, A , SOCCOL, C R , RODRIGUEZ-LEON, J A , NIGAM, P **Solid-state fermentation in biotechnology - fundamentals and applications** New Delli Asistech Publishers,2001 221p.

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

PARRA, A. R. P. et al. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 3, p. 433-442, 2008.

Pastore, N.S.; Hasan, S.M.; Zempulski, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3. p. 149-159, 2011.

PAZOUKI, M., & PANDA, T. Recovery of citric acid—A review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 435–439, 1998.

PERRONE, G.; SUSCA, A. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols**, p. 107–119, 2017.

PETERSON, S. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 2, p. 205–226, 2008.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, Berlin, v. 12, n. 4, p. 1– 10, 2009.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.

PITT, J. I. A. **Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. Australia: Food Science Australia, 187 p. 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 593 p. 1988.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. London: Blackie Academic and Professional, 519 p. 2009.

PITT, J. I. **The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Pres, 1979. QFE. **Quadrilátero Ferrífero: Centro de estudos avançados [DEGEO/EM/UFOP]**. Disponível em: <<http://www.qfe2050.ufop.br/>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

PRADO, M. A. C.; CAMPOS, C. M. M. Produção de biogás no tratamento dos efluentes líquidos do processamento de *Coffea arabica* L. em reator anaeróbico UASB para o potencial aproveitamento na secagem do café. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 938-947, maio/jun. 2008.

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

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 8, p. 362- 375, Sept. 1996.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and estimation of Proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1344-1349, Feb. 2004.

RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. **Journal of the Science of Food Agriculture**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 135-144, 1988.

RAPER, K. B.; FENEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: **Williams & Wilkins, 1965. 686 p.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.

RAPER, K. B.; THOM, C. **A manual of the Penicillia**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1949.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2004. 157 p.

RIGUEIRA, R. J. A. et al. Caracterização da qualidade do café (*Coffea Arabica* L.) submetido a diferentes condições de secagem e armazenagem. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 15, n. 2, p. 151-167, abr./jun. 2007.

ROBIN, N.; LARRY, M.; JOHN, F.; JIM, S.; JERRY, M. An investigation of the chemistry of citric acid in military soldering applications. **Naval Air Warfare- Center Weapons Div China Lake CA.**, Report no. A240592, 1995.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, p 1 – 107, 2006.

ROHR M. A century of citric acid fermentation and reserch. **Food Technol Biotechnol**, v.36, p.163-171, 1998.

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

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; AROWSKA, B.; JUSZCZYK, P. Citric Acid Production from Raw Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica*. **Chem. Pap.**, v. 60 (5), p. 391-394, 2006.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. **Chemical Papers**, v. 62, n. 3, p. 239–246, 2008.

RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWIŃSKA, A.;

MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol- containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. **Applied Micro- biology and Biotechnology**, v. 87, p. 971– 979, 2010.

Saenger P, Wikland KA, Conway GS, Davenport M, Gravholt CH, Hintz R, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:3061-9.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 141–173, 2014.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, New York, v. 47, n. SUPPL. 1, p. S13–S20, 2009.

SAMSON, R.; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: GK MACHIDA M. (Ed.). **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Montrouge: Horizon Press, 2009. p. 19–40.

SANCHEZ-RIERA F. Production of organic acids. **Biotechnol**, v. 5, p. 1–9, 2010.

SEIFERT, K. A. et al. *Penicillium cecidicola*, a new species on cynipid insect galls on *Quercus pacifica* in the western United States. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 2, p.517–523, 2004.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**, New York, v.36, n.12, p.1686-1690, Dec. 2010.

SILVA, F. R. **A paisagem do Quadrilátero Ferrífero, MG: Potencial para o uso turístico da sua geologia e geomorfologia**. 144 f. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Geografia). Departamento de Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SILVA, F. C.; ET AL. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, Vitória, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.

SMITH, A. W. Agricultural practices. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee chemistry**. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1985. p. 18-23.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44 (2) 141–149. 2006.

SPERLING, M. von. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos:** princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: UFMG, 1996a. 246 p.

SPERLING, M. von. **Lagoas de estabilização:** princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: UFMG, 1996b. 134 p.

STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. Studies on *Talaromyces* and related genera I. *Hamigera* gen. nov. and *Byssochlamys*. *Persoonia*, v. 6, n. 1971, p. 341–357, 1971.

STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. **The genus *Talaromyces*: studies on *Talaromyces* and related genera II.** 2. ed. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1972.

THOM, C. et al. **The penicillia.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1930.

THOM, C.; RAPER, K. B. **A Manual of the Aspergilli.** London: Bailliere Tindall and Cox, 1945.

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

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chemistry**, Barking, v. 15, n. 3, p. 219-227, 1984.

VANDENBERGHE, L.P.S; SOCCOL, C.R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Microbial production of citric acid. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 42, n.3, p. 263-276, 1999.



VARGA, J. et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. **Acta Biologica Szegediensis**, Budapest, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015.

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

VENTER, T.; KOCK, J. L. F.; BOTES, P. J.; SMIT, M. S.; HUGO, A. E JOSEPH, M.  
Acetate Enhances Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* When Grown on Sunflower Oil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 135-138, 2004.

VIGGIANO, A. et al. Pathway for the biosynthesis of the pigment chrysogine by *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, n. 4, 2018.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014.

VISAGIE, C. M. et al. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Tshwane, v. 31, p. 42, 2013.

WAITES, M. J.; MORGAN, N.L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. **Industrial Microbiology**, An Introduction. U.K: Blackwell Science Ltd; 2001.

WANG, J. Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 243– 245, 1998.

WANG, L. F.; WANG, Z. P.; LIU, X. Y.; Z.M. CHI, Z. M. Citric acid production from extract of Jerusalem artichoke tubers by the genetically engineered yeast *Yarrowia lipolytica* strain 30 and purification of citric acid. **Bioprocess and Biosystems Engineerin**, v. 36, p. 1759-1766, 2013.

WANG, L.; ZHUANG, W. Y. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. **BioSystems**, New York, v. 88, n. 1–2, p. 113–126, 2007.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 175-341, 2014.

YILMAZ, N. et al. Taxonomic re-evaluation of species in **Talaromyces** section *Islandici*, using a polyphasic approach. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Tshwane, v. 36, p. 37, 2016.

YOKOYA, F. Citric Acid **Production**. In: **Industrial Fermentation Series**, Campinas, SP, Brazil, p. 1–82, 1992.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1****APROVEITAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DO  
PROCESSAMENTO ÚMIDO DO CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE  
ÁCIDO CÍTRICO**

Maysa Costa Alves<sup>1</sup>, Giovanni Aleixo<sup>1</sup>, Sara Maria Chalfoun<sup>2</sup>, Luis Roberto Batista<sup>1</sup>, Carlos José Pimenta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

Corresponding authors

Maysa Costa Alves, Carlos José Pimenta

Laboratório de Análises Avançadas, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras

CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

Phone: +(55) 35 38294516/99950-2140, +(55) 35 38291438

Email: maysa-alves@hotmail.com, carlos\_pimenta@dca.ufla.

## ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of major economic importance in the Brazilian agribusiness. During the processing of grain residues are generated, which are arranged in inadequate forms on the environment. During the processing of grain residues are generated, which are arranged in shapes unsuitable environment. Basically, there are two forms of coffee processing, for dry and wet. Wet coffee processing generates large volumes of wastewater rich in organic and inorganic materials with high pollutant power, as well as a large amount of sedimentable solids, sugars, phenolic compounds, high chemical oxygen demand (COD) and biochemical demand oxygen (BOD). The objective of this work was to evaluate the production of citric acid by *Aspergillus* and *Penicillium* fungi in submerged fermentation using the wet processing wastewater as a fermentative medium in order to add value to this residue and to propose an alternative for this residue. reduction of the levels of organic matter present. Twenty acidity producing isolates were evaluated in medium containing coffee wastewater and in control medium. During fermentation, the sugar content, pH, mycelial weight and citric acid production were analyzed. As a result, it was found that the maximum yield of citric acid in coffee wastewater containing medium was 5,250 mgL<sup>-1</sup> and in the control medium it was 20,102 mgL<sup>-1</sup> after 196 h of fermentation for specie *Aspergillus niger* (A. niger 00194). Therefore, it is possible to use these agroindustrial residues for the production of citric acid. Of the genus *Penicillium*, the most citric acid producing species was *Penicillium citrinum*, which presented levels of 3,086 mgL<sup>-1</sup> in the wastewater medium and 12,584 mgL<sup>-1</sup> in the control medium, for the same fermentation time.

Keywords: Coffee wastewater. Fermentation. Citric acid. Filamentous fungi.

## 1 INTRODUÇÃO

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

O uso de subprodutos e resíduos agroindustriais como suporte na fermentação submersa é economicamente importante do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto causado sobre o meio ambiente, valoriza os subprodutos e resíduos agrícolas e agroindustriais (ANDRÉ et al., 2007)

Visando maior produtividade, baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado algumas alternativas de utilização dos resíduos da agroindústria, seleção de microrganismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos para a fermentação cítrica (BORRELLI et al., 2004).

O processamento via úmida gera um grande volume de água residuária oriunda do processo de descascamento dos grãos (CAMPOS et al., 2010). A água residuária é rica em sólidos suspensos totais e dissolvidos contendo uma grande variedade de compostos orgânicos, tais como açúcares, pectinas e compostos fenólicos. Uma vez que esse resíduo é rico em carboidratos e outros nutrientes, apresenta-se como uma alternativa para produção de ácido cítrico por fermentação submersa (FIA et al., 2010).

O ácido cítrico é o principal constituinte das frutas cítricas, atualmente um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Em virtude das suas características, é amplamente utilizado na indústria de alimentos (acidulante, flavorizante, antioxidante), na indústria farmacêutica (tamponante, sequestrante, quelante) e outros (DHILLON et al., 2011). Sua importância deve-se a características como baixa toxicidade, palatabilidade e ser facilmente assimilado pelo organismo.

Com o emprego de técnica de processos microbiológicos foi possível obter esse ácido reduzindo o custo de obtenção e possibilitando um grande aumento do uso em escala industrial (Lo Monaco, 2005). Muitos microorganismos desempenham papel importante na produção industrial de bebidas, produtos alimentícios, substâncias químicas, suplementos, antibióticos e biomassa. A principal razão para utilizar microorganismos na produção de compostos, os quais podem ser isolados de solos, plantas e animais, é a facilidade em seu melhoramento (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Com isso tem sido registrados aumentos de até mil vezes na produção de metabólitos de interesse biotecnológico (JALGAONWALA et al., 2011).

Uma aplicação considerável da microbiologia está na indústria biotecnológica em que os microorganismos são utilizados como fábricas para produção de proteínas, surfactantes, adoçantes e ácidos orgânicos, e, como um membro comum dos microorganismos encontrados, fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* exercer muitas funções na indústria da biotecnologia.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi utilizar a água residuária oriunda do processamento úmido do café para a produção de ácido cítrico por fungos do gênero *Aspergillus* e

Penicillium.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Água residuária do processamento úmido do café**

A água residuária do processamento úmido do café (*Coffea arábica* L.) utilizada no experimento foi obtida na Fazenda Experimental da EPAMIG, localizada na cidade de Três Pontas, Minas Gerais. Os grãos eram lavados e descascados/despulpados e a água residuária produzida era transportada semanalmente para um reservatório. O efluente foi coletado durante o descascamento dos grãos e armazenado diretamente em galões de 20 L previamente higienizados e secos. Posteriormente, o material foi transportado ao Laboratório de Análises Avançadas do Departamento de Ciência dos Alimentos e armazenado em freezer até o momento das análises.

### **2.2 Caracterização da água residuária do café**

A caracterização da água residuária utilizada no experimento foi realizada nos Laboratórios de Bioquímica e Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos-UFLA; Qualidade de Água do Departamento de Engenharia - UFLA em conformidade com as recomendações do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995) e de Análise Foliar do Departamento de Química – UFLA. As análises realizadas com seus respectivos métodos encontram-se listadas abaixo.

#### **2.2.1 Demanda bioquímica de oxigênio<sub>5</sub> (DBO 20°C)**

Obtida pela determinação do oxigênio dissolvido pelo método iodométrico (Processo Winkler) (APHA, 1995).

### **2.2.2 Demanda química de oxigênio (DQO)**

Determinada pelo método de oxidação química em refluxo aberto (APHA, 1995).

### **2.2.3 Sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SV) e sólidos dissolvidos (SD)**

Os ST foi medido gravimetricamente após secagem em estufa a 105°C e o conteúdo volátil após incineração em mufla a 550°C. Os SFT foram obtidos por diferença entre os ST e SVT (APHA, 1995).

### **2.2.4 Sólidos suspensos (SS)**

Determinados pelo método gravimétrico, com utilização de membranas de fibra de vidro com 0,45 µm de diâmetro de poro (APHA, 1995).

### **2.2.5 Compostos fenólicos (FenolT)**

Os fenóis totais foram determinados pelo método colorimétrico, com o uso do reagente Folin-Denis, sendo que o ácido tânico foi utilizado para construção da curva padrão (FOLIN & DENIS, 1912).

### **2.2.6 Nitrogênio**

Determinado pelo processo Kjeldahl com a adição do ácido salicílico (AOAC, 1995).

### **2.2.7 Macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) e Micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn)**

A determinação dos nutrientes foi realizada segundo metodologia proposta por Malavolta et al., (1997)

### **2.2.8 Acidez total**

Determinação pelo método volumétrico, seguindo-se a



metodologia descrita por Dilallo & Albertson (1961) modificada por RIPLEY et al. (1986).

### **2.2.9 Oxigênio Dissolvido**

Foi determinado segundo Standard Methods, methods 4500 (APHA, 1995). Este método consiste em fixar o oxigênio dissolvido da amostra por meio da adição das soluções de sulfato manganoso ( $MnSO_4$ ) e a solução álcali-iodeto-azida, que contém hidróxido de sódio (NaOH), iodeto de sódio (NaI) e azida sódica ( $NaN_3$ ).

### **2.2.10 pH**

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca Tecnal, modelo TEC-7 (TECNAL/BRASIL), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 conforme AOAC (1995).

### **2.2.11 Condutividade elétrica (CE)**

Quantificada em condutivímetro portátil (APHA, 1995).

### **2.2.12 Umidade**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com o emprego de calor, o qual se baseia na perda de peso do material quando submetido a aquecimento de  $105^{\circ}C$ , até atingir peso constante. Os resultados foram expressos em g/100 g (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

### **2.2.13 Proteína**

A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, conforme procedimento da AOAC (1995). Após a digestão da amostra com a mistura digestora (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e ácido sulfúrico, foi realizada destilação e posterior

titulação com solução de ácido clorídrico. Os resultados foram expressos em g/100 g.

#### **2.2.14 Extrato etéreo**

Para a obtenção do extrato etéreo, foi utilizado o método de Soxhlet (gravimétrico), baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter etílico, ou na quantidade de material solubilizado pelo solvente (AOAC, 1995).

#### **2.2.15 Cinzas**

O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado submetendo-se as amostras a 550°C. Os resultados foram expressos em g/100g (AOAC, 1995).

#### **2.2.16 Pectina total e pectina solúvel**

O doseamento de pectina total e solúvel foi realizado pelo método colorimétrico, por meio da condensação colorida por reação da pectina hidrolisada (ácido galacturônico) com o carbazol (Bitter & Muir, 1962).

#### **2.2.17 Açúcares Totais**

Foram determinados espectrofotometricamente, a 620 nm de acordo com o método de antrona proposto por Dische (1962).

### **2.3 Microorganismos**

Foram testados 143 isolados obtidos da Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos -UFLA e da Micoteca da EPAMIG-UFLA a fim de selecionar os melhores produtores de ácido cítrico através do meio Foster (FOSTER e DAVID, 1949).

## **2.4 Seleção dos isolados produtores de ácido cítrico**

Para a seleção dos isolados, foram realizados testes qualitativos. A escolha qualitativa foi realizada através de uma análise comparativa entre os isolados onde se fez uma comparação da relação entre o tamanho do halo de produção de ácido (halo amarelo) e do halo de crescimento da colônia em meio Foster (FOSTER e DAVID, 1949).

As placas contendo os esporos dos isolados foram incubadas durante 96 horas à 28 ° C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.4.1 Formação do halo de produção de ácido em meio Foster**

Este teste foi realizado através da observação de formação de halo de coloração amarela em meio Foster revelado pela degradação da glicose presente no meio e conseqüente abaixamento de pH, sendo obtidos resultados em placas.

## **2.5 Detecção da produção de ocratoxina A (OTA) e Citrinina por Cromatografia de Camada Delgada - CCD**

Para os testes do potencial micotoxigênico pelo método Plug Agar as espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção Nigri (para avaliação da OTA) foram inoculadas em meio CYA - Ágar Czapek: (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; Concentrado Czapek: 10,0 mL; Extrato de Levedura: 5,0 g, Ágar: 15,0 g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapek: NaNO<sub>3</sub>: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5,0 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g, Água Destilada: 100mL) por 7 dias a 25°C.

As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Talaromyces* (para avaliação da Citrinina) foram inoculadas em meio

YES - Ágar Extrato de Levedura Sacarose (Extrato de levedura: 20,0 g; Sacarose: 150 g; Ágar: 20,0 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25°C conforme Filtenborg e Frisvad (1980).

Foram retirados plugs contendo o fungo e o meio de cultura dos centros das placas de Petri e estes foram aplicados sobre as placas de cromatografia de camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) juntamente com 10 µL das soluções padrão de Ocratxina A e de Citrinina (SIGMA ALDRICH). Como fase móvel foi utilizado TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% nas proporções 60:30:10.

Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão: roxo para OTA e verde brilhante para Citrinina.

## **2.6 Composição do meio fermentativo**

### **2.6.1 Meio fermentativo com água residuária do café**

O meio utilizado no experimento para a fermentação submersa foi constituído de: Glicose: 50,0 gL<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1,0 gL<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,0 gL<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,23 gL<sup>-1</sup>; Peptona: 5,0 gL<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 5,0 gL<sup>-1</sup>. O pH inicial foi ajustado para 6,0 com solução concentrada de NaOH. (Adaptado do meio PRESCOTT & DUNN por PASTORE, 2011). O meio foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL na proporção de 100 mL por frasco.

### **2.6.2 Meio controle**

A fim de averiguar e comparar os futuros resultados do processo fermentativo da água residuária do café, utilizou-se um meio controle com os mesmos nutrientes do meio anterior [Glicose: 50,0 gL<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1,0 gL<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,0 gL<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,23 gL<sup>-1</sup>; Peptona: 5,0 gL<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 5,0 gL<sup>-1</sup>] e água destilada ao invés da água residuária. O pH inicial do meio controle também foi ajustado para 6 com solução concentrada de NaOH.

### **2.7 Descrição do experimento**

Para o meio controle e para o meio contendo água residuária do café, foram realizados os mesmos procedimentos e análises descritos a seguir. Após a esterilização, os meios (com água residuária e controle) foram resfriados, inoculados com 1,0 mL da suspensão com 10<sup>6</sup> esporos/mL e incubados a 30°C e 100 rpm em “shaker”.

Esse procedimento foi realizado a cada 48 h até o final de 192 h. A coleta dos fermentados ocorreu a cada 48h. Os ensaios foram feitos em triplicata para os isolados selecionados. Após o término do período de fermentação, o conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman previamente pesado. O papel de filtro contendo os esporos retidos foi utilizado para a determinação da massa de micélio produzida e o filtrado de cada frasco foi utilizado para a determinação do pH, ácido cítrico produzido e açúcar consumido.

### **2.8 Métodos analíticos**

#### **2.8.1 Quantificação do ácido cítrico**

O ácido cítrico produzido foi determinado pelo método

titulométrico com solução padrão de NaOH usando fenolftaleína 0,1% como indicador segundo técnica estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) e fundamentado no peso molecular do ácido cítrico.

### **2.8.2 pH**

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca Tecnal, modelo TEC-7 (TECNAL/BRASIL) conforme AOAC (2000).

### **2.8.3 Açúcar total**

Foram determinados espectrofotometricamente, a 620 nm de acordo com o método de antrona proposto por Dische (1962).

### **2.8.4 Peso micelial**

Os papéis com o micélio foram levados à estufa a 65 °C e pesados diariamente até atingirem peso constante. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso final e o peso do papel de filtro.

## **2.9 Análise estatística**

Os resultados da fermentação para meio com água residuária do café e para o controle foram submetidos ao teste Tukey com 5% de significância. Em seguida foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificação das relações entre as variáveis do processo de fermentação e determinação do melhor tempo, utilizando o software R.

Após observar as diferenças entres as médias dos dados obtidos, mapas auto organizáveis de Kohonen foram aplicdos para classificar as amostras em clusters, de acordo com a semelhança de suas propriedades. O programa Matlab R2015 foi utilizado em

conjunto com o pacote SOM Toolbox 2.1 (Vatanen et al. 2015), juntamente com as devidas modificações para aplicação dos índices de Davies-Bouldin e de Silhueta, a fim de melhorar a obtenção e a validação dos clusters.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização da água residuária do café

A composição química e físico-química está representada na Tabela 1.

**Tabela 1** Caracterização da água residuária do café

Análises	Valores
Umidade (%)	99,67 ± 0,01
Proteína(%)	0,37 ± 0,05
Cinza (%)	0,22 ± 0,008
Extrato etéreo (%)	ND
Pectina Total (mgL-1)	1290,00 ± 0,15
Pectina solúvel (mgL-1)	1020,00 ± 0,15
Açúcares totais (gL-1)	4,27 ± 0,12
pH	4,31 ± 0,03
Acidez total (mgL-1)	1480,00 ± 0,05
Turbidez(UT)	581,00 ± 0,05
CE (dSm-1)	4,69 ± 0,01
DQO <sub>T</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	4040,00 ± 0,03
DBO <sub>5</sub> <sup>20°C</sup> (mgL-1)	1800,00 ± 0,05
Sólidos Totais (mgL-1)	4083,00 ± 0,03
Sólidos Voláteis (mg L-1)	3213,00 ± 0,05
Sólidos suspensos (mg L-1)	968,00 ± 0,12
Sólidos dissolvidos (mg L-1)	3115,00 ± 0,15
Compostos fenólicos (mg L-1)	918,00 ± 0,03
Oxigênio Dissolvido (mgL-1)	7,70 ± 0,07
N (mg L-)	89,04 ± 0,05
P (mg L-)	45,35 ± 0,05
K (mg L-)	873,99 ± 0,05
Mg (mg L-1)	35,12 ± 0,04
Ca (mg L-1)	105,60 ± 0,05



S (mg L <sup>-1</sup> )	101,81 ± 0,09
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	0,37 ± 0,15
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	0,68 ± 0,12
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	0,27 ± 0,05
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	1,87 ± 0,04

O café cereja não possui altas concentrações de compostos ácidos, adstringentes e taninos no epicarpo, produzindo menor acidez. Ao contrário, os grãos verdes têm muito tanino e ligninas que liberados na água residuária do café aumentam a acidez drasticamente (Campos, Prado e Pereira, 2010). Desta forma, ao processar frutos não selecionados incluindo verdes, boias e cerejas, as águas residuárias geradas tendem a possuir acidez elevada.

O pH encontrado na água residuária do café de 4,31. Segundo (Campos, Prado e Pereira, 2010), valores baixos de pH são características próprias da água residuária, independente do processamento do fruto, pois estão relacionados com o aumento da concentração de H<sup>+</sup> presente nos compostos orgânicos da água residuária do café ocasionado pelo aumento do volume de frutos processados, bem como, em consequência do percentual de frutos verdes presentes, pela própria oxidação da matéria orgânica, atribuindo à água residuária do café um caráter corrosivo.

O alto valor de acidez de 1480 mgL<sup>-1</sup> justifica o baixo valor de pH observado.

Os sólidos totais (4083 mgL<sup>-1</sup>), sólidos voláteis (3213 mgL<sup>-1</sup>), sólidos suspensos (968 mgL<sup>-1</sup>) e sólidos dissolvidos (3115 mgL<sup>-1</sup>) encontrados estão dentro da faixa dos valores encontrados por FIA et al. (2007).

O alto valor de turbidez (581 mgL<sup>-1</sup>) é devido à presença de materiais sólidos em suspensão, que reduzem a sua transparência. Pode ser provocada

também pela oxidação da matéria orgânica presente e de outras substâncias como o zinco, ferro, manganês (BRASIL, 2005) e à presença de pigmentos da casca dos frutos cereja. A Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece que o valor máximo permitido é de 1,0 uT para água subterrânea desinfectada e água filtrada após tratamento completo ou filtração direta, e 5,0 uT como padrão de aceitação para consumo humano. Para água resultante de filtração lenta o valor máximo permitido é 2,0 uT.

Os elevados valores de DQO ( $4040 \text{ mgL}^{-1}$ ) e  $\text{DBO}_{520^{\circ}\text{C}}$  ( $1800 \text{ mgL}^{-1}$ ) encontrados estão bem acima dos valores permitidos para lançamento em corpos d'água classe 2 pela legislação CONAMA 357/2005, que é de  $180 \text{ mgL}^{-1}$  para DQO e  $60 \text{ mgL}^{-1}$  para DBO. Isso significa que se a água residuária do café fosse despejada em um curso hídrico, causaria grande problema de poluição, pois retiraria o oxigênio dissolvido da água, podendo provocar a mortandade de peixes e desequilíbrio da vida aquática.

O valor de proteína encontrado (0,37%) corresponde ao elevado valor de nitrogênio e é inferior ao encontrado por Campos, Prado e Pereira (2010) (0,44 % de proteína).

O teor de nitrogênio encontrado ( $89,04 \text{ mgL}^{-1}$ ) é inferior aos teores determinados por Soares et al. (2009) em diferentes unidades de processamento da região de Viçosa-MG.

O valor de nitrogênio determinado ( $89,04 \text{ mgL}^{-1}$ ) está acima de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  permitido pela legislação federal CONAMA 357/2005. Caso a água residuária do café fosse vertida em qualquer recurso hídrico, estimularia o crescimento de algas causando eutrofização.

Os valores determinados para a condutividade elétrica (CE) de  $4,69 \text{ dSm}^{-1}$  e compostos fenólicos de  $918 \text{ mgL}^{-1}$  para foram próximos aos valores determinados por Campos, Prado e Pereira (2010) que foi de  $4,9 \text{ dSm}^{-1}$  para a condutividade elétrica (CE) e de  $954,2 \text{ mgL}^{-1}$  para compostos fenólicos. Os valores elevados de condutividade elétrica (CE) estão relacionados com a presença de matéria orgânica, aos teores elevados de salinidade e sólidos totais dissolvidos.

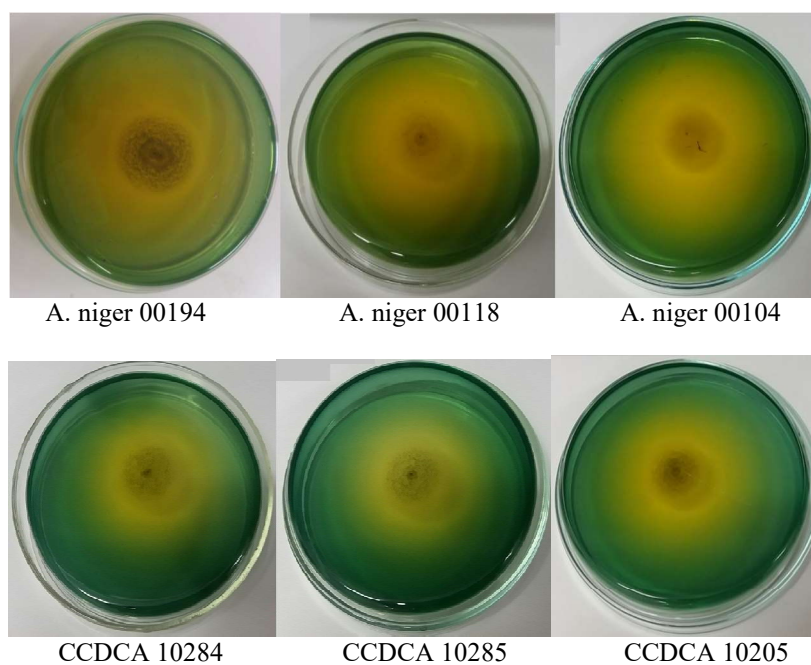
Verificou-se a presença considerável de compostos fenólicos ( $918 \text{ mgL}^{-1}$ ), na água residuária do café que ultrapassam a resolução CONAMA 357/2005, cuja concentração máxima é de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  para lançamento no meio ambiente. Esses compostos são considerados tóxicos, atuando como inibidores das atividades biológicas de microrganismos e de organismos vegetais e animais (plantas, peixes, crustáceos, etc.). Em excesso, podem ainda interferir no tratamento biológico das águas residuárias do café, tanto aeróbio como anaeróbio, inibindo as bactérias e outros microrganismos presentes (Lincoln e Zeiger, 2004).

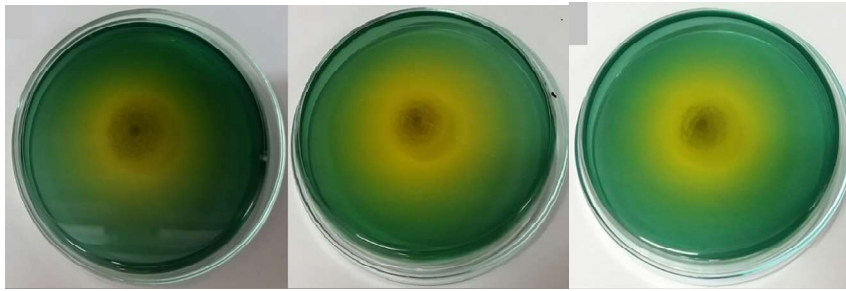
Os valores encontrados nas análises bromatológicas da água residuária do café: 99,67 % de umidade;  $1290 \text{ mgL}^{-1}$  de pectina total;  $1020 \text{ mgL}^{-1}$  de pectina solúvel e 4,27 % de açúcar total estão próximos aos teores encontrados por CAMPOS, PRADO e PEREIRA (2010) (97,32 % de umidade;  $1.315 \text{ mgL}^{-1}$  de pectina total;  $1.189 \text{ mgL}^{-1}$  de pectina solúvel e 4,47 % de açúcares totais. Essa composição demonstrando o elevado potencial poluidor da água residuária do processamento úmido do café.

### 3.2 Seleção dos isolados produtores de ácido cítrico

Após o período de 96 horas de incubação, foi observado a formação de um halo de coloração amarela ao redor da colônia, indicando a produção de ácido. Dos 143 isolados testados, 22 foram selecionados por apresentarem os maiores halos de acidez (halo amarelo) como mostrado na Figura 1.

**Figura 1** Produção de ácido em meio Foster & Davis.

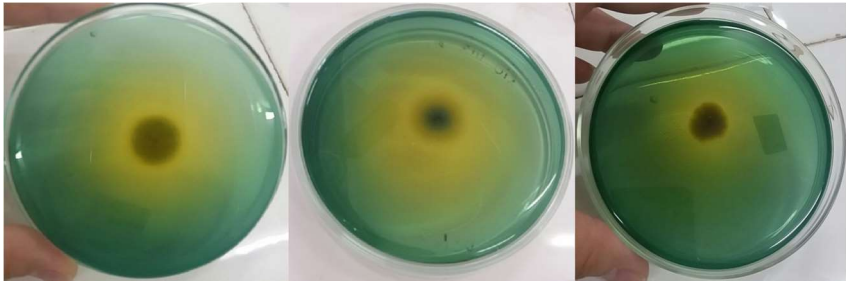




CCDCA 10283

CCDCA 10495

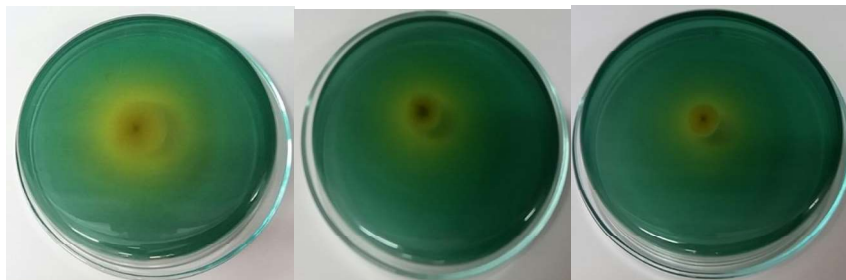
CCDCA 1035



CCDCA 11402.

CCDCA 11327

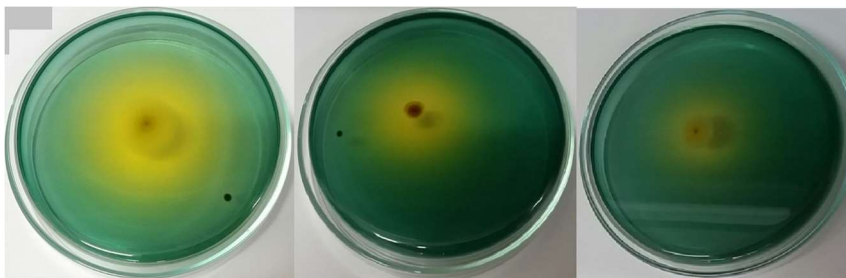
CCDCA11375



CCDCA 1065

CCDCA 11365

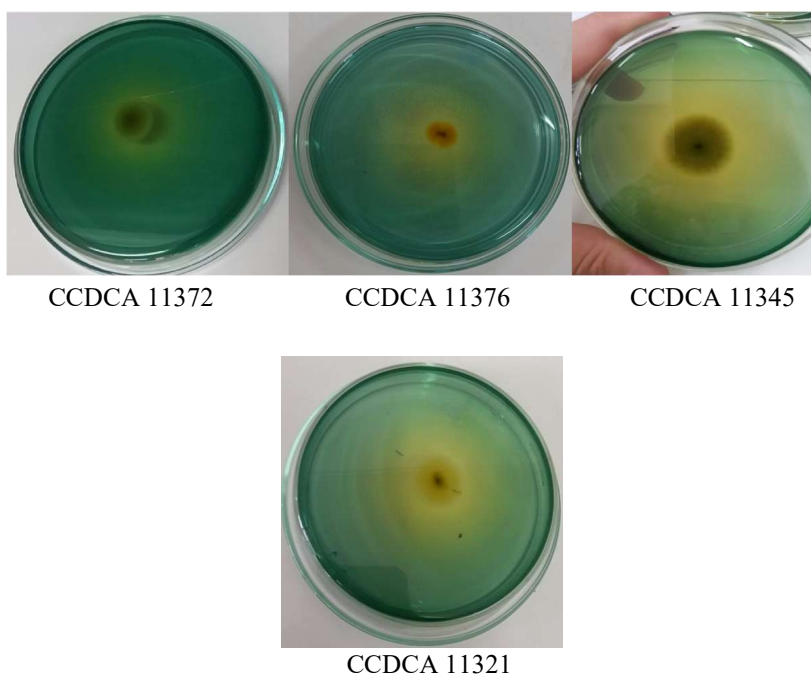
CCDCA 11362



CCDCA 1092

CCDCA 10232

CCDCA 11363



O meio Foster apresenta coloração inicial verde devido à presença do indicador de variação de pH, Verde de Bromocresol. Esse indicador muda de coloração de verde para amarelo devido ao abaixamento de pH causado pela degradação da glicose presente no meio com formação de ácido (RODRIGUES, 2006).

Após a medição com régua dos diâmetros das colônias e dos halos amarelos formados foi possível determinar o índice de acidez para cada isolado. O índice de acidez foi calculado através da relação entre o diâmetro do halo de formação de ácido (coloração amarela) e o diâmetro da colônia de crescimento do fungo como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2** Valores dos diâmetros dos halos de produção de ácido, das colônias de crescimento dos isolados e dos índices de acidez.

Isolados	Espécies	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice acidez (cm)
A. niger 00194	<i>Aspergillus niger</i>	8,567± 0,15	2,500 ± 0,10	3,427 ± 0,13
A. niger 00118	<i>Aspergillus niger</i>	8,033 ± 0,06	2,567 ± 0,06	3,130 ± 0,06
A. niger 00104	<i>Aspergillus niger</i>	8,600 ± 0,00	3,533 ± 0,06	2,434 ± 0,03
CCDCA 10284	<i>Aspergillus foetidus</i>	5,900 ± 0,10	3,167 ± 0,06	1,863 ± 0,08
CCDCA 10285	<i>Aspergillus foetidus</i>	6,000 ± 0,00	3,133 ± 0,11	1,915 ± 0,06
CCDCA 10205	<i>Aspergillus foetidus</i>	7,867 ± 0,06	3,500 ± 0,10	2,248 ± 0,08
CCDCA 10283	<i>Aspergillus foetidus</i>	5,567 ± 0,11	2,433 ± 1,24	2,288 ± 0,7
CCDCA 10495	<i>Aspergillus foetidus</i>	7,533 ± 0,15	2,200 ± 0,00	3,424 ± 0,07
CCDCA 1035	<i>Aspergillus niger</i>	7,600 ± 0,36	3,000 ± 0,00	2,533 ± 0,18
CCDCA 11402	<i>Penicillium biliariae</i>	4,433 ± 0,11	1,567 ± 0,11	2,830 ± 0,11
CCDCA 11327	<i>Penicillium wotroi</i>	6,300 ± 0,01	2,333 ± 0,06	2,821 ± 0,08
CCDCA11375	<i>T. sp.</i>	5,533 ± 0,06	2,400 ± 0,00	2,306 ± 0,03
CCDCA 1065	<i>Penicillium simplicissimum</i>	5,000 ± 0,00	2,067 ± 0,06	2,419 ± 0,03
CCDCA 11365	<i>Penicillium daleae</i>	4,833 ± 0,06	1,983 ± 0,01	2,437 ± 0,03
CCDCA 11362	<i>Penicillium lilacinoechi nulatam</i>	4,100 ± 0,17	1,633 ± 0,06	2,510 ± 0,11
CCDCA 1092	<i>Penicillium spinulosum</i>	4,850 ± 0,08	2,050 ± 0,07	2,366 ± 0,07
CCDCA 10232	<i>Penicillium citrinum</i>	4,833 ± 0,06	1,033 ± 0,11	4,677 ± 0,09
CCDCA 11363	<i>Talaromyces angelicus</i>	4,467 ± 0,25	2,20 ± 0,00	2,233 ± 0,13
CCDCA 11372	<i>Penicillium onobense</i>	5,500 ± 0,00	2,967 ± 0,06	1,685 ± 0,03
CCDCA 11376	<i>Penicillium sp.</i>	4,033 ± 0,25	1,633 ± 0,06	2,469 ± 0,16
CCDCA 11345	<i>Penicillium sp.</i>	5,500 ± 0,00	2,500 ± 0,01	2,200 ± 0,01
CCDCA 11321	<i>Penicillium sp.</i>	3,503 ± 0,1	1,393 ± 0,01	2,514 ± 0,01

Dentre os isolados do gênero *Aspergillus* (seção Nigri) os que apresentaram os maiores índices de acidez foram: *A. niger* 00194 (*Aspergillus niger*); *A. niger* 00118 (*Aspergillus niger*) e CCDCA 10495 (*Aspergillus foetidus*). Do gênero *Penicillium*, os maiores índices de acidez foram para CCDCA 11402 (*Penicillium biliae*); CCDCA 11327 (*Penicillium wotroi*) e CCDCA 10232 (*Penicillium citrinum*).

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados na produção de ácidos orgânicos. Atualmente, o fungo *Aspergillus niger* é o principal microorganismo empregado para a produção comercial de ácido cítrico (SIEBERT; SCHULZ, 1974). No gênero *Penicillium*, a espécie *Penicillium citrinum* é conhecida como produtora de ácido cítrico. Souza (2018) observou a produção de acidez em meio CREA (Creatina Sacarose ágar) para *Penicillium biliae*.

### **3.3 Potencial toxigênico dos isolados**

Os isolados selecionados no teste de acidez foram submetidos aos testes de toxicidade para as às micotoxinas: ocratoxina A (OTA) (Figura 2) e Citrinina (Figura 3).



**Figura 2** Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de ocratoxina A



P = Padrão de Ocratoxina A.

1 = *A. niger*; 2 = *A. foetidus*; 3 = *A.niger*; 4 = *A. foetidus*; 5 = *A. foetidus*; 6 = *A. niger*; 7 = *A. foetidus*; 8 = *A.niger*; 9 = *A. foetidus*; 10 = *P. biliae*; 11 = *Talaromyces sp.*

**Figura 3** Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de Citrinina



P=Padrão de Citrinina.

1 = *P. citrinum*; 2 = *P. wotroi*; 3 = *P. sp.*; 4 = *P. onobense*; 5 = *P. daleae*; 6 = *P. simplicissimum*; 7 = *P. sp.*; 8 = *Talaromyces angelicus*; 9 = *P. lilacinoechinulatum*; 10 = *P. sp.*; 11 = *P. spinulosum*

Dos isolados testados quanto à produção de Ocratoxina A, nenhuma espécie de foi detectada como produtora da micotoxina. A espécie *Talaromyces sp.* produziu outras substâncias luminescentes à luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm. Diante disso, a realização de testes bioquímicos pode auxiliar no esclarecimento destas substâncias e corresponder a novas fontes de compostos de interesse industrial.

Em relação à produção de Citrinina, a espécie *Penicillium citrinum* não foi produtora da micotoxina, no entanto produziu outras substâncias luminescentes à luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm. A espécie *Penicillium* sp. (10) foi descartada por apresentar uma banda verde paralela ao padrão de citrinina. O isolado de código CCDCA 11321 não possuiu a quantidade de esporos suficientes para o prosseguimento das etapas posteriores, por isso, foi descartado.

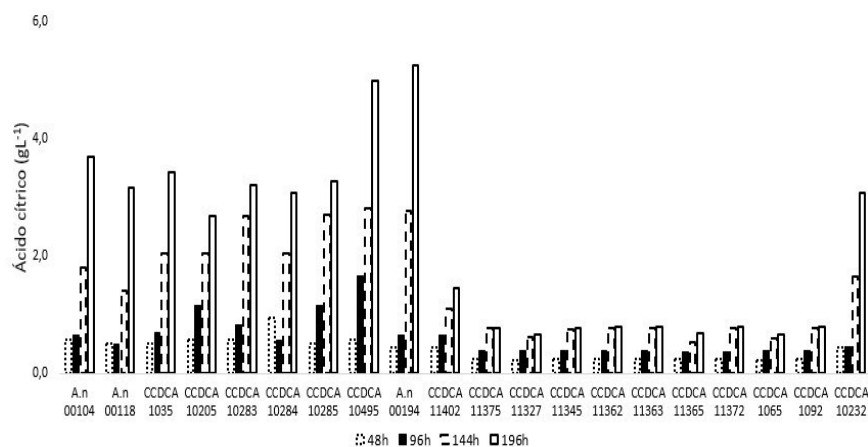
### 3.4 Processo fermentativo

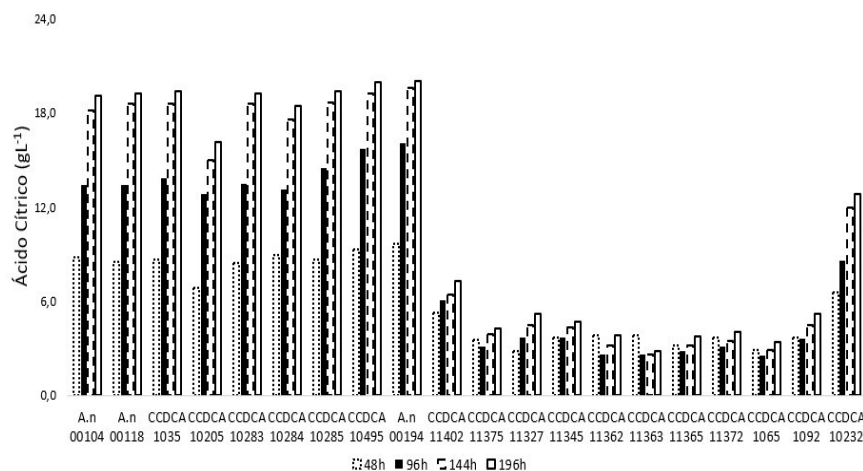
Para avaliar o comportamento de cada variável (pH, peso micelial, açúcar total e ácido cítrico) ao longo do processo fermentativo, elas foram agrupadas entre si para o meio com água residuária e para o controle, como mostram os gráficos a seguir.

#### 3.4.1 Ácido cítrico

A produção de ácido cítrico pelos isolados no meio com a água residuária do café e no meio controle é mostrada no Gráfico 1 e 2, respectivamente.

**Gráfico 1** Ácido cítrico ( $\text{gL}^{-1}$ ) para o meio com água residuária do café



**Gráfico 2** Ácido cítrico ( $\text{gL}^{-1}$ ) para o meio controle

No meio com a água residuária do café, a produção de ácido cítrico foi baixa para todos os isolados, sendo que os do gênero *Aspergillus* (seção *Nigri*) se sobressaíram em relação aos do gênero *Penicillium* e *Talaromyces* para ambos os meios fermentativos. Também foi observado que nos dois meios utilizados, vários fungos tiveram a produção semelhante de ácido cítrico.

A espécie *Aspergillus niger* (*A.niger* 00194) se destacou entre o restante dos isolados por apresentar a produção máxima de ácido cítrico de  $5,250 \text{ gL}^{-1}$  no tempo de 196 horas de fermentação.

Dos isolados do gênero *Penicillium*, as espécies *Penicillium biliae* (CCDCA 11402) e *Penicillium citrinum* (CCDCA 10232) foram as que mais produziram ácido cítrico, sendo que a última se destacou com produção máxima foi de  $3,086 \text{ gL}^{-1}$  para o mesmo tempo de fermentação.

Verificou-se no meio controle que a produção de ácido cítrico foi muito acima da encontrada para os mesmos isolados no meio com água residuária do café.

A baixa produtividade de ácido cítrico encontrada no meio com a água residuária do café pode ser explicada em razão dos componentes solúveis e insolúveis da polpa e da mucilagem que são transferidos para a água residuária (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005). Portanto essas águas são ricas em matéria orgânica,

contendo açúcares (frutose, glicose e galactose), proteínas, pectinas, celulose, hemicelulose, polifenóis (ácidos clorogênico e caféico), taninos e cafeína e pequenas quantidades de corantes naturais (antocianinas) (ZAMBRANO et al., 1999; DIAS et al., 2014).

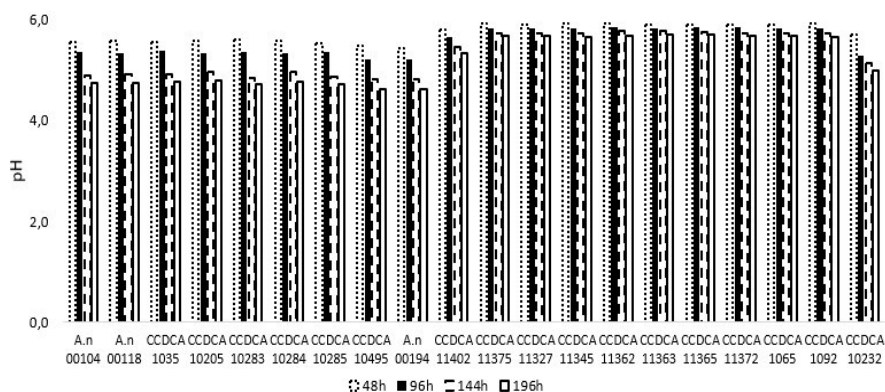
A presença desses compostos na água residuária aumenta consideravelmente as demandas química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio de modo que os valores encontrados para essas análises são superiores àqueles permitidos pela legislação ambiental. Os compostos fenólicos presentes são considerados tóxicos porque atuam inibindo as atividades de microrganismos, vegetais e animais. Além disso, as águas residuárias também apresentam uma salinidade de 2,56% (CAMPOS; PRADO; PEREIRA, 2010).

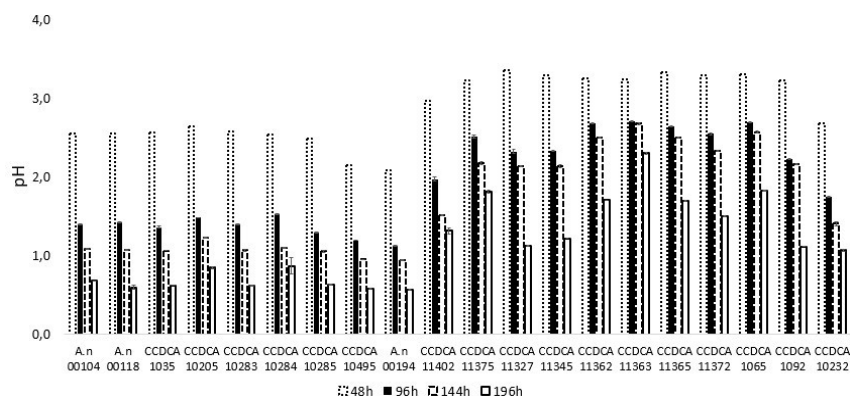
A produção de ácido cítrico utilizando resíduos agroindustriais como substrato para fermentação é uma solução para a redução da carga orgânica desses poluentes, além de agregar valor econômico pela geração de produto rentável.

### 3.4.2 pH

As variações dos valores do pH ao longo do processo estão representadas nos Gráficos 3 e 4 no meio com água residuária do café e no meio controle, respectivamente.

**Gráfico 3** pH para o meio contendo água residuária do café



**Gráfico 4** pH para o meio controle

Foi observado que houve uma diminuição dos valores de pH para todos os isolados em ambos os meios de fermentação. Segundo LEHNINGER et al. (1995) esse fato ocorre devido à produção de algumas moléculas ácidas pelos fungos quando cultivados na presença de meios contendo fontes de nitrogênio. De acordo com YOKOYA (1992), o pH de uma cultura pode variar em razão da atividade metabólica dos microrganismos. O motivo é a secreção de ácidos orgânicos que irão causar o abaixamento do pH.

O controle de pH pode ser crítico nos processos de fermentação (NAGEL et al., 1999), pois como consequência da degradação dos açúcares ou matéria orgânica presente no meio, ocorre a formação de ácidos orgânicos que baixam o pH, assim como o consumo de sais de amônio favorecendo o desenvolvimento fungico e o acúmulo do ácido cítrico. Isso justifica a redução do pH observada ao longo da fermentação.

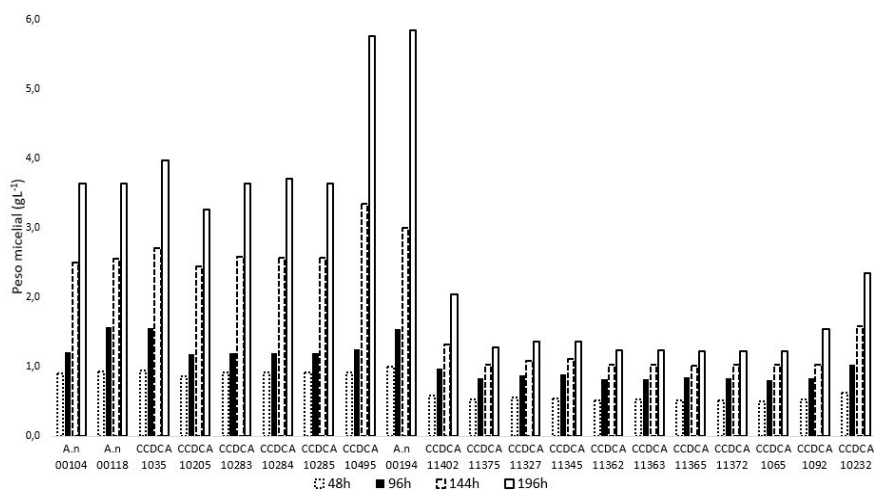
De forma geral, o decréscimo do pH foi mais pronunciado para as espécies do gênero *Aspergillus* (seção *Nigri*) em ambos os meios, pois esse gênero é um dos mais comuns e possui grande eficiência na degradação de compostos residuais de diversas indústrias, como corantes, resíduos com metais pesados e de refinarias de petróleo e tratamentos de solos contaminados (RAO; VIRARAGHAVAN, 2002; KOTSOU et al., 2004; SANTOS; LINARDI, 2004; FREITAS NETO et al., 2007).

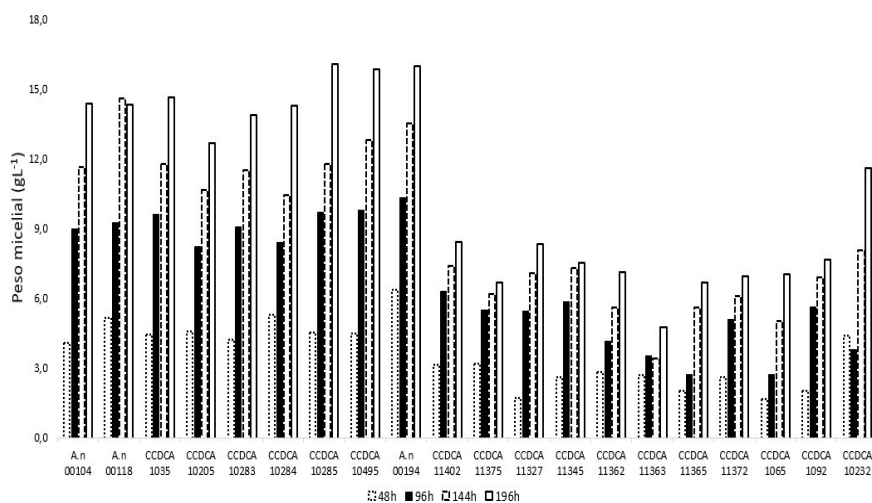
No meio controle houve uma queda mais pronunciada do pH, indicando uma maior assimilação dos nutrientes presente no meio e aumento da produção de ácidos pelos isolados, ao contrário do observado no meio com água residuária do café. Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos toleram amplas variações de pH. Os fungos filamentosos podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, entretanto algumas leveduras não toleram pH alcalino (PAPAGIANNI, 1995). O menor valor de pH determinado foi para o Isolado A.niger 00194 para 196 horas de fermentação.

### 3.4.3 Peso micelial

Os Gráficos 5 e 6 mostram a evolução do desenvolvimento de crescimento dos isolados no meio com água residuária do café e no meio controle, respectivamente.

**Gráfico 5** Peso micelial ( $\text{gL}^{-1}$ ) para o meio com água residuária do café



**Gráfico 6** Peso micelial ( $\text{gL}^{-1}$ ) para o meio controle

Foi observado que houve um aumento do peso micelial em ambos os meios ao longo da fermentação para todos os isolados, sendo que para os do gênero *Aspergillus*, os valores determinados foram superiores aos encontrados para os isolados do gênero *Penicillium* e *Talaromyces*.

O aumento do peso micelial está diretamente relacionado com o consumo de açúcar e à produção de ácido cítrico. Segundo Rodrigues (2006), a concentração de nitrogênio está ligada à produção de uma certa concentração de biomassa, para garantir a produção de ácido cítrico e manutenção do fungo.

Das várias formas de nitrogênio encontradas na natureza, os microorganismos assimilam mais facilmente a amônia. Dependendo da espécie do fungo, o nitrogênio pode ser obtido nas formas de nitrato, nitrito, amônia ou nitrogênio orgânico. PUTZKE (2002) relatou que a maioria dos fungos usa nitrato que é reduzido a nitrito com mediação da enzima nitrato redutase e depois à amônia. A determinação da fonte de nitrogênio é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microorganismos.

Outro fator importante para o crescimento microbiano é a atividade de água. Em trabalho desenvolvido por CASTRO et al. (2002), maiores produções de biomassa foram observadas quando valores de atividade de água mais altos foram utilizados.

A aeração do meio também estimula o crescimento e, portanto, a esporulação. Sendo assim, quanto maior o crescimento, maior a esporulação. De acordo com RAIMBAULT (1997), a biomassa celular pode ser estimada indiretamente através de medidas metabólicas. O consumo de  $O_2$  e a produção de  $CO_2$  são resultado da respiração do fungo e estão associadas ao crescimento).

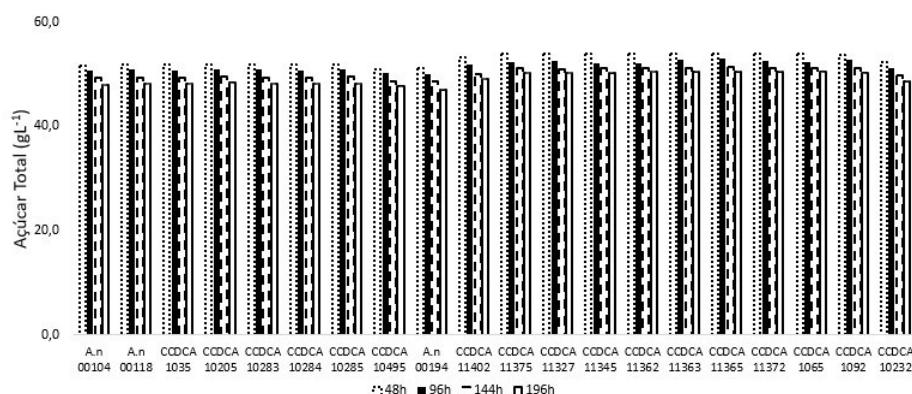
No meio com água residuária do café, o crescimento microbiano foi baixo, o que pode ser explicado pela presença de compostos orgânicos tóxicos como os fenólicos já mencionados que prejudicam o desenvolvimento.

No presente estudo, a maior formação de peso micelial foi para o tempo de 196 horas de fermentação para ambos os meios. Esses resultados estão de acordo com a maior produção de ácido encontrada para o mesmo tempo fermentativo.

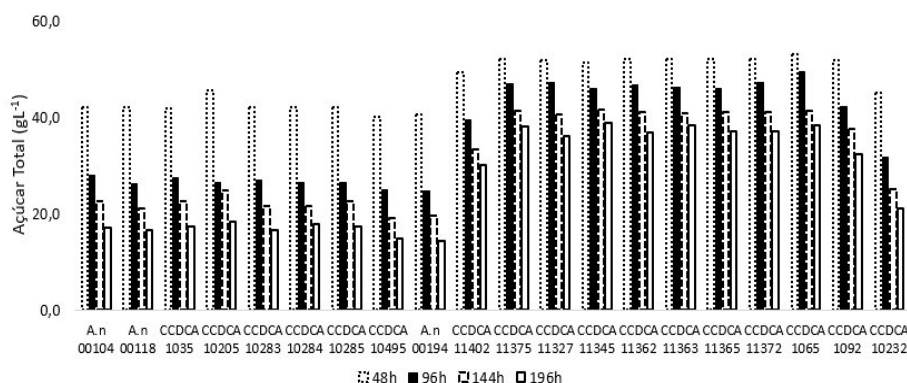
### 3.4.4 Açúcar total

Os Gráficos 7 e 8 mostram o consumo de açúcares pelos isolados durante a fermentação no meio com água residuária do café e no meio controle, respectivamente.

**Gráfico 7** Açúcar total ( $gL^{-1}$ ) para o meio com água residuária do café





**Gráfico 8** Açúcar total ( $\text{gL}^{-1}$ ) para o meio controle

No meio com água residuária do café, o consumo de açúcares pelos isolados foi baixo, em decorrência do pequeno microbiano, gerando como consequência, pequenas concentrações de ácido cítrico. As espécies do gênero *Aspergillus* tiveram um consumo relativamente superior ao dos isolados do gênero *Penicillium* e *Talaromyces*.

No meio controle, foi observado que os açúcares foram rapidamente metabolizados pelos isolados. Todas as espécies do gênero *Aspergillus* consumiram significativamente os açúcares presentes e dentre os isolados do gênero *Penicillium*, CCDCA 10232 e CCDCA 11402 foram os que apresentaram o maior consumo. Esses resultados corroboram com os baixos valores de pH encontrados, aumento do crescimento microbiano e aumento da produção de ácido cítrico.

Fontes de carboidrato são necessárias para a produção de ácido cítrico, sendo que a presença de carboidrato prontamente metabolizável (como a glicose utilizada no presente estudo) é essencial para uma boa produção de ácido cítrico. A maltose, sacarose, manose, glicose e frutose são os açúcares mais apropriados para a produção de ácido.

A concentração de açúcares afeta significativamente a produção de ácido cítrico, sendo que a taxa de produção máxima é usualmente obtida entre 14-22% de açúcar (PAPAGIANNI et al., 1999). A faixa ótima de concentração de açúcar encontra-se entre

10-14%, de acordo com Xu et al. (1989).

Após o período de fermentação, foi realizada a correlação de Pearson para avaliar em qual tempo houve maior relação entre as variáveis estudadas, resultando no melhor rendimento. A correlação foi avaliada tanto para o meio contendo água residuária de café como no meio controle como mostra a Tabela 3.



Segundo Nair et al. (2005), o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) é utilizado para verificar relações lineares entre variáveis. Dessa forma, a correlação é determinada pelos intervalos dos coeficientes (-1, 1), sendo que o coeficiente positivo infere que as variáveis variam juntas no mesmo sentido, logo a medida que uma aumenta a outra também concomitantemente, enquanto que o coeficiente negativo indica que elas variam em sentido contrário, ou seja, quanto maior uma variável, menor a outra.

Partindo desse pressuposto e com base na Tabela 3 pode-se inferir que os coeficientes de correlação ( $r$ ) entre o peso micelial e a produção de ácido cítrico e entre o teor de açúcar total e o pH foram positivos, os quais variaram de 0,813 a 0,986 para 48h – meio ARC e 196h – meio controle, respectivamente e 0,892 e 988 para 196h - meio controle e 48h - meio ARC, respectivamente.

Os demais coeficientes de correlação expostos na tabela foram negativos para ambos os meios analisados, os quais foram superiores a - 0,60. De acordo com Dancey e Reidy (2006), a magnitude dos coeficientes em módulo de 0,10 até 0,30 é classificado como fraco; de 0,40 até 0,60 como moderado e de 0,70 até 1,00 como forte. Portanto, todos os coeficientes de correlação positivos e negativos do presente estudo podem ser considerados com magnitude entre moderado e forte, levando em consideração que todos os coeficientes foram superiores a 0,60 e - 0,60, respectivamente, além das correlações terem apresentado significância com  $p < 0,05$ , ou seja, as variáveis estão linearmente fortemente correlacionadas umas às outras.

Pelo exposto acima, à medida que aumentou o tempo de fermentação, mais forte foi o coeficiente de correlação, então foi selecionado o tempo de 196h para ambos os meios analisados, tendo em vista que os resultados do presente estudo indicaram que as variáveis correlacionadas estão fortemente relacionadas umas às outras, então espera-se que o rendimento nesse tempo seja melhor.

Portando, as próximas análises estatísticas foram realizadas utilizando os dados referente ao tempo de 196h de fermentação.

Os resultados obtidos para o peso micelial, ácido cítrico, pH e açúcar total foram utilizados na obtenção de um mapa auto-organizável de Kohonen, um tipo de Rede Neural Artificial. Mapas com diferentes dimensões foram gerados a fim de obter o arranjo que possui os melhores índices de validação de clusters (índice de Davies-Bouldin e de Silhueta), juntamente com menores erros de medição (quantização, topográfico e combinado).

O índice de Davies-Bouldin representa o grau de similaridade entre os clusters, independentemente do número de clusters e o método de partição utilizado. Quanto mais próximo de zero, melhor a partição dos dados. O índice de silhueta define a qualidade do grupamento baseado na proximidade entre os objetos de um certo grupo e a proximidade desses objetos com o grupo mais próximo. Logo, quanto mais próximo de 1 o valor desse índice, mais efetivo será o agrupamento realizado (Davies & Bouldin, 1979; Moreira et al., 2019; Pearce, Shaar, & Crosbie, 1977).

Partindo desse pressuposto, a rede escolhida foi a hexagonal 14x8, que teve o índice de Davies-Bouldin igual a 0.387 e de Silhueta igual a 0.853. Além disso, o mapa escolhido teve o erro de quantização de 0.017, erro topográfico de 0.100 e erro combinado de

0.040, que são medidas de acurácia, continuidade e as duas medidas combinadas, respectivamente (Serrien, Goossens & Baeyens, 2017). De acordo com Silva et al., (2019) quanto mais próximos de zero, melhores são os erros de medidas, apesar de não terem um valor padrão.

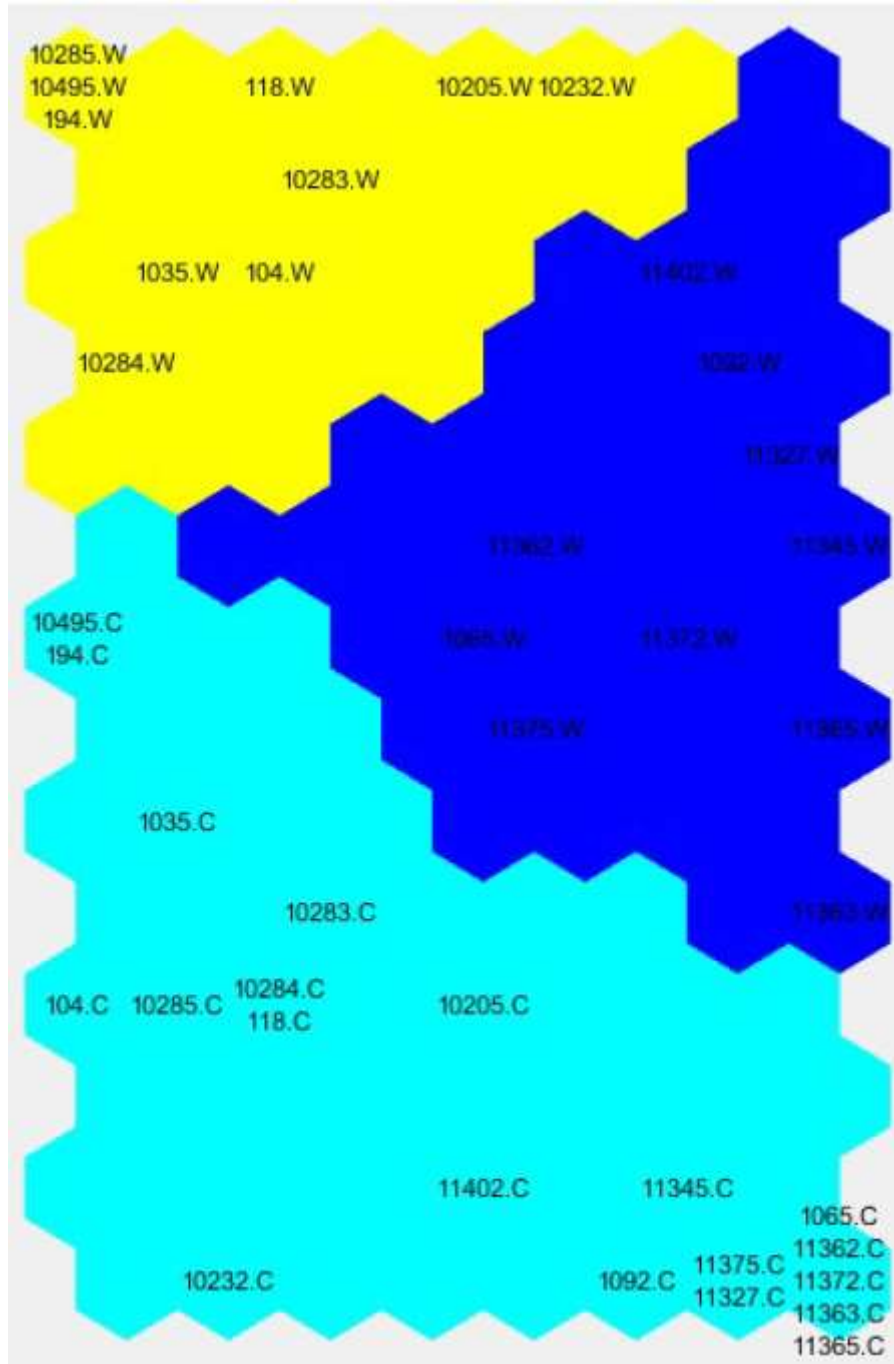
O mapa neural bidimensional de agrupamento (ou mapa topológico da rede) e os mapas de componentes das análises descritas foram apresentados na Figura 4 para melhor visualização da distribuição da amostra e formação dos grupos de acordo com as similaridades para as 20 amostras de fungos e os 2 meios de cultura, totalizando 40 amostras. A variação dos resultados obtidos nas determinações analíticas pode ser observada pelo gradiente de cor (extremidade direita do mapa).

Considerando que cada hexágono representa um neurônio no mapa e cada amostra é representada por um neurônio, foi possível analisar o mapa neural bidimensional de agrupamento (Figura 4) e notar a divisão das amostras em três grupos.

Na parte superior esquerda do mapa, encontra-se um agrupamento constituído pelos fungos do gênero *Aspergillus* e o isolado CCDCA 10232 do gênero *Penicillium* cultivados em meio controle, as quais encontram-se próximos por apresentarem maiores semelhanças entre si em relação as análises realizadas. No outro agrupamento, localizado na parte superior direita do mapa, encontram-se os demais fungos do gênero *Penicillium* e cultivados em meio controle. Apesar de estarem mais distribuídas entre os hexágonos, estas apresentam semelhanças entre si, indicadas pelo agrupamento realizado.

Já as amostras de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e *Talaromyces* cultivados no meio de café encontram-se no mesmo agrupamento localizado na parte inferior do mapa, entretanto, observa-se uma subdivisão das amostras em 2 grupos, um localizado na parte superior e um na parte inferior do agrupamento.

**Figura 4** Mapa bidimensional de agrupamento



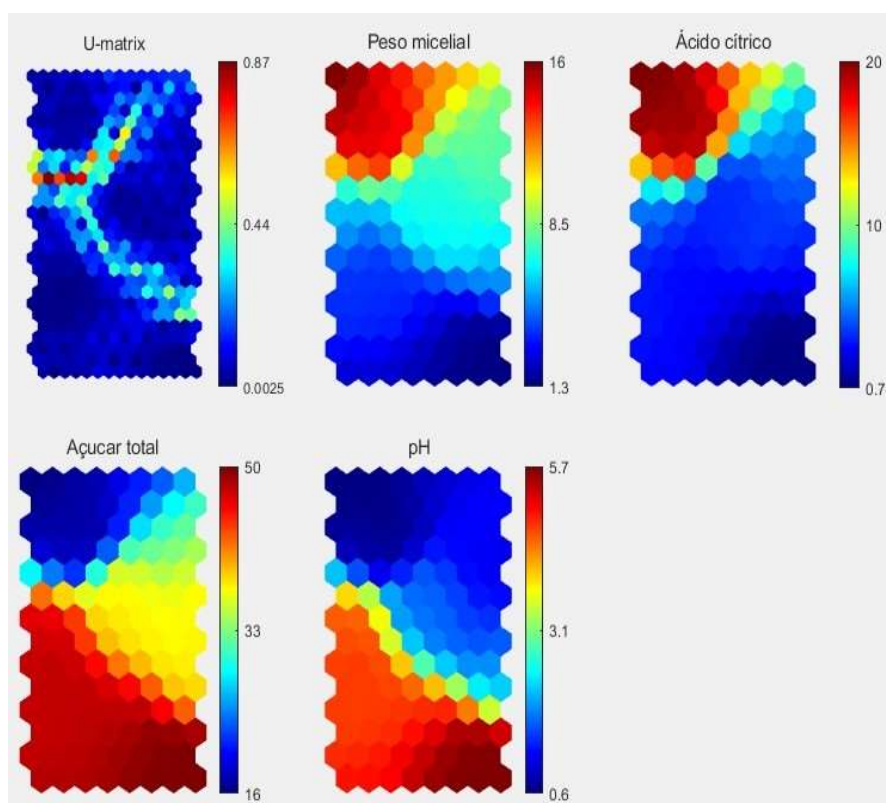
**Legenda:** W = Meio controle, C = meio com água residuária do café



Esses dois grupos estão relacionados as amostras dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* respectivamente, que apresentaram diferença nos resultados das análises realizadas, conforme observado no teste média realizado.

Os mapas de componentes para cada análise realizada e a matriz U estão representados na Figura 5.

**Figura 5** Mapas de componentes para cada análise realizada e a matriz U



A partir do plano de componente do Peso micelial pode-se inferir que as amostras que se encontram na parte superior esquerda do mapa (fungos do gênero *Aspergillus* e o fungo CCDCA 10232 do gênero *Penicillium* cultivados em meio controle) apresentaram maiores valores de peso micelial.

Valores intermediários foram observados no agrupamento superior direito (demais fungos do gênero *Penicillium* e do gênero *Talaromyces* cultivados em meio controle) e menores valores de peso micelial foram observados no agrupamento inferior (fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e *Talaromyces* cultivados no meio de café), sendo que quanto mais inferior a posição no mapa de componente, referente a subdivisão de gêneros de fungos, menor o peso micelial.

O mapa de componentes relativos à análise de ácido cítrico mostrou que o agrupamento superior esquerdo possui maiores valores, enquanto o agrupamento superior direito e a subdivisão superior do agrupamento inferior possuem valores menores, mas semelhantes. Já a subdivisão inferior do último agrupamento possui os menores valores para ácido cítrico.

O mapa de componentes para açúcar total mostrou comportamento inverso ao mapa de componentes do peso micelial, onde o agrupamento superior esquerdo possui menores valores para açúcar total, o agrupamento superior direito, valores intermediários e o agrupamento inferior, valores superiores para açúcar total, sendo que as amostras localizadas na subdivisão inferior, os maiores valores.

Já o plano de componente referente aos resultados de pH mostrou que os agrupamentos superiores possuem os menores valores de pH, sendo que o superior esquerdo possui amostras com pH próximo a 0,6. Já o agrupamento inferior possui valores superiores de pH, com a subdivisão inferior possuindo amostras com os maiores valores observados.

Os resultados obtidos com o mapa auto-organizável de Kohonen (Figura 4 e 5), corroboram com os dados anteriormente discutidos (teste de média), além de demonstrar a aplicabilidade deste tipo de rede neural artificial para descrever e agrupar amostras de acordo com suas similaridades, de forma mais intuitiva e visual quando comparado com outros métodos estatísticos convencionais, conforme citado por Novaes et al., (2017).

#### 4 CONCLUSÕES

A água residuária oriunda do processamento via úmida demonstrou ser um substrato adequado para o processo fermentativo de produção de compostos de valor agregado como o ácido cítrico, embora foi observado baixo rendimento de produção.

As espécies *Aspergillus niger* (A. niger 00194) e *Penicillium citrinum* (CCDCA 10232) apresentaram os melhores desempenhos fermentativos para o meio contendo água residuária do café e para o meio controle.

Os teores de ácido cítrico encontrados para A. niger 00194 foram de (5,250 gL<sup>-1</sup> e 20,102 gL<sup>-1</sup>) para o meio com água residuária e controle, respectivamente. Para o isolado CCDCA 10232, os valores de ácido cítrico encontrados foram de (2,347 gL<sup>-1</sup> e 12,584 gL<sup>-1</sup>) para o meio com água residuária e controle, respectivamente. O melhor tempo de fermentação foi 196 horas para ambos os meios e isolados.

A espécie *Penicillium biliae* (CCDCA 11402) produziu ácido cítrico em concentrações próximas às encontradas para *Penicillium citrinum* (CCDCA 10232).

Este estudo mostrou uma alternativa para a obtenção de ácido cítrico a partir de resíduo oriundo do processamento úmido do café.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, F.; ANDREAS, A.; STEPHAN, M. & GEROLD, B. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1409–1417, 2007.

ANGUMEENAL, A.; VENKAPPAYYA, D. (2013) An overview of citric acid production. **Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 367-370.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.

APHA (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Edition, **American Public Health Association Inc.**, New York.

ARMILIATO, L. **Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095**. 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BITTER, T.; MUIR, H.M.A. modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v.34, n.4, p.330-334, 1962.

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

BORRELLI, R. C. et al. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1338-1343, Feb. 2004.

BRASIL. **Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357, 17/03/05 (2005)**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de águas e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, M. A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físicoquímica, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, jul-ago, 2010.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Estabelece as condições de lançamento de efluentes, e da outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Acesso em: 14 de jul. 2008.

CONAMA. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispondo sobre as condições, parâmetros, padrões e diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução Nº 357 de 18 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 mai. 2011. Seção 1, p. 58-63. Acesso em: 23 de jun 2019.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de Aspergillus niger quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, MG. 2011.

DANCEY, Christine & REIDY, John. (2006), **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 505–529, 2011.

DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Org.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2014. Cap. 15, p. 376-382.

DILALLO, R., ALBERTON O.E. Volatile acids by direct titration. **Journal of water pollution control federation**, v. 33, n.4, p. 356-356. 1961.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Eds.).

**Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. v. 1, p. 477-512.

Dorouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi, A., Rajabi, R. Citric acid production: Surface culture versus submerged culture. **African Journal of Microbiology Research** v.3, n.9, p. 541-545, 2009.

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

Fia, R.; Matos, A. T.; Luiz, F. A. R.; Pereira, P. A. Coeficientes de degradação da matéria orgânica de água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeeiro em condições anóxica e aeróbia. **Engenharia na Agricultura**, v.15, n.1, p. 45-54, 2007.

Fia, F. R .L.; Borges, A. C.; Matos, A. T.; Duarte, I. C. S.; Fia, R.; Campos, L. C. Development of biofilm in anaerobic reactors treating wastewater from coffee grain processing. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.2, p.210-217, 2010.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

Folin, O.; Denis, W.; *J. Biol. Chem.* **1912**, 12, 239

FOSTER, J. W. **Chemical Activities of Fungi**. Academic Press, New York, 1949.

FREITAS NETO, M. A.; FELIX, J. P. L.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C.;SANTAELLA, S. T. Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos. **Revista Tecnologia**. v. 25, n. 1, p. 85-96. 2007.

Instituto Adolfo Lutz; **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 1985, p. 21.

JALGAONWALA, R.B. et al. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n.2, p.21-32, 2011.

Jernejc K, Cimerman A, Perdih A (1982) Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. **Eur J Appl Microbiol Biotechnol** 14:29–33

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

KOTSOU, M.; KYRIACOU, A.; LASARIDI, K.; PILIDIS, G. Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater. **Process Biochemistry**. v. 39, n. 11, p. 1653-1660. 2004.

LINCOLN, T. ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 720.

LO MONACO, P. A. **Fertirrigação do cafeeiro com águas residuárias da lavagem e despolpa de seus frutos**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

MAGALHAES, Nathália et al. **Citric acid production by *Aspergillus niger* AN 400 from agroindustry waste**. *Eng. Sanit. Ambient.* [online]. 2019, vol.24, n.1, pp.101-107. Epub Apr 25, 2019. ISSN 1413 4152.

MALAVOLTA, E.; MOREIRA, A. Nutrição e adubação do cafeeiro adensado. **Piracicaba: Informações Agronômicas**, n. 80, p. 1-7, dez. 1997. (Encarte técnico).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MATOS, A. T.; CABANELLAS, C. F. G.; BRASIL, M. S. Ensaio de sedimentação em água utilizada no descascamento/despolpa de frutos do cafeeiro. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 14, n. 3, p. 148-155, jul./set. 2006.

MORELI, A. P. **Avaliação de um sistema de remoção de sólidos para maximização do uso da água no processamento dos frutos do cafeeiro**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias, Alegre, 2010.

NAGEL, F. J. I., TRAMPER, J, BAKKER, M. S. N., RINZEMA, A. Temperature Control In A Continuously Mixed Bioreactor For Solid-State Fermentation, **Biotechnology And Bioengineering**, vol. 72, January 20, 2001.

NAIR, A.; ABDALLA, G.; MEHMED, I.; PREMKUMAR, K. (2005) Physicochemical parameters and correlation coefficient of ground waters of north-east Libiya. **Pollution Research**, v. 24, p. 1-6.

PASTORE, Neivair Sponchiado. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manípueira como substrato**. 67 p. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Pastore, N.S.; Hasan, S.M.; Zempulski, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3. p. 149-159, 2011.

PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. **Industrial microbiology**. 3.ed. New York: Mc Graw- Hill Book, 1959. 368p.

PREZOTTI, L. C.; ROCHA, A. A.; SOARES, S. F.; GUARÇONI, A.; MORELI, A. P. Águas residuárias da despolpa de frutos de café como fonte de matéria orgânica e nutrientes na agricultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS. **Anais...** Vitória: Incaper, 2009. (Incaper. Documentos, CD-ROM 012).



PREZOTTI, L. C.; MORELI, A. P.; SOARES, S. F.; ROCHA, A. C. Teores de nutrientes nas águas residuárias do café e características químicas do solo após sua aplicação. Vitória, ES: **Incapar**, 2012. 24p. (Incapar documentos 208).

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. 6ª ed. v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

Raimbault, M., Roussos, S. and Lonsane, B. K. (1997) **Solid state fermentation at ORSTOM: History, evolution and perspectives**. In *Advances in solid substrate fermentation*, Kluwer Acad. Pub

RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 165-171. 2002.

RIGUEIRA, R. J. A. et al. Caracterização da qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes condições de secagem e armazenagem. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 15, n. 2, p. 151-167, abr./jun. 2007

RIGUEIRA, R. J. A.; LACERDA FILHO, A. F.; MATOS, A. T. Alteração nas características físicas, químicas e bioquímicas da água no processo de lavagem, despolpa e desmucilagem de frutos do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4, 2005, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa-Café, 2005. CDROM.

RIGUEIRA, R. J. A.; LACERDA FILHO, A. F.; MATOS, A. T.; DONZELES, S. M. L.; PALACIN, J. J. F. Alterações nas características físicas, químicas e bioquímicas da água no processo de lavagem, despolpa e desmucilagem do cafeeiro. **Revista Engenharia na Agricultura. Boletim Técnico**, 18. Viçosa, MG, v. 18, n. 2, Março/Abril, p. 131-139, 2010.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of water pollution control federation**, v. 58, n.5, p. 406-411. 1986.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, p 1 – 107, 2006.

SANTOS, R. da S. (2005) **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator.** 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - **identification and degradation potential.** *Process Biochemistry*, v. 39, n. 12, p. 1001-1006, 2004.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. *Ecological Engineering*, New York, v. 36, n. 12, p. 1686-1690, Dec. 2010.

SIEBERT, D. & SCHULZ, G. Citric acid production by fermentation. In: **INTERNATIONAL MICROBIOLOGICAL FOOD INDUSTRY CONGRESS**, v.2, Paris, p.55-71, 1979.

SOARES, S. F.; SOARES, V. F.; SOARES, G. F.; ROCHA, A. C.; MORELI, A. P.; PREZOTTI, L. C. Destinação da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. **Café conilon.** Vitória: Incaper, p. 519-529, 2007a.

SOARES, G. F.; SOARES, V. F.; SOARES, S. F.; DONZELES, S. M. L.; MORELI, A. P.; ROCHA, A. C.; PREZOTTI, L. C. Efeito da água residuária do café em plantas de milho. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...**Brasília, Embrapa Café, 2007b.

SOARES, S. F.; DONZELES, S. M. L.; MORELI, A. P.; ROCHA, A. C.; PREZOTTI, L. C.;

SOARES, G. F.; SOARES, V. F. **Água residuária do café: geração e aproveitamento.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 4 p. (Circular Técnica, 30).

SOARES, S. F.; DONZELES, S. M. L.; SOARES, G. F.; MORELI, A. P. Utilização da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro em alface. In: **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Vitória-ES: Embrapa/café, 2009. 1 CD-ROM.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. **New Perspectives for Citric Acid Production and Application**. Food Technol. Biotechnol., v. 44 (2) 141–149. 2006.

Vatanen, Tommi, et al. "Self-organization and missing values in SOM and GTM." **Neurocomputing** 147 (2015): 60-70.

YOKOYA, F. **Citric Acid Production**. In: Industrial Fermentation Series, Campinas, SP, Brazil, p. 1–82, 1992.

ZAMBRANO, D. et al. Tratamiento de aguas residuales del lavado del café. **Boletín Técnico Cenicafé**, Colombia, n. 20, p. 1-26, June 1999.

**TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2****DEGRADAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA PRESENTE NA ÁGUA  
RESIDUÁRIA DO CAFÉ UTILIZANDO MICRORGANISMOS**

Maysa Costa Alves<sup>1</sup>, Giovanni Aleixo<sup>1</sup>, Sara Maria Chalfoun<sup>2</sup>, Luis  
Roberto Batista<sup>1</sup>, Carlos José Pimenta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de  
Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA CEP  
37200-000, Lavras, MG, Brasil

Corresponding authors

Maysa Costa Alves, Carlos José Pimenta

Laboratório de Análises Avançadas, Departamento de Ciência dos  
Alimentos, Universidade Federal de Lavras

CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

Phone: +(55) 35 38294516/99950-2140, +(55) 35 38291438

Email: maysa-alves@hotmail.com, carlos\_pimenta@dca.ufla.

## ABSTRACT

Wet grain processing reduces drying costs and improves beverage quality and generates large volumes of solid and liquid wastes rich in organic and inorganic material that, if discarded in the untreated environment, can cause flora and fauna destruction and compromise water quality and soil quality. The main effect of organic pollution on a water-receiving body is a decrease in dissolved oxygen concentration, as aerobic bacteria use dissolved oxygen in the medium to effect their metabolic processes, making it possible to degrade the released organic material in the medium. With the scientific recognition of the ability of microorganisms of degrading compounds these organisms were used to over time in biological treatment processes wastewater and solid waste. Expiration of this capacity, biotechnological processes were developed, among which pollutant degradation, mineral leaching, oil well purification and recovery from contaminated sites - soil, surface water and underground. Such microorganisms may be found in the impacted environment itself. Most often responsible for the disappearance of contaminants. The initial BOD, COD and total pectin values found in the wastewater were (10040; 9800; 2520 mgL<sup>-1</sup>; respectively). Isolates of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were evaluated and it was observed that after 196h of fermentation, the species *Aspergillus niger* (*A. niger* 00194) presented the largest reduction of BOD and DQO values which were (8655,00; 9156,30 mgL<sup>-1</sup>, respectively). Thus, a preliminary step in the treatment of coffee effluents would be the use of this isolate in the degradation of current organic matter.

Keywords: Coffee wastewater. Organic matter. Filamentous fungi. *Aspergillus niger*.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cafezais de forma adequada, por si só, não garante a obtenção de produto de boa qualidade e hoje se sabe que cuidados na colheita e no processamento dos frutos devem ser, necessariamente, incluídos no processo produtivo do café (CHALFOUN, 1996).

Para se obter um produto de boa qualidade, que reúna as características de tipo e qualidade exigidas pelo mercado interno e, principalmente, pelo externo, é indispensável um adequado processamento pós-colheita do fruto do cafeeiro (Lo MÔNACO, 2005).

O processamento dos grãos por via úmida promove a redução do custo de secagem e a melhoria da qualidade de bebida e gera grandes volumes de resíduos sólidos e líquidos, ricos em material orgânico e inorgânico que, se dispostos no meio ambiente sem tratamento, podem causar a destruição da flora e da fauna, além de comprometer a qualidade da água e do solo (MATOS e Lo MÔNACO, 2003).

O principal efeito da poluição orgânica em um corpo d'água receptor é a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, uma vez que bactérias aeróbias utilizam o oxigênio dissolvido no meio para efetuar seus processos metabólicos, tornando possível a degradação do material orgânico lançado no meio (DELGADO e BAROIS, 1999).

Assim, um dos grandes problemas na atividade cafeeira a ser enfrentado é a busca de alternativas que combinem redução de custos financeiros com eficiência no tratamento dos resíduos gerados, minimizando os impactos negativos causados ao meio ambiente pelo processamento dos frutos

do cafeeiro, ao solo e as águas superficiais e subterrâneas (MATOS et. al, 2001a).

Os fungos filamentosos possuem uma alta flexibilidade metabólica, sendo capazes de degradar polímeros complexos e sobreviver em ambientes considerados extremos, com valores de pH baixos, pobres em nutrientes e com baixa umidade relativa (Pereira; Lemos, 2003). Além disso, apresentam uma grande capacidade de adaptação a diversos tipos de substratos.

Nesses casos, a inoculação de culturas com as habilidades desejadas de catabólitos produzidos através da bioaugmentação torna-se uma opção essencial. Este processo de adaptação é chamado de aclimatação e permite que microorganismos sejam capazes de produzir metabólitos como as enzimas utilizando os substratos xenobióticos como fonte de carbono e produzindo biomassa (Mancera-Lopez et a., 2008; Wang et al., 2009).

O crescimento fúngico por meio do alongamento e ramificação das hifas permite a colonização de grandes áreas, aumentando a superfície de contato do fungo com o contaminante (Tavares, 2006).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de fungos filamentosos na degradação da matéria orgânica presente na água residuária do processamento úmido do café.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Água residuária do processamento úmido do café**

A água residuária do processamento úmido do café (*Coffea arábica* L.) utilizada no experimento foi obtida em uma propriedade rural localizada no município Campestre, Minas Gerais. A matéria-prima foi coletada durante a

desmucilagem dos grãos, armazenada em garrafas PET higienizadas e secas. Após a coleta, o material foi congelado e transportado dentro de bolsas térmicas ao Laboratório de Análises Avançadas do Departamento de Ciência dos Alimentos e armazenado em freezer até o momento das análises.

## **2.2 Caracterização da água residuária do café**

As análises físico-químicas, químicas e biológicas foram realizadas nos Laboratórios de Bioquímica e Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos-UFLA; Qualidade de Água do Departamento de Engenharia - UFLA em conformidade com as recomendações do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995) e de Análise Foliar do Departamento de Química – UFLA. As análises realizadas com seus respectivos métodos encontram-se listadas abaixo.

### **2.2.1 Demanda bioquímica de oxigênio<sub>5</sub> (DBO 20°C)**

Obtida pela determinação do oxigênio dissolvido pelo método iodométrico (Processo Winkler) (APHA, 1995).

### **2.2.2 Demanda química de oxigênio (DQO)**

Determinada pelo método de oxidação química em refluxo aberto (APHA, 1995).

### **2.2.3 Sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SV) e sólidos dissolvidos (SD)**

Os ST foi medido gravimetricamente após secagem em estufa a 105°C e o conteúdo volátil após incineração em mufla a 550°C. Os SFT foram obtidos por diferença entre os ST e SVT (APHA, 1995).

### **2.2.4 Sólidos suspensos (SS)**

Determinados pelo método gravimétrico, com utilização de membranas de fibra de vidro com 0,45 µm de diâmetro de poro (APHA, 1995).



### **2.2.5 Compostos fenólicos (FenolT)**

Os fenóis totais foram determinados pelo método colorimétrico, com o uso do reagente Folin-Denis, sendo que o ácido tânico foi utilizado para construção da curva padrão (FOLIN & DENIS, 1912).

### **2.2.6 Nitrogênio**

Determinado pelo processo Kjeldahl com a adição do ácido salicílico (AOAC, 1995).

### **2.2.7 Macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) e Micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn)**

A determinação dos nutrientes foi realizada segundo metodologia proposta por Malavolta et al., (1997).

### **2.2.8 Acidez total**

Determinação pelo método volumétrico, seguindo-se a metodologia descrita por Dilallo & Albertson (1961) modificada por RIPLEY et al. (1986).

### **2.2.9 Oxigênio Dissolvido**

Foi determinado segundo Standard Methods, methods 4500-O (Apha, 1998). Este método consiste em fixar o oxigênio dissolvido da amostra por meio da adição das soluções de sulfato manganoso ( $MnSO_4$ ) e a solução alcali-iodeto-azida, que contém hidróxido de sódio (NaOH), iodeto de sódio (NaI) e azida sódica ( $NaN_3$ ) (APHA, 1995).

### **2.2.10 pH**

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro de marca Tecnal, modelo TEC-7 (TECNAL/BRASIL), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 conforme AOAC (1995).

### **2.2.11 Condutividade elétrica (CE)**

Quantificada em condutivímetro portátil (APHA, 1995).

### **2.2.12 Umidade**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com o emprego de calor, o qual se baseia na perda de peso do material quando submetido a aquecimento de 105°C, até atingir peso constante. Os resultados foram expressos em g/100 g (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

### **2.2.13 Proteína**

A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, conforme procedimento da AOAC (1995). Após a digestão da amostra com a mistura digestora (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e ácido sulfúrico, foi realizada destilação e posterior titulação com solução de ácido clorídrico. Os resultados foram expressos em g/100 g.

### **2.2.14 Extrato etéreo**

Para a obtenção do extrato etéreo, foi utilizado o método de Soxhlet (gravimétrico), baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter etílico, ou na quantidade de material solubilizado pelo solvente (AOAC, 1995).

### **2.2.15 Cinzas**

O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado submetendo-se as amostras a 550°C. Os resultados foram expressos em g/100g (AOAC, 1995).

### **2.2.16 Pectina total e solúvel**

O doseamento de pectina total e solúvel foi realizado pelo método colorimétrico, por meio da condensação colorida por reação da pectina hidrolisada (ácido galacturônico) com o carbazol (Bitter & Muir, 1962).

### **2.2.17 Açúcares Totais**

Foram determinados espectrofotometricamente, a 620 nm de acordo com o método de antrona proposto por Dische (1962).

### **2.3 Microorganismos**

Foram testados 20 isolados obtidos da Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos - UFLA e da Micoteca da EPAMIG-UFLA (Tabela 1) a fim de selecionar os fungos que mais degradaram pectina em meio Mac. Ilvaine.

### **2.4 Seleção dos isolados quanto à capacidade de produzir pectinases**

Para a seleção dos isolados, foram realizados testes qualitativos. A escolha qualitativa foi realizada através de uma análise comparativa entre os isolados onde se fez uma comparação da relação entre o tamanho do halo de degradação de pectina e o halo de crescimento da colônia.

O meio utilizado foi composto de (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 7g; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>: 1g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1g; Pectina cítrica: 3g; Extrato de levedura: 0,6g; Ágar: 18g e água destilada: 1L, pH = 7,2) (Pereira, 2009). As placas contendo os esporos dos isolados foram incubadas durante 5 dias à 28 ° C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Em seguida, a partir de cada repetição, foi transferido um plug (disco de 6 mm de diâmetro) para placas de Petri com cerca de 25 mL de meio Mac. Ilvaine (Ácido cítrico: 7,74g; Pectina cítrica: 2,5g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 17,93g, Ágar: 18g e Água destilada: 1L, pH = 6,0) o qual permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. Essas placas foram incubadas durante 2 dias à 40°C.

Decorrido o período de incubação, verteram-se 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura, os quais foram

descartados após 10 minutos de repouso. Foram medidos com o auxílio de uma régua, o tamanho das colônias e dos halos de degradação de pectina. Os isolados em estudo não foram produtores de micotoxinas.

## **2.5 Composição do meio fermentativo**

### **2.5.1 Meio fermentativo com água residuária do café**

O meio utilizado no experimento para a fermentação submersa foi constituído de: (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 7g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1g; Extrato de levedura: 0,6g e pH = 7,2) (Pereira, 2009). O meio foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL na proporção de 100 mL por frasco.

### **2.5.2 Meio controle**

Utilizou-se um meio controle com os mesmos nutrientes do meio anterior (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 7g; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>: 1g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1g; Extrato de levedura: 0,6g e pH = 7,2) (Pereira, 2009). O meio foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL na proporção de 100 mL por frasco.

## **2.6 Descrição do experimento**

Após a esterilização dos dois meios, o meio com água residuária do café foi inoculado com 1,0 mL da suspensão com 10<sup>6</sup> esporos/mL e ao meio controle, adicionou-se a enzima pectinase (Pectinase de *Aspergillus niger*, marca Sigma) na proporção de 1 %. Ambos os meios foram incubados durante 196 horas a 30°C e 100 rpm em “shaker”. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.7 Determinação da matéria orgânica após fermentação**

Após o período de 196 horas, os fermentados de cada erlenmeyer foram filtrados em organza e os líquidos resultantes foram analisados quanto aos teores de pectina total, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) nos

Laboratórios de Bioquímica e Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e de Qualidade de Água do Departamento de Engenharia da UFLA a fim de averiguar a capacidade de degradação da matéria orgânica e da pectina presentes na água residuária do café.

### **2.7.1 Demanda bioquímica de oxigênio<sub>5</sub>(DBO 20°C)**

Obtida pela determinação do oxigênio dissolvido pelo método iodométrico (Processo Winkler).

### **2.7.2 Demanda química de oxigênio (DQO)**

Determinada pelo método de oxidação química em refluxo aberto.

### **2.7.3 Pectina total**

O doseamento de pectina total foi realizado pelo método colorimétrico, por meio da condensação colorida por reação da pectina hidrolisada (ácido galacturônico) com o carbazol (Bitter & Muir, 1962).

## **2.8 Análise estatística**

Os resultados da fermentação para meio com água residuária do café e para o controle foram submetidos ao teste de média Scott Knott com 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização da água residuária do café

A composição química e físico-química da água residuária do café utilizada no experimento é mostrada na Tabela 1.

**Tabela 1** Caracterização da água residuária do processamento via úmida do café

Análises	Valores
Umidade (%)	96,24 ± 0,11
Proteína (%)	0,43 ± 0,04
Cinza (%)	0,32 ± 0,03
Extrato etéreo (%)	0,11 ± 0,01
Pectina Total (mgL <sup>-1</sup> )	2520,00 ± 0,11
Pectina solúvel (mgL <sup>-1</sup> )	2215,00 ± 0,12
Açúcares totais (gL <sup>-1</sup> )	6,63 ± 0,12
pH	4,21 ± 0,03
Acidez total (mgL <sup>-1</sup> )	1520,00 ± 0,04
Turbidez (UT)	842,00 ± 0,04
CE (dSm <sup>-1</sup> )	7,82 ± 0,01
DQO <sub>T</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	10.040,00 ± 0,01
DBO <sub>5</sub> <sup>20°C</sup> (mgL <sup>-1</sup> )	9800,00 ± 0,2
Sólidos Totais (mgL <sup>-1</sup> )	9121,00 ± 0,01
Sólidos Voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	6012,00 ± 0,05
Sólidos suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	1298,00 ± 0,12
Sólidos dissolvidos (mg L <sup>-1</sup> )	5315,00 ± 0,15
Compostos fenólicos (mg L <sup>-1</sup> )	995,00 ± 0,03
Oxigênio Dissolvido (mgL <sup>-1</sup> )	4,60 ± 0,05
N (mg L <sup>-1</sup> )	90,12 ± 0,04
P (mg L <sup>-1</sup> )	74,20 ± 0,05
K (mg L <sup>-1</sup> )	1074,00 ± 0,02

Mg (mg L <sup>-1</sup> )	62,85 ± 0,02
Ca (mg L <sup>-1</sup> )	212,00 ± 0,03
S (mg L <sup>-1</sup> )	182,50 ± 0,1
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	0,73 ± 0,11
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	0,79 ± 0,13
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	0,32 ± 0,05
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	2,56 ± 0,02

A matéria orgânica está contida na fração de sólidos voláteis, mas normalmente é medida de forma indireta pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (Selvamurugan et al., 2010b).

Os índices DBO e DQO indicam o grau de poluição orgânica biodegradável e total na água, de grande importância, uma vez que a presença de matéria orgânica promove o alto consumo de oxigênio, o que pode resultar na liberação de odor e inviabilizar a existência de peixes e outros seres aquáticos no corpo d'água (Selvamurugan et al., 2010a).

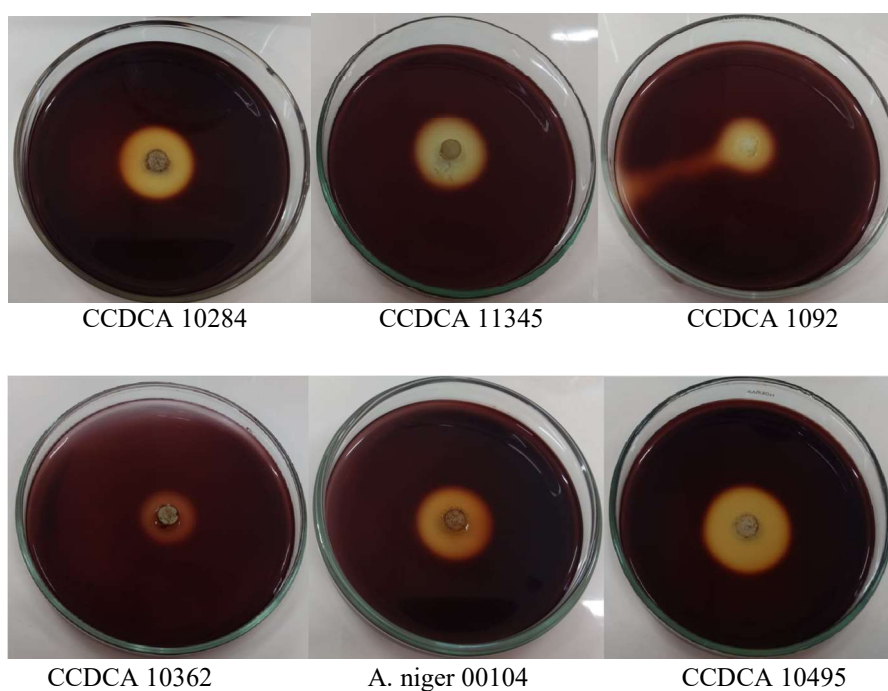
Segundo Matos et al., (2005), as águas residuárias do café são ricas em material orgânico e inorgânico em solução e orgânicos em suspensão, de grande poder poluente. Os teores de DBO, DQO e de sólidos encontrados na água residuária do café foram elevados, indicando a presença de grande quantidade de matéria orgânica e estão bem acima dos valores permitidos para lançamento em corpos d'água classe 2 pela legislação CONAMA 357/2005, que é de 180 mgL<sup>-1</sup> para DQO e 60 mgL<sup>-1</sup> para DBO.

Tendo em vista que a água residuária foi obtida no processo da desmucilagem dos grãos, os teores encontrados de açúcares totais, pectina total e solúvel, foram significativamente elevados.

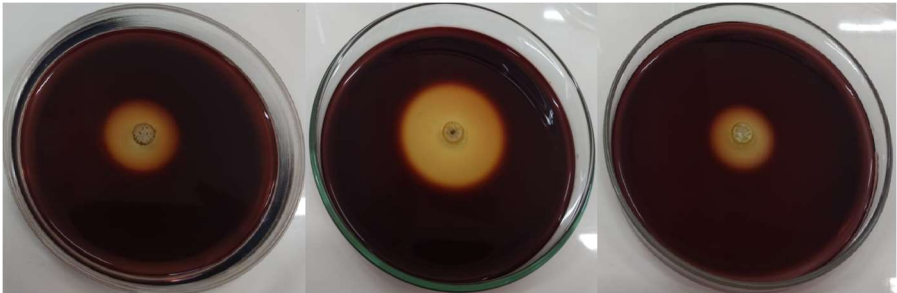
### 3.2 Seleção dos isolados quanto à degradação de pectina.

Após o período de 196 horas de incubação, foi observada a formação de um halo de degradação ao redor da colônia de cada isolado evidenciando a capacidade de degradar pectina como mostra a Figura 1.

**Figura 1** Formação do halo de degradação de pectina para os isolados estudados



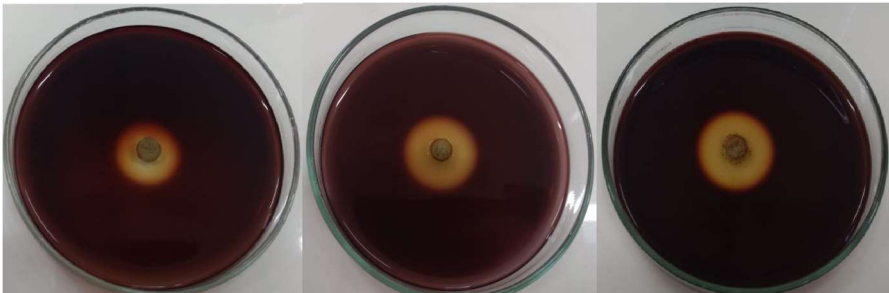




CCDCA 10283

CCDCA 10232

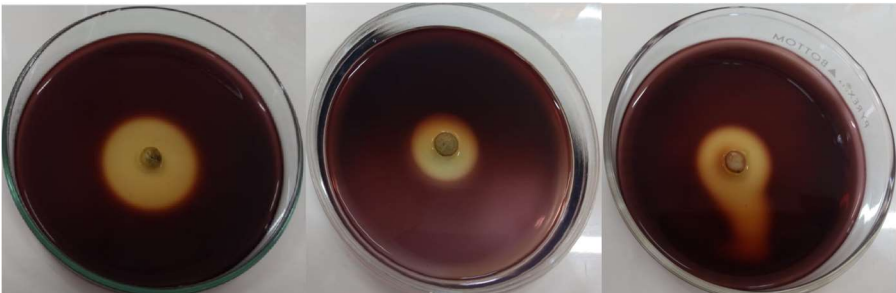
CCDCA 10372



CCDCA 11363

CCDCA 11327

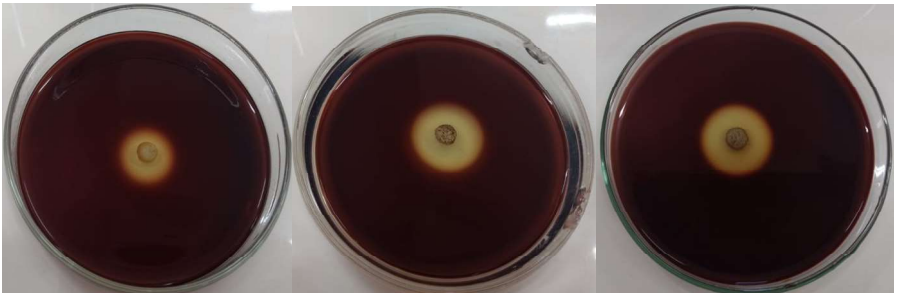
*A. niger* 00118



CCDCA 11402

CCDCA 1065

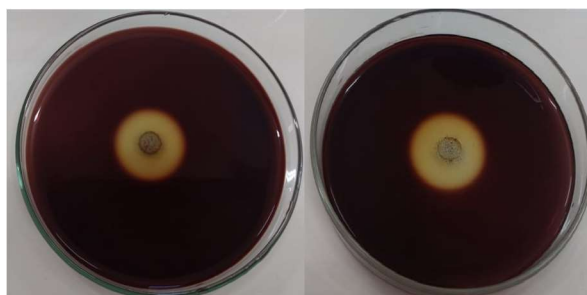
CCDCA 10345



CCDCA 10365

CCDCA 10285

CCDCA 1035



CCDCA 10205 *A. niger* 00194

Após a medição com régua dos diâmetros das colônias e dos halos de degradação, foi possível determinar o índice de degradação de pectina (índice enzimático) para cada isolado que foi calculado através da relação entre o diâmetro do halo formado e o diâmetro da colônia como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2** Valores dos diâmetros dos halos de degradação de pectina (H.D.) das colônias dos isolados (H.C.) e dos índices enzimáticos (I.E.).

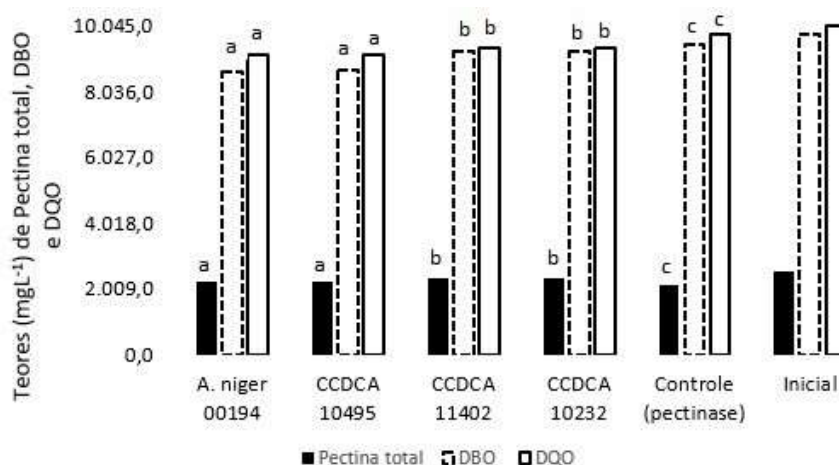
Isolados	Espécies	H. D (cm)	H.C (cm)	I. E. (cm)
A. niger 00194	<i>Aspergillus niger</i>	2,910 ± 0,001	0,800 ± 0,000	3,638 ± 0,013
A. niger 00118	<i>Aspergillus niger</i>	2,810 ± 0,001	0,800 ± 0,012	3,513 ± 0,006
A. niger 00104	<i>Aspergillus niger</i>	2,710 ± 0,001	0,800 ± 0,006	3,375 ± 0,015
CCDCA 10284	<i>Aspergillus foetidus</i>	2,800 ± 0,006	0,800 ± 0,006	3,500 ± 0,029
CCDCA 10285	<i>Aspergillus foetidus</i>	2,100 ± 0,058	0,800 ± 0,006	2,593 ± 0,065
CCDCA 10205	<i>Aspergillus foetidus</i>	2,710 ± 0,001	0,800 ± 0,006	3,388 ± 0,035
CCDCA 10283	<i>Aspergillus foetidus</i>	2,400 ± 0,012	1,000 ± 0,058	2,400 ± 0,132
CCDCA 10495	<i>Aspergillus foetidus</i>	3,200 ± 0,006	0,800 ± 0,000	4,000 ± 0,007
CCDCA 1035	<i>Aspergillus niger</i>	2,810 ± 0,001	0,800 ± 0,000	3,513 ± 0,013
CCDCA 11402	<i>Penicillium biliariae</i>	3,200 ± 0,058	0,810 ± 0,010	3,951 ± 0,115
CCDCA 11327	<i>Penicillium wotroi</i>	2,700 ± 0,006	0,900 ± 0,012	3,000 ± 0,041
CCDCA11375	<i>Talaromyces sp.</i>	2,710 ± 0,001	2,400 ± 0,000	2,306 ± 0,003
CCDCA 1065	<i>Penicillium simplicissimum</i>	2,710 ± 0,006	0,900 ± 0,006	3,011 ± 0,025
CCDCA 11365	<i>Penicillium daleae</i>	2,700 ± 0,012	0,800 ± 0,006	3,375 ± 0,034
CCDCA 11362	<i>Penicillium lilacinoechinulatum</i>	2,000 ± 0,058	0,800 ± 0,012	2,500 ± 0,095
CCDCA 1092	<i>Penicillium spinulosum</i>	2,100 ± 0,058	0,800 ± 0,006	2,625 ± 0,083
CCDCA 10232	<i>Penicillium citrinum</i>	4,000 ± 0,058	0,900 ± 0,006	4,444 ± 0,082
CCDCA 11363	<i>Talaromyces angelicus</i>	2,200 ± 0,006	0,900 ± 0,006	2,418 ± 0,058
CCDCA 11372	<i>Penicillium onobense</i>	2,600 ± 0,006	0,800 ± 0,000	3,250 ± 0,007
CCDCA 11345	<i>Penicillium sp.</i>	0,800 ± 0,006	0,900 ± 0,000	3,111 ± 0,006

A partir dos resultados encontrados, foi possível observar que os isolados do gênero *Aspergillus* (seção *Nigri*) (CCDCA 10495 e *A. niger* 00194) e os do gênero *Penicillium* (CCDCA 10232 e CCDCA 11402) tiveram os maiores halos de degradação de pectina. Sendo assim, esses isolados foram selecionados para a etapa de fermentação.

### 3.3 Processo fermentativo

Após 196 horas de fermentação, foram determinados os valores de pectina total e de DBO e DQO como mostrados no Gráfico 1.

**Gráfico 1** Teores de Pectina total, DBO e DQO ( $\text{mgL}^{-1}$ )



\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Através dos valores encontrados foi possível observar que houve redução dos teores de pectinase total, DBO e DQO para todos os isolados.

Segundo Oliveira (2005), fungos filamentosos são citados como agentes transformadores eficazes, face à habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias.

O Isolado A. niger 00194 (*Aspergillus niger*), obteve a maior redução dos níveis de DBO (8655,00 mgL<sup>-1</sup>) e DQO (9156,30 mgL<sup>-1</sup>) presentes na água residuária do café, representando um potencial de degradação de 11,68 % (DBO) e 8,80 % (DQO), indicando que houve diminuição da quantidade de oxigênio consumido na degradação da matéria orgânica por processos biológicos e também da quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável.

Os teores de DBO e DQO determinados para o isolado CCDCA 10495, *Aspergillus foetidus*, foram próximos aos encontrados pelo fungo *Aspergillus niger* que foram de 8682,20 mgL<sup>-1</sup> e 9170,10 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. O potencial de degradação foi de 11,41 % (DBO) e 8,66 % (DQO). Os valores encontrados para essas espécies não diferiram estatisticamente a 5% de significância.

Os isolados CCDCA 11402 (*Penicillium biliae*) e CCDCA 10232 (*Penicillium citrinum*) apresentaram valores de DBO e DQO de (9280,1 mgL<sup>-1</sup>; 9368,1 mgL<sup>-1</sup>) e (9277,30 mgL<sup>-1</sup>; 9342,2 mgL<sup>-1</sup>), respectivamente. As duas espécies apresentaram valores aproximados de redução da matéria orgânica presente e não apresentaram diferença significativa a 5 % de probabilidade. As porcentagens de degradação da DBO e DQO utilizando *Penicillium biliae* (CCDCA 11402) foram de 5,31 % e 6,69 %, respectivamente. Para a espécie *Penicillium citrinum* (CCDCA 10232), os índices de redução da DBO e DQO foram de 5,33 % e 6,95 %, respectivamente.

A água residuária do café pode apresentar também teores de lignina, celulose e hemicelulose na sua composição. A utilização do fungo *Aspergillus niger* na degradação dessas substâncias pode ocorrer devido a uma ampla faixa de enzimas lignocelulolíticas, como por exemplo a celulase e a xilanase (Slivinski, 2007).

A redução da matéria orgânica e da pectina total observada para os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também está associada à ação de enzimas pectinolíticas que são secretadas por fungos filamentosos desses gêneros (Kashyap et al., 2001, Jayani et al., 2005).

Entre as enzimas pectinolíticas, a espécie *Aspergillus niger* é produtora das enzimas: poligalacturonase, endo-poligalacturonase, exo-poligalacturonase, pectina liases e pectinesterases. As pectinases produzidas por *Aspergillus niger* são de grande importância, pois são classificadas como GRAS (Generally Recognized As Safe), permitindo assim sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos. Além disso, a pectina liase produzida por *Aspergillus niger* é a única enzima capaz de hidrolisar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de frutas (Moyo et al., 2003).

O gênero *Penicillium* tem a capacidade de secretar as enzimas: pectina liases e pectinesterases.

A pectina comercial utilizada como controle no presente trabalho a fim de comparação é de origem fúngica (*Aspergillus*) que exibe características de alta atividade de endo-poligalacturonase e de pectina liase. Sendo assim, a maior degradação de pectina total foi verificada com o uso da enzima comercial.

Os teores encontrados para pectina total ( $2100,10 \text{ mgL}^{-1}$ ), DBO ( $9465,30 \text{ mgL}^{-1}$ ) e DQO ( $9792,00 \text{ mgL}^{-1}$ ) com o uso da enzima comercial diferiram estatisticamente dos demais a 5 % de significância. A porcentagem de degradação da pectina total para a enzima foi de 16,67 %.

Os teores de pectina total determinados pelas espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus foetidus* foram de 2303,17 mgL<sup>-1</sup> e 2318,25 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente e não diferiram significativamente entre si. A porcentagem de degradação da pectina total para as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus foetidus* foram de 8,60 % e 8,02 %, respectivamente

Para as espécies *Penicillium citrinum* e *Penicillium biliae*, os valores de pectina total foram de 2397,54 mgL<sup>-1</sup> e 2402,02 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente e não diferiram significativamente entre si. A porcentagem de degradação da pectina total para as espécies *Penicillium citrinum* e *Penicillium biliae* foram de 4,90 % e 4,68 %, respectivamente. Apesar de existirem vários fungos produtores de pectinases, Jia et al. (2000), afirmam que as enzimas pectinolíticas usadas na indústria de alimentos são comercialmente produzidas em sua maioria por *Aspergillus niger*.

A ação da enzima protease presente em *Aspergillus niger* (Li et al., 2008) na degradação de proteínas presentes na água residuária do café também pode ter influencia positiva nas quedas dos níveis de DBO e DQO. Os fungos produzem enzimas extracelulares que quebram moléculas complexas, como as encontradas em gorduras animais, e as tornam de mais fácil absorção ao seu metabolismo (PINHEIRO et al., 2007).

De acordo com Griffin (1994), os fungos são importantes, também, como primeiro agente de decaimento nos ciclos do carbono e de alguns nutrientes como fósforo e nitrogênio.

Contudo, Rodrigues (2006) afirma que pouco ainda se sabe a respeito das atividades metabólicas desses microorganismos quando empregados em processos de tratamento biológico de águas residuárias, o que torna necessário o aprofundamento do estudo dessa nova tecnologia.

A aplicação de enzimas para remover contaminantes ambientais e industriais tem sido estudada nos últimos 20 anos. As reações realizadas utilizando técnicas baseadas em enzimas são caracterizadas por uma alta eficiência e seletividade e são significativamente mais benignas para o meio ambiente quando comparadas com os métodos puramente químicos de remediação ambiental (SZATKOWSKI et al., 2011).

Sendo assim, uma etapa preliminar no tratamento do efluente seria a adição do líquido resultante da fermentação que contém as enzimas (extrato enzimático) à um volume maior de água residuária a fim de degradar substâncias pécnicas e a matéria orgânica presentes.

#### **4CONCLUSÕES**

Os isolados *A. niger* 00194 (*Aspergillus niger*) e CCDCA 10495 (*Aspergillus foetidus*) foram os que microorganismos que degradaram, com mais eficiência, a matéria orgânica presente na água residuária do café após 196 horas de fermentação.

O Isolado *A. niger* 00194 obteve a maior redução dos níveis de DBO (8655,00 mgL<sup>-1</sup>) e DQO (9156,30 mgL<sup>-1</sup>) presentes na água residuária do café, representando um potencial de degradação de 11,68 % (DBO) e 8,80 % (DQO).

Sendo assim, o presente trabalho mostrou uma alternativa para a redução dos níveis de DBO, DQO e pectina total presentes na água residuária do café utilizando microorganismos capazes de degradar matéria orgânica.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.** 16th ed. Washington, 1995.

APHA (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Edition, **American Public Health Association Inc.**, New York.

BITTER, T.; MUIR, H.M.A. **modified uronic acid carbazole reaction.** **Analytical Biochemistry**, New York, v.34, n.4, p.330-334, 1962.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, M. A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físico- química, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Bioscience Journal** (UFU Impresso), Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, July/Aug. 2010.

CHALFOUN, S.M. O café (Coffea arabica L.) na região Sul de Minas – **Relação na qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** Doutorado na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras, MG. 1996, 125p.

DAMASCENO, E.P. (2007) **Emprego de reator de leito fixo e fluxo contínuo inoculado com Aspergillus niger. AN 400 na remoção de nutrientes e matéria orgânica de água residuária de indústria petroquímica.** 56p. Monografia (Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Fortaleza.

DELGADO, E. A.; BAROIS, I. Lombricompostaje de la pulpa de café em México. In: **III SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEIEIRA.** Anais... Londrina – PR, 1999, 513 p. 335343.

DILALLO,R.,ALBERTON O.E. Volatile acids by direct titration. **Journal of water pollution control federation**, v. 33, n.4, p. 356-356. 1961.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Eds.). Carbohydrate chemistry. **New York: Academic**, 1962. v. 1, p. 477-512.

Fia, F. R. L.; Borges, A. C.; Matos, A. T.; Duarte, I. C. S.; Fia, R.; Campos, L. C. Development of biofilm in anaerobic reactors treating wastewater from coffee grain processing. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.2, p.210-217, 2010.

Folin, O.; Denis, W.; *J. Biol. Chem.* **1912**, 12, 239.

GRIFFIN, D.H. *Fungal physiology*. 2. ed. **New York: Wiley-Liss**, 1994.

Instituto Adolfo Lutz; **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 1985, p. 21.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

KASHYAP, D.R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

LI, Q.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 333-341, 2008.

Lo MÔNACO, P.A. **Fertirrigação do cafeeiro com águas residuárias da lavagem e descascamento de seus frutos**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005. 96p.

Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez- Vazquez, R., Saucedo- Castañeda, G., Barrera-Cortés, J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarboncontaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 61: 151-160.

MALAVOLTA, E.; MOREIRA, A. Nutrição e adubação do cafeeiro adensado. **Piracicaba: Informações Agronômicas**, n. 80, p. 1-7, dez. 1997. (Encarte técnico).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MATOS, A. T.; PINTO A. B.; BORGES, J. D. Caracterização de águas residuárias da lavagem e despolpa de frutos de cafeeiro e possibilidades de seu uso na fertirrigação. In: **INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY**, 3, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: UFPR, 1999.

MATOS, A.T.; EMMERICH. I. N.; RUSSO, J. R. Tratamento de águas residuárias da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro em rampas cultivadas com azevém. In: **20 SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**. Vitória, ES. Anais... Vitória, ES. (CD-ROM).2001a.

MATOS, A.T.; Lo MÔNACO, P.A. Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos e líquidos da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro. (**Engenharia na Agricultura. Boletim técnico, 7**). Viçosa:UFV,2003.68p.

MATOS, A.T.; Lo MÔNACO, P.A.; GARCIA, G.O. **Caracterização de resíduos sólidos e líquidos da água residuária da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro**. 2003.

MOYO, S.; GASHE, B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v 85, n. 1/2, p. 87-100, Aug. 2003.

OLIVEIRA, S.D. e LEMOS, J.L.S. (2005) Biodegradação de petróleo de solo areno- argiloso por fungo filamentosos. In: **XIII Jornada de Iniciação Científica**, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

Pastore, N.S.; Hasan, S.M.; Zempulski, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3. p. 149-159, 2011.

PEREIRA, L.T.C. e LEMOS, J.L.S. (2003) **Os Fungos Filamentosos, uma opção em estudo para a Biorremediação II**. In: XI Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associados à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2009.

RIGUEIRA, R.J.A.; LACERDA FILHO, A.F.; MATOS, A.T.; DONZELES, S.M.L.; PALACIN, J.J.F. **Alteração nas características físicas, químicas e bioquímicas da água no processo de lavagem, despolpa e desmucilagem de frutos do cafeeiro**. Engenharia na Agricultura, Viçosa, v.18, n.2, p.131-139, 2010.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of water pollution control federation**, v. 58, n.5, p. 406-411. 1986.

RODRIGUES, C. (2006) **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Process

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M., NANDAKUMAR, N.B. High rate anaerobic treatment of coffee processing wastewater using upflow anaerobic hybrid reactor. **Iranian Journal Environmental Health Science and Engineering**, v.7, p.129-136, 2010a.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**, v.36, p.1686-1690, 2010b.

SLIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SZATKOWSKI, L. et al. Oxidative dechlorination of halogenated phenols catalyzed by two distinct enzymes: horseradish peroxidase and dehaloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 505, n. 1, p. 22-32, Jan. 2011.

Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z., Agapito, M.S.M., Coutinho, J.A.P., Xavier, A.M.R.B. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology** 134: 233–248.

Wang, H., Ye, Q., Yue, L., Yu, Z., Han, A., Yang, Z., Lu, L. 2009. Kinetics of extractable residue, bound residue and mineralization of a novel herbicide, ZJ0273, in anaerobic soils. **Chemosphere**, 76:1036-1040.