



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018075866-7 A2



(22) Data do Depósito: 13/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

(51) Int. Cl.: C12P 7/40; A23K 10/10; C12R 1/66.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE; PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA; CARLOS RICARDO SOCCOL.

(57) **Resumo:** A presente invenção trata sobre a produção de ácido cítrico utilizando cascas de cacau secas (Certificado SisGen Nº A4EC257) como substrato em fermentação sólida. As cascas de cacau são resíduos do processamento do fruto para a obtenção do chocolate, e de modo geral, estas permanecem na própria plantação, sem receber um tratamento adequado. Além de atuar como substrato/suporte sólido, as cascas de cacau foram utilizadas como única fonte de carbono disponível para o microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 ? CCT 7717 (Certificado SisGen Nº A4D4320), em percentual de umidade de 65% adicionada de solução salina. Esta invenção descreve um processo simples e de alto rendimento para a produção do ácido cítrico, uma molécula importante e de versatilidade industrial, apresentando uma alternativa de uso aos resíduos da agroindústria, visando contribuir para a minimização dos impactos ambientais.

Obtenção das cascas de cacau a partir do fruto in natura	• Quebra, separação de amêndoas e limpeza; • Desidratação: estufa Nova Elica 400/ND, circulação de ar a 50 °C/48h; • Moagem: moedor de facas Cienlab Wiley DL; • Classificação: granulométrica: agitador de peneiras Bertel VP-01, malha USS/ASTM no. 20; • Fração utilizada: partícula de 2,08 – 0,84 mm.
Preparo do inóculo	• Em profundidade em 50 ml de meio PDA; • Mantido em estufa a 30 °C/7 dias; • Suspensão de esporos: agitação magnética com solução de Tween 80 a 0,01%/15 min.
Preparo da solução nutritiva	• KH_2PO_4 1 g L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L⁻¹; 4% metanol (v/v).
Fermentação em estado sólido	• Frascos de Erlenmeyer, sistema fechado com taxa de inoculação de 10⁷ esporos g⁻¹; • 3,5 g de casca de cacau a 65% de umidade; • Em estufa a 30 °C/7 dias e coleta de amostra a cada 24h.
Extração do material fermentado	• 2 g de amostra em 20 mL de água deionizada com agitação magnética/15 min; • Filtração em um não-tecido TNT; • Centrifugação a 5000 rpm/20 min.
Análises	• pH; • Umidade (IAL, 2008); • Açúcares redutores (MILLER, 1959).
Cromatografia líquida de alta eficiência	• Quantificação em equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna Hi-Flex (300 x 7,7 mm) a 60 °C, regime isocrático de fase móvel H2SO4 0,005 M, vazão de 0,6 ml min⁻¹.
Rendimento do processo fermentativo	• Calculado com base no rendimento teórico máximo, em massa molecular, da conversão de glicose em ácido cítrico, equivalente a 1,167.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

Campo da Invenção

[001]. Esta invenção está inserida na área da biotecnologia agro-alimentar e agroindústria, mais especificamente na área de produção do aditivo ácido cítrico para a indústria alimentícia e de ração animal.

[002]. O uso da casca de cacau insere-se na área de tecnologia e inovação para o aproveitamento de resíduos agroindustriais. A produção do ácido tem como campo de aplicação processos de conservação de alimentos, aditivo em ração animal, pode ser empregado como agente antioxidante em cosméticos, processos têxteis, bem como no tratamento de efluentes.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003]. Esta invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo de produção de ácido cítrico a partir do microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 (Comprovante de Cadastro Sisgen A4D4320) com o uso da casca de cacau como base para meio de produção e fonte de nutrientes. O seu principal objetivo é a diminuição do impacto ambiental por meio do reaproveitamento de casca de cacau para a produção de biomoléculas de interesse industrial, tal como o ácido cítrico e, dessa forma, reduzir o custo de produção.

[004]. Foi realizada uma pesquisa de anterioridade apresentada na Tabela 1, utilizando como critério de busca o conjunto de palavras-chave que representa a presente invenção, em inglês *citric acid production cocoa husk*.

Tabela 1 – Resultados da pesquisa nas bases de dados nacionais e internacionais de registros relacionados à presente invenção.

Palavras-chave	Base de dados						
	WIPO	INPI*	Espacenet	Google patents	USPTO	CIPO	FPO
<i>Citric acid production cocoa husk</i>	622	51.849	61	4.737	0	0	1.200

*Para a pesquisa no INPI, as palavras-chave foram traduzidas para a língua Portuguesa.

[005]. Na base de dados WIPO, nenhum dos 622 resultados para a produção de ácido cítrico com uso de casca de cacau se referencia à invenção proposta. Não foram encontrados registros para a base de dados dos Estados Unidos e para a base de dados canadense. Foram encontrados 61 registros de busca na base Européia de dados *Espacenet*, dos quais, nenhum deles correspondeu à combinação de palavras-chave, os resultados relacionam-se à aplicação do cacau como aditivo alimentar.

[006]. Foi encontrado elevado número de registros no INPI, porém, sem relação com esta invenção proposta, bem como para a base de dados *Google Patents* e na FPO – *Free Patents Online*, nenhum dos 4.737 e dos 1.200 resultados, respectivamente, se relaciona a esta invenção.

[007]. As publicações encontradas, em todos os casos, relacionam-se a aplicações diversas da casca de cacau, tais como desenvolvimento de moedor de cascas, produção de extrato da casca de cacau concentrado, extração de esteroides e de fibras da casca de cacau. Os demais resultados relacionam-se ao uso das amêndoas do cacau visando à produção do chocolate, e também, à aplicação da polpa do cacau em diversas bebidas. Demais resultados estão relacionados às aplicações do ácido cítrico pela indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Nenhum registro nem de patente, nem de publicação científica foi encontrado sobre o uso da casca de cacau como substrato/suporte para a produção de ácido cítrico.

[008]. O cacau (*Theobroma cacao* L.) é o fruto da árvore cacaueira de origem da América Central e do Sul. O seu desenvolvimento necessita de solos profundos com uma regularidade de chuva ao longo do ano, com preferência para temperaturas que

variem entre 18 e 32 °C. Famoso desde a época do descobrimento do continente, considerado um fruto dos deuses. Suas amêndoas são retiradas para a produção do chocolate (OETTERER, M. et al. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Ed. Manole. 2006). Tal prática gera um grande volume de cascas sem destino apropriado e, por apresentar nutrientes de interesse para o desenvolvimento de microrganismos, as cascas passam rapidamente por um processo de decomposição. Além do ponto de vista ambiental, a utilização dos resíduos agroindustriais em processos fermentativos apresenta potencial econômico. A exploração desses resíduos visa uma maior produtividade e menor custo, pois são materiais de alta disponibilidade ao longo do ano e em grandes volumes. Isso traz como possibilidade o emprego desses resíduos como substrato e suporte em fermentação no estado sólido, ou fermentação submersa com sólidos em suspensão, para a produção de biomoléculas, a exemplo de ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico.

[009]. Os ácidos orgânicos são característicos pela sua estrutura molecular, a qual permite uma ampla aplicação industrial, podendo ser extraídos de grande variedade de fontes naturais. O ácido cítrico é encontrado principalmente em frutas cítricas e, em escala industrial, possui aplicações diversificadas, tais como: em alimentos (SOCCOL, C.R. et al. *Citric Acid*. In: *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*, New York: The Haworth Press, p.617-628. 2004), fármacos (KUBICEK, C. P. et al. *Production of organic acids by filamentous fungi*. In: *Industrial Applications*, Cap. 10, 2 ed, Springer Berlin Heidelberg, p. 215-234. 2011), têxtil (BEROVIC, M.; LEGISA, M. *Citric acid production*. *Biotechnology Annual Review*, v. 13, p. 303-343, 2007), tratamento de efluentes (SOCCOL, C. R. et al. *New perspectives for citric acid production and application*. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2, 2006), cosméticos (DHILLON, G. S. et al. *Recent advances in citric acid bio-production and recovery*. *Food Bioprocess Technology*, v. 4, n. 4, p. 505-529, 2011), ração animal (SUIRYANRAYNA, M. V. A. N. and RAMANA, J. V. *A review of the effects of dietary organic acids fed to swine*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6:45, 2015; KHAN, S. H. and IQBAL, J. *Recent advances in the role of organic acids in poultry*

nutrition. Journal of Applied Animal Research, volume 44, 2016), entre outros.

[010]. Em nível industrial, a produção do ácido cítrico é possível com o uso do fungo *Aspergillus niger*, que é o microrganismo com a maior capacidade de seu acúmulo, por apresentar adaptação a condições e substratos variados (KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. *Aspergillus niger citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, n. 3, p. 189-196, 2003; PAPAGIANNI, M. *Advances in citric acid fermentation by Aspergillus niger: biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnological Advances*, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007), podendo ser visualizadas na Tabela 2. O ácido cítrico pode ser obtido a partir das técnicas de fermentação em superfície, fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FmS) – sendo esta última utilizada em escala industrial, pela facilidade de escalonamento e também de controle de processo (SOCCOL, C. R. et al. *New perspectives for citric acid production and application. Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2, 2006; VANDENBERGHE, L. P. S. et al. *Production and application of citric acid. In: PANDEY, A. et al. (Eds). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Elsevier, Cap 25. 2016).*

Tabela 2 – Microrganismos e substratos utilizados para a produção de ácido cítrico

Microrganismo	Substrato	Técnica	Produção (Ácido cítrico/substrato)	Referência
<i>A. niger</i> PTCC 5010 (ATCC 9142)	Bagaço decana	FES	75,45 g kg ^{-1a}	1
<i>A. niger</i>	Bagaço de maçã	FES	159,14 g kg ^{-1b}	2
<i>A. niger</i> NRRL 567		FES	294,19 g kg ^{-1b}	3
<i>A. niger</i> NRRL 567		FmS	127,9 g kg ^{-1b}	4
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Bagaço de mandioca	FES	347 g kg ^{-1b}	5
<i>A. niger</i> BO-103MNB	Cachos de palma oleaginosa	FES	337,94 g kg ^{-1b}	6
<i>A. niger</i> UABN 210	Casca de banana	FES	82 g kg ^{-1b}	7
<i>A. niger</i> RCNM 17	Casca de café	FES	187,54 g kg ^{-1b}	8
<i>A. niger</i> CECT-2090 (ATCC9142, NRRL 599)	Casca de laranja	FES	193 mg g ^{-1b}	9
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Espiga de milho	FES	603,5 g kg ^{-1b}	10
<i>A. niger</i>	Farelo de aveia		62 g kg ^{-1b}	11
<i>A. niger</i> LPB B6 (CCT 7717)	Polpa cítrica	FES	616,5 g kg ^{-1b}	12
<i>A. niger</i>	Polpa de tamarindo	FES	14,07 mg g ^{-1b}	13
<i>A. niger</i> KS-7	Resíduo de abacaxi	FES	60,61 g kg ^{-1b}	14
<i>A. niger</i> (ATCC 9142)	Vagem de alfarroba	FES	264 g kg ^{-1b}	15

Legenda: a: baseado em açúcar consumido; b: baseado em substrato seco.
Referências: 1, Yadegary et al. Citric acid production from sugarcane bagasse through solid state fermentation method using *Aspergillus niger* mold and optimization of citric acid production by Taguchi Method. *Jundishapur Journal Microbiology*, v.6, n.9, 2013; 2, Hoseyini, M.; Asefi, N.; Mozaffari, M. Production of citric acid from apple pomace by using surface culture method. *Agricultural Journal*, v.6, n.5, p.226-230, 2011; 3, Dhillon et al. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*, v. 41, p. 78-84, 2013; 4, Dhillon et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.54, n. 2, p. 83-92, 2011; 5, Vandenberghe et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* v. 74, n. 2, p.175-178, 2000; 6, Bari et al. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 12, p. 3113-3120, 2009; 7, Kareem, S. O.; Rahman, R. A. Utilization of banana peels for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, v. 4, n. 4, p. 384- 387, 2013; 8, Ramachandra et al. Production of Citric Acid in Basal Coffee Husk Medium by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. *Advances in Biological Research* v. 7, n. 6, p. 234-240, 2013; 9, Torrado et al. Citric Acid Production from Orange Peel Wastes by Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 394-409, p 2011; 10, Hang, Y. D.; Woodams, E. E. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 65, n. 3, p. 251-253, 1998; 11, Rao, P. R.; Reddy, M. K. Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Using Oat Bran as Substrate. *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. v.3, n.3, p. 181-190, 2013; 12, Rodrigues, C. et al. Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 158, n. 1, p. 72-87, 2009; 13, Ajiboye, A. E.; Sani, A. Fermentation of the fruit pulp of *Dialium guineense* (velvet tamarind) for citric acid production using naturally occurring fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* v. 4, n. 7, p. 432-440. 2015); 14, Kareem, S. O.; Akpan, I.; Alebiowu, O. O. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 6, n. 2, p.161-165, 2010; 15, Roukas, T. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 1, p. 54-59, 1999.

[011]. Por estar relacionada a uma biomolécula de interesse mundial, a presente invenção é motivada pelo fato de a literatura não apresentar relatos sobre a sua produção a partir de casca de cacau, um material com elevado potencial a ser aplicado como substrato devido à sua composição físico-química (Tabela 3) e de baixa exploração em fermentação no estado sólido. Esta técnica fermentativa apresenta a vantagem do contato direto do microrganismo ao substrato, simulando o seu habitat natural, e o emprego de resíduos agroindustriais como substrato/suporte. Estes são estudados há algum tempo, podendo ser citados como exemplos: a polpa e cascas de café, cascas e bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de beterraba, polpa de maçã, polpa cítrica, melaço e vinhaça de cana-de-açúcar e de soja (SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S. *Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal*, v.13, p. 205-218, 2003).

Tabela 3 – Composição físico-química da casca de cacau

Parâmetro	Resultado	Referência
Estrutura lignocelulósica	Aprox. 35%	1
Estrutura péctica	Aprox. 40%	1
Proteínas totais	Até 18 g 100 g ⁻¹	2
Açúcares totais	63 g 100 g ⁻¹	3
Açúcares redutores	23 g 100 g ⁻¹	3
Minerais predominantes	2768 mg 100 g ⁻¹ potássio 3974 mg 100 g ⁻¹ zinco	4
Atividade de água	0,283	3
Cinzas	8,2%	3
Umidade	3,4%	3
pH	6,18	3

Referências: 1, Adamafio, N. A. *Theobromine toxicity and remediation of cocoa by- products: an overview. Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013; 2, Bonvehí, J. S.; Coll, F. V. *Protein quality assessment in cocoa husk. Food Research International*, v. 32, n. 3, p. 201-208, 1999; 3, OLIVEIRA, P. Z. *Produção de ácidos orgânicos (cítrico e elágico) a partir de casca de cacau. Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017*; 4, Vriesmann, L. C.; Amboni, R. D. M. C.; Petkowicz, C. L. O. *Cacao pod husks (Theobroma cacao L.): composition and hot-water-soluble pectins. Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1173-1181, 2011.

[012]. A aplicação do ácido cítrico em nutrição animal apresenta efeitos positivos. Em suínos, eleva a taxa de crescimento, bem como aumenta a eficiência alimentar, que propicia uma melhor digestão da matéria seca através da regulação do pH estomacal, também atua na regulação do pH para o controle de doenças, como é o caso de infecções urinárias em fêmeas de suínos (*BORGES, et al. Uso de acidificantes na nutrição de suínos. Revista Nutritime, n. 300, v.12,cp. 4004-4015. 2015; RICE, J. P.; PLEASANT, R. S.; RADCLIFFE, J. S. The Effect of Citric Acid, Phytase, and Their Interaction on Gastric pH, and Ca, P, and Dry Matter Digestibilities. Purdue University Swine Research Report. Purdue University, 2002*).

[013]. O uso do ácido cítrico em ração animal também está relacionado ao controle de qualidade, sua inclusão reduz a proliferação de microrganismos patogênicos, dessa forma, a produção de toxinas microbianas é evitada. Em relação à composição nutricional, o ácido cítrico proporciona uma melhor disponibilidade de elementos indispensáveis, tais como o cálcio, magnésio, fósforo, zinco e proteínas. Estes aspectos contribuem para a manutenção da saúde intestinal e para a questão sanitária da área animal. Estudos relatam que a inclusão de ácido cítrico na dieta, 0,5% em ração e até 0,75% em ração em pellets, eleva a imunidade e o desempenho dos frangos de corte (*ISLAM, K. M. et al. Effect of dietary citric acid on the performance and mineral metabolism of broiler. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, n. 96, v.5, 2012*).

[014]. O produto fermentado por fermentação no estado sólido é um sólido úmido contendo micélio fúngico de cepa reconhecida com GRAS (*Generally Recognized as Safe*), e biomoléculas resultantes de sua fermentação, no caso principalmente o ácido cítrico. Sendo assim, o material fermentado poderia ser seco e aplicado como aditivo em ração animal (*EFSA – European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety and efficacy of citric acid when used as a technological additive (acidity regulator) for all animal species. EFSA Journal, 2015; 13 (2): 4010*).

Descrição da abordagem do problema técnico

[015]. O Brasil é o sétimo produtor mundial de cacau, destacando-se os estados do Pará e da Bahia, e o segundo produtor da América Latina (*PICOLOTTO, A. et al. Cadeia Produtiva do Cacau. Organização Internacional do Trabalho – OIT e Ministério Público do Trabalho – MPT. Novembro, 2018*). De acordo com as informações da pesquisa referente ao mês de Outubro de 2018, realizada pelo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do IBGE, a produção brasileira está estimada em 252.890 toneladas de cacau (*Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – SIDRA, IBGE. Tabela 1618 – Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto das lavouras. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Acesso em: 05dez. 2018*).

[016]. A sua importância econômica está atribuída à produção do chocolate, obtido a partir de suas amêndoas. Tal fração é extremamente valiosa para a indústria e representa apenas 20% de todo o fruto. Devido à subutilização das demais partes do cacau, é frequente encontrar suas cascas – que representam 80% de todo o peso seco do fruto – expostas ao ambiente da própria plantação, suscetíveis às intempéries do tempo e aos ataques microbianos, além da contaminação do solo e da cultura cacaueira. Tal fato, observado no Brasil durante a década de 90, prejudicou as culturas significativamente devido à manifestação da praga denominada “vassoura-de-bruxa”, promovendo a quase extinção do cacau no país (*MIRANDA, S. H. G. A economia da proteção fitossanitária e seus desafios. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/a-economia-da-protecao-fitossanitaria-e-seus-desafios.aspx>>. Acesso em: 05 dez. 2018*). Em relação aos resíduos do cacau, são encontrados números preocupantes, nos quais, para cada 1 tonelada de amêndoas retiradas são geradas aproximadamente 7 toneladas de casca de cacau (*FIGUEIRA, A. et al. New products from Theobroma cacao: seed pulp and pod gum. New Crops. New York: Wiley, p. 475-8, 1993; SODRÉ, G. A. et al. Extrato da casca do fruto*

do cacaueiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacaueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 881-887, 2012).

[017]. Dessa forma, a permanência das cascas na área de plantação tornou-se uma preocupação ambiental, sendo as cascas, por enquanto, somente destinadas para a combustão (DELLA, V. P. et al. *Reciclagem de resíduos agro-industriais: Cinza de casca de arroz como fonte alternativa de sílica. Cerâmica Industrial*, v. 10, n. 2, p. 22-25, 2005; SYAMSIRO, M. et al. *A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. Energy for Sustainable Development*, v. 16, n. 1, p. 74-77, 2012; ODDOYE, E. O. K. et al. *Cocoa and its by-products: identification and utilization. In: Chocolate in Health and Nutrition*, Humana Press, p. 23-37, 2013; BATISTA, R. R. et al. *Routes of technological exploitation of agricultural waste for power generation. Latin American Journal of Energy Research*, v. 2, n. 1, p. 15- 27, 2015). Este fato, recentemente, tem atraído o interesse de estudos sobre possíveis aplicações industriais desse subproduto (ODDOYE, E. O. K. et al. *Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs. Scientific Research and Essays*, v. 5, n. 10, p. 1141-1144, 2010; DINIZ, D. M. et al. *Produção de goma xantana por cepas nativas de Xanthomonas campestris a partir de casca de cacau ou soro de leite. Polímeros*, v. 22, n. 3, p. 278-281, 2012; SODRÉ, G. A. et al. *Extrato da casca do fruto do cacaueiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacaueiro. Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 881-887, 2012; KRISHNA, C. *A research on cocoa pod husk activated carbon for textile industrial wastewater colour removal. International Journal of Research in Engineering and Technology*, v. 3, n. 3, 2014; KARIM, A. A. et al. *Efficay of cocoa pod extract as antiwrinkle gel on human skin surface. Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 15, n. 3, p. 283-295, 2016; ALEMAWOR, F. et al. *Broiler performance on finisher diets containing different levels of either Pleurotus ostreatus-fermented dried cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes. Tropical Animal Health and Production* v. 42, p. 933-939. 2010; ADAMAFIO, N. A. *Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p.

570-576, 2013; KRISHNA, J. I. G.; CHANDRASEKARAN, M. *Biochemical and nutritional aspects of food processing by-products*. In: *Valorization of Food Processing By-Products*. CRC Press, p. 167, 2013). Em relação à sua composição, as cascas de cacau possuem um elevado conteúdo de nutrientes (ADOMAKO, D. *Cocoa pod husk pectin*. *Phytochemistry*, v. 11, n. 3, p. 1145-1148, 1972; BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. *Protein quality assessment in cocoa husk*. *Food Research International*, v.32, n. 3, p. 201-208, 1999; ADAMAFIO, N. A. *Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview*. *Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013), favorável ao desenvolvimento microbiano, principalmente para fungos filamentosos por apresentar aproximadamente 35% de conteúdo lignocelulósico (ALEMAWOR, F. et al. *Broiler performance on finisher diets containing different levels of either *Pleurotus ostreatus*-fermented dried cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes*. *Tropical Animal Health and Production* v. 42, p. 933-939. 2010; ADAMAFIO, N. A. *Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview*. *Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013). Com isso, o presente processo visa o aproveitamento de um resíduo ou subproduto da agroindústria que apresenta composição interessante para o uso de microrganismos como protagonistas na produção de biomoléculas de interesse industrial.

[018]. Esta inovação aplica-se em:

- [019]. Explorar o potencial da casca de cacau como substrato/suporte na produção de ácido cítrico de interesse comercial;
- [020]. Desenvolvimento de bioprocessos de custo reduzido.

[021]. O processo desenvolvido apresenta as seguintes vantagens em relação às técnicas já existentes:

- [022]. Meio fermentativo de baixo custo;
- [023]. Diminuição de problemas ambientais com a utilização de um resíduo;
- [024]. Tecnologia simples;
- [025]. Possibilidade de parceria com as fazendas cacaueiras e empresas produtoras de chocolate, visando o aproveitamento das cascas de cacau remanescentes do processamento do fruto.
- [026]. Desenvolvimento de suplemento para ração animal contendo ácido cítrico impregnado em cascas de cacau.

Descrição detalhada da Invenção

[027]. Inóculo

[028]. O microrganismo utilizado na produção de ácido cítrico é o *Aspergillus niger* CCT 7717 (Certificado SisGen Nº A4D4320), armazenado sob o código LPB B6, obtido pela mutação induzida por radiação UV do microrganismo *Aspergillus niger* CCT 7716 (Certificado SisGen Nº A4D4320), armazenado sob o código LPB BC, isolado do bagaço da cana-de-açúcar. Ambas as linhagens encontram-se depositadas no banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, e estão catalogadas na Coleção de Culturas Tropical, da Fundação Andre Tosello. A cepa é armazenada em tubos inclinados contendo Agar Batata Dextrose, preparado na concentração de 39 g L⁻¹. Após 7 dias de incubação (28-30 °C) os tubos são mantidos sob refrigeração.

[029]. Os inóculos são preparados por meio da produção de esporos em meio sólido contendo Agar Batata Dextrose. São utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio, inoculados em profundidade, permanecendo em estufa a 30 °C durante 7 dias.

[030]. A suspensão dos esporos é preparada a partir da extração dos esporos cultivados em Agar Batata Dextrose com o uso

da solução extratora de Tween 80 0,01%. A suspensão é submetida à contagem de esporos em câmara de Neubauer, para a determinação do volume de inóculo a ser adicionado nos cultivos.

[031]. Meio de produção de ácido cítrico

[032]. O meio de cultura para a produção de ácido cítrico tem como fonte carbono a casca de cacau (Comprovante Cadastro Sisgen A4EC257), bem como suporte para o microrganismo, na quantidade de 3,5 g com 65% de umidade. A solução nutritiva é composta de 1g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,2 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 4% metanol (v/v).

[033]. Produção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido

[034]. O processo de produção de ácido cítrico é realizado em frascos Erlenmeyer, contendo 3,5 g de casca de cacau com 65% de umidade provida da adição de solução nutritiva, descrita acima, e da inoculação com a suspensão de esporos previamente preparada em concentração de 1x10⁷ esporos g⁻¹. Após 7 dias de cultivo em estufa a 30 °C, o conteúdo de ácido cítrico é extraído com 2 g de material fermentado suspenso em 20 mL de água deionizada sob agitação magnética, após a separação das células, a extração é submetida à análise em cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da concentração de ácido cítrico produzida.

[035]. Determinação da concentração de ácido cítrico

[036]. A quantificação do ácido cítrico produzido é realizada em cromatografia líquida de alta eficiência com base no método utilizado por Rodrigues, et al.(2009) (*Rodrigues, C. et al. Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by Aspergillus niger LPB BC mutant using citric pulp. Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 158, n. 1, p. 72-87, 2009). Também é avaliado o consumo de açúcares redutores e totais, utilizando a metodologia de Miller (1959) (*Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959), para se determinar o rendimento do processo fermentativo, o qual é

calculado a partir da relação de conversão do substrato (açúcares totais) em produto (ácido cítrico), considerando o rendimento teórico máximo, em massa molecular, da conversão de glicose em ácido cítrico, equivalente a 1,167. A sequência das etapas do processo de produção de ácido cítrico pode ser observada no Fluxograma 1.

[037]. Figura 1: Fluxograma 1 – Etapas do processo de produção de ácido cítrico a partir de cascas de cacau

[038]. A máxima produção de ácido cítrico é obtida em 72-96 horas, onde ocorre o acúmulo de 978,52 g de ácido kg^{-1} de casca de cacau seca. A máxima produtividade é de 13,59 g de ácido $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ e o pH médio se mantém entre 3,11 e 4 ao final do processo. O perfil de consumo de açúcares mostra que este iniciou em 24 horas e manteve-se em declínio até 48 horas, e ao final do processo, um ligeiro aumento foi observado possivelmente em decorrência da hidrólise das estruturas poliméricas o que leva a esta variação de 40,1 a 21,2 g kg^{-1} para açúcares redutores e de 48,9 a 24,3 g kg^{-1} em relação aos açúcares totais.

[039]. O rendimento do processo fermentativo nas condições citadas alcança 0,8542 g de ácido kg^{-1} de substrato. Tal índice indica que a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 utilizando a casca de cacau como substrato/suporte supera as maiores produções encontradas na literatura, listadas no Quadro 1, demonstrando a alta viabilidade do processo desenvolvido.

Quadro 1 – Maiores taxas de produção de ácido cítrico relatadas na literatura

Microrganismo	Substrato	Produção g kg^{-1}	Referência
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Bagaço de maçã	766 ^a	1
<i>A. niger</i> NRRL 2270		816 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 599		771 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 328		798 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 567		883 ^a	
<i>A. niger</i> NRRL 567	Bagaço de uva	600 ^a	2
<i>A. niger</i> B3 mutante	Polpa cítrica	616,5 ^b	3

Legenda: a: baseado em açúcar consumido; b: baseado em substrato seco.
Referências: 1, Hang, Y. D.; Woodams, E. E. Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v.6, n.11, p. 763-764, 1984; 2, Hang, Y. D.; Woodams, E. E. Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnology Letters*, v.7, n.4, p. 253-254, 1985; 3, Rodrigues, C. et al. Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 158, n. 1, p. 72-87, 2009.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO, UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO/SUPORTE, caracterizado por ser realizado em fermentação no estado sólido, utilizando a casca de cacau como substrato/suporte.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO, UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO/SUPORTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela definição de um meio sólido de produção composto por 3,5 g de casca de cacau em 65% de umidade de solução nutritiva adicionada de fosfato de potássio monobásico, a uma concentração de 1 g l⁻¹, sulfato de zinco heptahidratado, a uma concentração de 0,2 g l⁻¹, e 4% (v/v) de metanol.

3. PROCESSO, de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pela fermentação em estado sólido durar 168 horas, para a produção de ácido cítrico.

4. PROCESSO, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pela produção pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717) em fermentação no estado sólido.

5. PRODUTO COMPOSTO POR ÁCIDO CÍTRICO, de acordo com as reivindicações 1 a 4, composto de casca de cacau fermentada contendo altas concentrações de ácido cítrico para aplicação como aditivo em ração animal.

DESENHOS

Figura 1

Obtenção das cascas de cacau a partir do fruto <i>in natura</i>	• Quebra, separação de amêndoas e limpeza; • Desidratação: estufa Nova Ética 400/ND, circulação de ar a 50 °C/48h; • Moagem: moinho de facas Cienlab Willey DL; • Classificação granulométrica: agitador de peneiras Bertel VP-01, malha USS/ASTM no. 20; • Fração utilizada: partícula de 2,00 – 0,84 mm.
Preparo do inóculo	• Em profundidade em 50 ml de meio PDA; • Mantido em estufa a 30 °C/7 dias; • Suspensão de esporos: agitação magnética com solução de Tween 80 a 0,01%/15 min.
Preparo da solução nutritiva	• KH_2PO_4 1g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L⁻¹, 4% metanol (v/v).
Fermentação em estado sólido	• Frascos de Erlenmeyer, sistema fechado com taxa de inoculação de 10⁷ esporos g⁻¹; • 3,5 g de casca de cacau a 65% de umidade; • Em estufa a 30 °C/7 dias e coleta de amostra a cada 24h.
Extração do material fermentado	• 2 g de amostra em 20 mL de água deionizada com agitação magnética/15 min; • Filtração em um não-tecido TNT; • Centrifugação a 5000 rpm/20 min.
Análises	• pH; • Umidade (IAL, 2008); • Açúcares redutores (MILLER, 1959).
Cromatografia líquida de alta eficiência	• Quantificação em equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna Hi-Plex (300 x 7,7 mm) a 60 °C, regime isocrático de fase móvel H₂SO₄ 0,005 M, vazão de 0,6 ml min⁻¹.
Rendimento do processo fermentativo	• Calculado com base no rendimento teórico máximo, em massa molecular, da conversão de glicose em ácido cítrico, equivalente a 1,167.

RESUMO***PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU***

A presente invenção trata sobre a produção de ácido cítrico utilizando cascas de cacau secas (**Certificado SisGen Nº A4EC257**) como substrato em fermentação sólida. As cascas de cacau são resíduos do processamento do fruto para a obtenção do chocolate, e de modo geral, estas permanecem na própria plantação, sem receber um tratamento adequado. Além de atuar como substrato/suporte sólido, as cascas de cacau foram utilizadas como única fonte de carbono disponível para o microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 (Certificado SisGen Nº **A4D4320**), em percentual de umidade de 65% adicionada de solução salina. Esta invenção descreve um processo simples e de alto rendimento para a produção do ácido cítrico, uma molécula importante e de versatilidade industrial, apresentando uma alternativa de uso aos resíduos da agroindústria, visando contribuir para a minimização dos impactos ambientais.