



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GABRIELA CHAVES DA SILVEIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR PROCESSOS  
FERMENTATIVOS E SEPARAÇÃO CONTÍNUA POR  
PERSTRAÇÃO**

CAMPINAS

2021

GABRIELA CHAVES DA SILVEIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR PROCESSOS  
FERMENTATIVOS E SEPARAÇÃO CONTÍNUA POR  
PERSTRAÇÃO**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia Química  
da Universidade Estadual de  
Campinas, como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção  
do título de Mestra em Engenharia  
Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Coorientador: Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran

Coorientador: Dr. Lucídio Cristóvão Fardelone

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna  
Gabriela Chaves da Silveira e orientada pelo Prof.  
Dr. Gustavo Paim Valença.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Si39p Silveira, Gabriela Chaves da, 1996-  
Produção de ácidos orgânicos por processos fermentativos e separação contínua por perstração / Gabriela Chaves da Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Gustavo Paim Valença.  
Coorientadores: Paulo José Samenho Moran e Lucídio Cristóvão Fardelone.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácidos orgânicos. 2. Fermentação. 3. Biotecnologia. 4. Separação (Tecnologia). I. Valença, Gustavo Paim, 1960-. II. Moran, Paulo José Samenho, 1949-. III. Fardelone, Lucídio Cristóvão. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Production of organic acids by fermentative processes and continuous separation by perstraction

**Palavras-chave em inglês:**

Organic acids

Fermentation

Biotechnology

Separation (Technology)

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Gustavo Paim Valença [Orientador]

Telma Teixeira Franco

Fábio Domingues Nasário

**Data de defesa:** 15-01-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1558-8110>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4706550271809604>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado defendida por Gabriela Chaves da Silveira e aprovada em 15 de janeiro de 2021 pela Banca Examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Presidente e Orientador

FEQ/UNICAMP

Videoconferência

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Teixeira Franco

FEQ/UNICAMP

Videoconferência

---

Dr. Fábio Domingues Nasário

Instituto de Química/UNICAMP

Videoconferência

Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos anjos que me guiam do céu,  
minhas avós, Eva e Lourdes.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser mentor em minha vida.

Aos meus pais, Marcelo e Ilza, por todo apoio, amor e carinho, por serem essenciais na formação da mulher que sou hoje. Sou eternamente grata pela educação e criação que me deram. Sem vocês a realização desta etapa não seria possível!

Aos meus irmãos Ana e Murilo, pela amizade, inspiração e compreensão.

A todos os meus familiares, em especial aos meus tios Cristina, Caio e Rosana (*in memoriam*), professores excepcionais, que sempre demonstraram amor em lecionar e que fizeram os meus olhos brilharem pela carreira acadêmica desde a infância.

Ao meu melhor amigo e companheiro nessa vida, Matheus, por estar sempre ao meu lado, me incentivar nos momentos mais difíceis e comemorar comigo cada obstáculo vencido.

A todos os meus queridos amigos que participaram de cada etapa ao decorrer dos anos de graduação e pós, seja em Campinas, São Carlos ou Araras, vocês estarão sempre no meu coração!

Ao meu orientador Professor Dr. Gustavo Paim Valença, pela orientação, confiança depositada em mim e pela oportunidade que me foi dada.

Ao meu coorientador Professor Dr. Paulo José Samenho Moran por me receber prontamente em seu laboratório, por todos os conselhos e ensinamentos compartilhados comigo.

Ao meu coorientador Dr. Lucídio Cristóvão Fardelone, por ter me recebido de braços abertos desde o início, por sempre se manter presente, pelas inúmeras ideias, conversas, incentivos e conselhos, muito obrigada!

À Doutoranda Taciani Bella, por ter me auxiliado desde o início do projeto, por todos os conselhos profissionais e pessoais, pelo apoio e ajuda nos experimentos, além de todas as nossas chamadas de vídeo e comilanças na feirinha. Obrigada, Taci!

Aos amigos de laboratório do LaBioSin e LEPAC, em especial à Charlene, Gabriela, Fábio, Eraldo, Katherine e Thalita, os dias se tornavam mais alegres com a presença de vocês.

Ao técnico de laboratório Leandro Vilela, por todas as conversas e conselhos nos momentos de café.

Aos alunos de Iniciação Científica que passaram pelo laboratório e contribuíram diretamente para os avanços da pesquisa, Ynae e Danilo.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química e Instituto de Química, por toda a infraestrutura cedida para o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, agradeço o apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 147586/2018-6, para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Os ácidos orgânicos apresentam inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química. Normalmente estes ácidos, como cítrico, itacônico, glucônico e levulínico são obtidos por síntese química ou processos biotecnológicos, no entanto, ao serem produzidos por via biotecnológica, estes bioprodutos são secretados para o meio e, desta maneira, alteram o gradiente de pH, afetando a membrana celular dos microrganismos, dificultando o transporte de nutrientes, o crescimento celular e conseqüentemente, o rendimento do processo. Dessa forma, a busca por novas metodologias e técnicas de produção por via fermentativa é de extrema importância. Assim, este trabalho teve por objetivo desenvolver um processo de fermentação e separação eficientes para a produção destes ácidos orgânicos. A metodologia de separação empregada foi a perstração, uma técnica já desenvolvida pelo grupo de pesquisa e em constante aperfeiçoamento, que possibilita a membrana ser regenerada e reutilizada, fornecendo um *downstream* eficiente e viável economicamente. Fermentações em Erlenmeyers e biorreatores foram realizadas, buscando estabelecer os melhores parâmetros de crescimento dos microrganismos, além da montagem de um sistema de produção de ácidos orgânicos acoplado à perstração. Nos processos fermentativos em batelada os rendimentos de produção dos ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico foram, respectivamente, de 44,7%, 72,4%, >99% e 69%, enquanto o rendimento percentual da perstração atingiu 98%, >99%, 52% e 85%. Já para o sistema de produção acoplado à extração, o rendimento de produção foi de 94% para o ácido levulínico, enquanto a extração chegou a 35% em 96 horas. Os resultados obtidos demonstraram que é possível obter bons rendimentos de produtividade e extração com as técnicas utilizadas, o que abre portas para estudos de escalonamento industrial.

**Palavras-Chave:** ácidos orgânicos, fermentação, perstração.

## ABSTRACT

Organic acids have numerous applications in the food, pharmaceutical and chemical industries. Usually these acids, such as citric, itaconic, gluconic and levulinic are obtained by chemical synthesis or biotechnological processes. However, when produced by biotechnological means, these acids are secreted into the medium and, in this way, change the pH gradient, affecting the cell membrane of the microorganisms, making it difficult to transport nutrients, cellular growth and consequently the yield of the process. Therefore, the search for new methodologies and production techniques through fermentation is extremely important. Thus, this work aimed to develop a viable process of fermentation and separation for these organic acids. The separation methodology employed, was a technique already developed and constantly improving by the research group, the perstraction. This technique provides an efficient and economically feasible downstream because the membrane can be regenerated and reused. Fermentations were carried out in Erlenmeyers and bioreactors, seeking to establish the best growth parameters for microorganisms, in addition to test an organic acid production system coupled to the perstraction. In the batch fermentation processes, the yields of citric, itaconic, gluconic and levulinic acids were, respectively, 44.7%, 72.4%, > 99% and 69%, while the yield of extraction by perstraction reached 98% >99%, 52% and 85%. For the production system coupled to extraction, the production yield was 94% for levulinic acid, while the extraction reached 35% in 96 hours. The results obtained demonstrate that it is possible to obtain good yields of productivity and extraction with the techniques used, which opens doors for studies of scale-up.

**Keywords:** organic acids, fermentation, perstraction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido cítrico. ....	22
Figura 2: Esquema resumido da formação de citrato durante o Ciclo de Krebs (Adaptado de MAGNUSOM e LASURE, 2004).....	23
Figura 3: Estrutura química do ácido itacônico.....	24
Figura 4: Estrutura química do ácido glucônico.....	25
Figura 5: Estrutura química do ácido levulínico. ....	26
Figura 6: Esquema do sistema de produção e extração, com biorreator acoplado à membrana de separação (BELLA de JESUS, 2016).....	32
Figura 7: Estrutura química do solvente 1-octanol.....	33
Figura 8: Estrutura química da tri- <i>n</i> -octilamina .....	34
Figura 9: Esquema de como foi realizado o primeiro sistema de perstração para a extração dos ácidos orgânicos. Sendo (A): Frasco Schott contendo solução padrão com o ácido analisado e (B): Recipiente de extração contendo 1-octanol e NaOH. ....	40
Figura 10: Reações de recuperação do octanol e extração dos ácidos (Adaptado de BELLA de JESUS, 2016). ....	41
Figura 11: Esquema da técnica utilizada para imobilização de células com alginato de sódio. Sendo: (A) Béquer contendo solução de massa de células e alginato; (B) Bomba peristáltica e (C) Béquer contendo solução de cloreto de cálcio, onde são gotejadas as células (Adaptado de SOUSA, 2016).....	42
Figura 12: Esquema da inibição causada pela alta concentração de ácidos em uma célula fúngica (ZHANG E YANG, 2009).....	43
Figura 13: Esquema do sistema de produção em biorreator acoplado à perstração (BELLA de JESUS, 2016). ....	44
Figura 14: Perfil de consumo de glicose e produção de ácido cítrico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol. ....	50
Figura 15: Perfil de consumo de glicose e produção de ácido itacônico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol. ....	51
Figura 16: Perfil de consumo de glicose e produção de ácido glucônico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol. ....	52
Figura 17: Perfil de consumo de glicose e produção de ácido levulínico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol. ....	53

Figura 18: Decaimento da concentração de padrões de ácidos utilizados na perstração. ....	55
Figura 19: Aumento da concentração de ácidos extraídos na perstração. ....	55
Figura 20: Foto representando células de fungo filamentosso immobilizadas em alginato de sódio. ....	56
Figura 21: Perfil de produção de ácido levulínico e consumo de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) em 96h de sistema de produção acoplado à extração. ....	57
Figura 22: Perfil de extração de ácido levulínico através da perstração, em sistema de produção acoplado à extração. ....	58
Figura A-1: Exemplo de curva de calibração para o ácido cítrico. ....	78
Figura A-2: Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido cítrico. ....	78
Figura A-3: Exemplo de curva de calibração para o ácido itacônico. ....	79
Figura A-4: Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido itacônico. ....	79
Figura A-5: Exemplo de curva de calibração para o ácido glucônico. ....	80
Figura A-6: Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido glucônico. Neste caso, as amostras foram analisadas por dois detectores, pois como o ácido glucônico possui o mesmo tempo de retenção da glicose quando utilizado o índice de refração (RID), estas também foram quantificadas por ultravioleta (UV). Dessa forma, é possível se obter o valor de área para a glicose através do índice de refração, descontando-se a área obtida para o ácido glucônico no ultravioleta. ....	80
Figura A-7: Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido glucônico, analisado por detector UV. ....	81
Figura A-8: Exemplo de curva de calibração para o ácido levulínico. ....	81
Figura A-9: Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido levulínico. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de bioprodutos sintetizados por fungos filamentosos (Adaptado de EL-ENSHASY, 2007). .....	28
Tabela 2: Relação de reagentes utilizados nos experimentos.....	35
Tabela 3: Relação dos equipamentos utilizados, com as respectivas fabricantes e modelos. ...	36
Tabela 4: Microrganismos produtores de ácidos orgânicos. ....	37
Tabela 5: Produção de ácido cítrico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.....	47
Tabela 6: Produção de ácido itacônico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.....	47
Tabela 7: Produção de ácido glucônico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyers com diferentes concentrações de 1-octanol.....	48
Tabela 8: Produção de ácido levulínico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.....	48
Tabela 9: Resultados de rendimento e produtividade obtidos pela fermentação em batelada em biorreator, na presença de 1-octanol.....	53
Tabela 10: Rendimento obtido na perstração com solução padrão de cada ácido em 24h.....	54
Tabela 11: Resultados de rendimento e produtividade obtidos no sistema de produção acoplado à perstração. ....	58

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Organização Estrutural da Dissertação .....	15
1.2 Ácidos Orgânicos: Aspectos Gerais.....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Produção de Ácidos Orgânicos por Fermentação .....	19
3.2 Processos de Fermentação .....	20
3.3 Ácido Cítrico.....	22
3.4 Ácido Itacônico .....	24
3.5 Ácido Glucônico .....	25
3.6 Ácido Levulínico .....	26
3.7 Fungos Filamentosos .....	27
3.8 Imobilização de Células Fúngicas .....	30
3.8 Técnicas de Separação .....	31
3.8.1 Separação por Membranas .....	31
3.8.2 Perstração .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 Parte Experimental.....	35
4.2 Reagentes .....	35
4.3 Equipamentos.....	36
4.4 Microrganismos .....	36
4.5 Inóculo .....	37
4.6 Teste de Toxicidade com 1-Octanol em Erlenmeyers .....	38
4.7 Fermentação em Batelada em Biorreator com Células Livres.....	38
4.8 Perstração .....	39
4.9 Imobilização de Células .....	42
4.10 Sistema de Produção Acoplado à Extração .....	43
4.11 Metodologia Analítica .....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 Banco de Células.....	46
5.2 Teste de Toxicidade com 1-Octanol em Erlenmeyers .....	46

5.3 Fermentação em Batelada em Biorreator com Células Livres.....	49
5.4 Rendimento Percentual da Perstração.....	54
5.5 Sistema de Produção Acoplado à Extração com Células Imobilizadas.....	56
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>9. APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMAS.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Organização Estrutural da Dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada na forma de sessões para melhor compreensão, nas quais:

- a) A sessão 1 exibe uma introdução geral sobre os principais ácidos orgânicos de interesse industrial, produzidos por microrganismos;
- b) A sessão 2 apresenta os objetivos da pesquisa desenvolvida;
- c) A sessão 3 envolve uma revisão bibliográfica acerca do tema do trabalho, englobando tópicos como características dos ácidos orgânicos, processos fermentativos de produção e técnicas de separação destes bioprodutos;
- d) A sessão 4 compreende o material e os métodos utilizados para a execução do presente trabalho;
- e) A sessão 5 expõe os resultados obtidos com os experimentos e as discussões;
- f) A sessão 6 contempla as principais conclusões da dissertação, de acordo com os resultados obtidos ao longo do trabalho;
- g) A sessão 7 sugere propostas para futuros trabalhos;
- h) A sessão 8 apresenta as referências bibliográficas utilizadas para a confecção desta dissertação.

### 1.2 Ácidos Orgânicos: Aspectos Gerais

Os ácidos orgânicos são moléculas que variam amplamente de tamanho, desde compostos pequenos como os ácidos cítrico e oxálico até compostos húmicos, com vários grupos carboxílicos e fenólicos (MCMURRY, 2008).

O que caracteriza uma substância como ácido orgânico é a presença de um átomo de hidrogênio positivamente polarizado. São ácidos fracos, que não se dissociam completamente na presença de água e possuem valores de pKa que variam desde 3, carboxílico, a 9, fenólico (MCMURRY, 2008; FOX e COMERFORD, 1990 *apud* RICHTER *et al.*, 2007).

Os ácidos como cítrico, itacônico, glucônico e levulínico são integrantes de um importante nicho de bioprodutos e por apresentar em sua estrutura grupos funcionais, podem ser transformados em diversos produtos nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica

(BAFANA e PANDEY, 2018; KRULL *et al.*, 2017; SAHA, 2017; CAÑETE-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016; PAL, KUMAR e BANERJEE, 2016; RAMIREZ, 2015; CONNOR, 2007).

Com a crescente demanda por processos ambientalmente sustentáveis, a produção microbiana de ácidos orgânicos é uma abordagem extremamente importante para se obter produtos de valor agregado, a partir de fontes de carbono renováveis (ALONSO, DE LA VEJA e DÍAZ, 2015). Alguns processos de produção de ácidos orgânicos por biotecnologia já são bem estabelecidos, entretanto, novos bioprocessos, que podem ser viáveis, estão em fase de estudos para adaptação em larga escala (JANG *et al.*, 2012; SAUER *et al.*, 2008).

O processo microbiano mais antigo para a produção de ácidos orgânicos é a produção do ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*, capaz de produzir altos volumes do produto a um custo baixo (BEROVIC e LEGISA, 2007).

Encontrado principalmente em frutas cítricas, como a laranja e o limão, também é produzido através do metabolismo de fungos como *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium luteum*, *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus niger*. Por ser um ácido com características como baixa toxicidade, palatabilidade e a assimilação pelo organismo humano de forma segura, é largamente utilizado na indústria alimentícia como agente acidulante, flavorizante, antioxidante, conservante, emulsificante, tamponante, sequestrante, quelante, entre outras aplicações (CIRIMINNA *et al.*, 2017; COSTA, 2011; PASTORE, HASAN e ZEMPULSKI, 2011; CONNOR, 2007).

Já o ácido itacônico ( $C_5H_6O_4$ ), é produzido pelo processo metabólico de microrganismos como o *Aspergillus terreus*, *Aspergillus itaconicus*, *Ustilago maydis*, *Pseudozyma antarctica* e *Candida sp.* Por apresentar alta biodegradabilidade, é amplamente aplicado na indústria para a síntese de resinas, bioplásticos, poliésteres, material absorvente e na preparação de compostos ativos usados na agricultura e em medicamentos (BAFANA e PANDEY, 2018; KRULL *et al.*, 2017; SAHA, 2017; RAMIREZ, 2015; PEDROSO, 2014; TAKAYA, 2014).

Enquanto o ácido glucônico ( $C_6H_{12}O_7$ ) e seus derivados, apresentam uma importante característica de enaltecer e preservar propriedades sensoriais de muitos produtos. Por ser considerado um ácido fraco, não volátil, atóxico e capaz de formar complexos solúveis em água com íons metálicos bivalentes e trivalentes, é amplamente utilizado como aditivo em indústrias farmacêuticas, têxteis e alimentícias (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Presente em diversos alimentos, como frutas, arroz, carnes, vinho, mel e vinagre, esse ácido pode ser produzido naturalmente através do metabolismo de bactérias como *Pseudomonas ovalis*, *Acetobacter methanolicus*, *Zymomonas mobilis*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter suboxydans*, *Azospirillum brasiliense*

e de fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium variabile* e *Penicillium amagasakiense*, (CAÑETE-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016; PAL, KUMAR e BANERJEE, 2016; LOPES, 2011; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

O ácido levulínico ( $C_5H_8O_3$ ), conhecido também como ácido 4-oxipentanóico ou ácido gama cetovalérico, é um composto com cinco carbonos, identificado como um dos principais produtos químicos de atual interesse (SAUER *et al.*, 2008). É um ácido fraco, obtido principalmente da hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar, sendo altamente solúvel em água, etanol, éter dietílico, clorofórmio e acetona (MUKHERJEE, DUMONT e RAGHAVAN, 2015). Este ácido possui inúmeras aplicações na indústria, como na síntese de solventes, pesticidas, polímeros, aditivos de combustíveis e na indústria farmacêutica (ANTONETTI *et al.*, 2016).

A produção de ácido levulínico a partir da biomassa lignocelulósica e resíduos ricos em amido é de grande interesse industrial, por ser ambientalmente benigno e comercialmente viável (GAUDERETO, 2017).

Embora estes ácidos apresentem processo de produção já estabelecidos na indústria, por rotas enzimáticas ou fermentativas, ainda existe a necessidade de desenvolvimento de métodos para aumento de produtividade (WASEWAR e PANGAKAR, 2006). Por serem ácidos fracos, não se dissociam e passam através da membrana celular liberando prótons no citoplasma, o que altera o gradiente de pH através da membrana, comprometendo a transferência de nutrientes e inibindo o crescimento dos microrganismos, resultando em baixa produtividade (ZHANG e YANG, 2009).

Sendo assim, buscam-se atualmente técnicas de separação, que proporcionem o aumento da produtividade destes processos fermentativos. Entre os métodos de separação de ácidos orgânicos estudados está a técnica de extração denominada perstração, que consiste em uma extração com solventes orgânicos utilizando uma membrana líquida como barreira e a qual funciona por diferença de gradiente de pH (BELLA de JESUS, 2016).

Os ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico são produtos de alto valor agregado, devido às suas propriedades e aplicações industriais, sendo objetos de estudo neste projeto através do desenvolvimento de bioprocessos para viabilização produtiva e separação pela técnica denominada perstração.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver processos fermentativos para a produção dos ácidos cítrico, glucônico, itacônico e levulínico, sendo separados e parcialmente purificados ao final do processo, através do uso da técnica de perstração.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Para o alcance do objetivo proposto, o projeto de pesquisa foi dividido nas seguintes etapas:

- a) Preparação do banco de células para cada microrganismo utilizado;
- b) Estabelecimento do meio de cultura adequado para a produção de cada ácido orgânico estudado;
- c) Fermentação em biorreator com acompanhamento online, para estabelecimento dos parâmetros ideais de produção de cada ácido;
- d) Realização da perstração com soluções padrão de cada ácido para cálculo de rendimento percentual e avaliação de sua eficácia de extração;
- e) Fermentação em sistema de produção acoplado à extração contínua, para avaliação de rendimento e produtividade.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Produção de Ácidos Orgânicos por Fermentação

A fermentação é um processo metabólico de obtenção de energia a partir de compostos orgânicos. Ocorre através da atuação de enzimas, incluindo uma série de reações químicas para decompor a glicose, através do metabolismo de leveduras, fungos ou bactérias (TAKAHASHI *et al.*, 2017; MCKENDRY, 2002).

Como exemplos de fermentações aplicadas comercialmente em larga escala cita-se a produção de bioetanol a partir de diversas fontes de carbono, como a cana-de-açúcar, a beterraba ou o milho e a produção de ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas, aminoácidos, entre outros (BALAMAN, 2019; MARZO *et al.*, 2019; ZHAO, DAMGAARD e CHRISTENSEN, 2018; BARRIO-GONZÁLEZ e MEJÍA, 2008; CARVALHO *et al.*, 2005; LEUCHTENBERGER, HUTHMACHER e DRAUZ, 2005; MCKENDRY, 2002; PANDEY *et al.*, 1999).

De acordo com Kim *et al.* (2018), o mercado global de ácidos orgânicos tem expectativa de atingir U\$ 12,54 bilhões em 2026. Em 2015, a produção de ácidos orgânicos era de U\$ 6,55 bilhões com expectativas de atingir U\$ 9,29 bilhões em 2021, seguindo uma taxa de crescimento anual de 6%. No mesmo ano, a maior produtora de ácidos orgânicos era a região Ásia-Pacífico, sendo a China, o país de maior destaque (PANDA *et al.*, 2020; MARKETS AND MARKETS, 2015).

Os ácidos orgânicos fazem parte de um grupo de químicos chamado “blocos construtores” (*building blocks*) que podem ser obtidos por processos microbiológicos e recebem essa denominação, por serem utilizados na síntese de diversos outros produtos de interesse comercial. Desta maneira, a produção microbiana de ácidos orgânicos é de extrema importância, devido aos inúmeros microrganismos capazes de sintetizá-los em larga escala e a crescente demanda pelos mesmos (NARAIAN e KUMARI, 2017).

Os processos fermentativos podem ser conduzidos de diversas formas, sendo as mais utilizadas a fermentação descontínua, descontínua alimentada e contínua. A preferência por um processo descontínuo ou contínuo dependerá da possibilidade de se prolongar ao máximo o tempo de operação, mantendo-o em condições de elevado rendimento quanto ao produto desejado e isento de contaminações (CNPEM, 2017; SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

### 3.2 Processos de Fermentação

Os processos fermentativos podem ser classificados em relação ao regime, podendo ser em batelada ou descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo. O processo fermentativo ideal para a obtenção de cada produto vai variar de acordo com as necessidades dos microrganismos utilizados e as instalações disponíveis.

De modo geral, durante um processo fermentativo em batelada, nenhum substrato é adicionado durante a fermentação, além disso, também não há a remoção de produtos e o inóculo permanece o mesmo durante todo o tempo de processo. Entre as vantagens deste tipo de condução, está principalmente o baixo risco de contaminação e a grande flexibilidade de operação, entretanto, a fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos, isso, porque, ao se adicionar todo substrato na dorna de uma só vez, uma inibição de crescimento pode ser ocasionada ao microrganismo. Ainda, os processos em batelada apresentam “tempos mortos”, quando a dorna não está sendo utilizada para a fermentação propriamente dita, como durante a lavagem e esterilização, o que limita a sua utilização (CARVALHO E SATO, 2001).

Já quando o processo ocorre em batelada alimentada, há a adição de um ou mais elementos durante a fermentação e os produtos não são removidos. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, assim como a adição de mosto pode ocorrer de forma contínua ou intermitente. Neste processo, é possível realizar um controle da concentração de substrato no fermentador, tornando possível o deslocamento do metabolismo microbiano para uma determinada via metabólica de interesse, o que leva ao acúmulo do produto desejado. Entre as vantagens apresentadas pelo uso da batelada alimentada, destacam-se o aumento da concentração celular nas dornas e o controle da vazão de alimentação, o que evita que ocorra uma inibição no metabolismo dos microrganismos, favorecendo um aumento nos rendimentos e minimizando a formação de produtos tóxicos (CARVALHO E SATO, 2001).

O processo de fermentação contínua é caracterizado por possuir uma alimentação contínua de caldo nutriente, a uma determinada vazão constante através da retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001). A manutenção do volume constante é fundamental para que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, onde as variáveis de estado (concentração de biomassa, substrato e produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do processo. Com isso, a utilização do sistema contínuo pode apresentar uma redução de custos de 50 a 60%, quando comparado com a fermentação em batelada (CNPEM, 2017; SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Em relação aos outros tipos de condução de processos fermentativos, o sistema contínuo apresenta como vantagens: o aumento da produtividade do processo, com redução dos tempos mortos; obtenção de caldo fermentado uniforme, o que diminui o número de operações unitárias necessárias nas etapas de recuperação e purificação do produto (*downstream*); manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo interessante no estudo de mecanismos de regulação metabólica e otimização da composição do meio de cultura; possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção; maior facilidade no emprego de controles avançados; menor necessidade de mão de obra (FACCIOTTI, 2001).

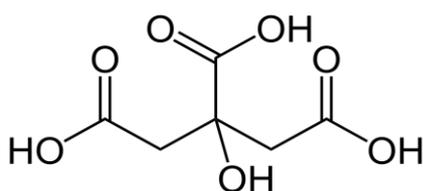
Entre as desvantagens desse tipo de condução de processos fermentativos, pode-se destacar um maior investimento inicial na planta; possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas nos microrganismos; maior ocorrência de contaminações; dificuldades de manutenção de homogeneidade no reator, ao se trabalhar com baixas vazões; ocorrência de formação de espuma e crescimento do microrganismo nas paredes do reator ou ainda em locais de entrada e saída de líquidos (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Entretanto, a maioria das desvantagens apresentadas pelo processo contínuo, podem ser contornadas com o controle dos parâmetros fermentativos e aplicadas em escala industrial. Os autores Bizukojc e Ledakowickz (2004), por exemplo, retratam a diferença na assimilação de glicose e frutose por *Aspergillus niger*, quando utilizada a sacarose como substrato. É demonstrado que a frutose é menos absorvida quando há alta concentração de ácido no meio de cultura, o que poderia ser contornado ao se utilizar um processo com constante remoção do produto.

Por fim, a condução de uma fermentação de forma semicontínua se caracteriza pela ocorrência de três etapas: o inóculo e o meio de cultura são adicionados; aguarda-se o término da fermentação; retira-se parte do meio e adiciona-se um volume igual ao que foi retirado, empregando-se uma vazão muito elevada, fazendo com que este processo ocorra de forma quase instantânea. Este tipo de condução possibilita a colocação de várias dornas em série, onde a primeira é periodicamente esvaziada e alimentada com o inóculo do microrganismo em estoque, sendo intermitentes os fluxos de entrada e saída de líquido no reator. Apesar de ser pouco empregada, a fermentação semicontínua apresenta como vantagem a possibilidade de operar o fermentador por longos períodos sem que seja necessário preparar um novo inóculo; o aumento da produtividade do reator apenas modificando-se o cronograma do trabalho e possibilidade de uma vez, conhecidas as melhores condições de operação, aumentar os rendimentos (BORZANI, 2001).

### 3.3 Ácido Cítrico

O ácido cítrico (2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico), Figura 1, também denominado como citrato de hidrogênio, é extensamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química, em razão de suas características únicas (WANG *et al.*, 2017). É um importante produto comercial, com uma produção global acima de um milhão de toneladas/ano (KHOSRAVI-DARANI e ZOGHI, 2008).



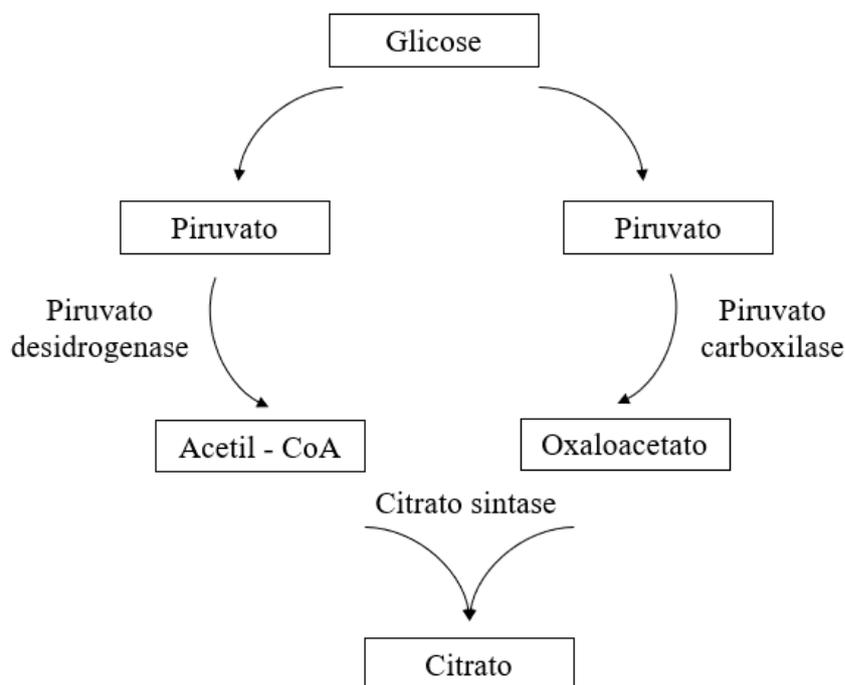
**Figura 1:** Estrutura química do ácido cítrico.

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, tendo seu polo de produção biotecnológica localizado na China (AMATO, BECCI e BEOLCHINI, 2020; DHILLON *et al.*, 2013). A demanda global continua evoluindo simultaneamente aos avanços nas áreas de nanomedicina, desenvolvimento de fármacos e biotecnologia. Conseqüentemente, a eficiência da biossíntese do ácido cítrico é muito importante para cobrir a demanda mundial.

Suas características permitem diversas aplicações, onde 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 e na agricultura para a biorremediação de metais pesados no solo (FRANÇA, 2016; DHILLON *et al.*, 2011; EL-BONDKLY, 2006; SOCCOL; VANDENBERGHE e RODRIGUES, 2006; KAMZOLOVA *et al.*, 2003; KARAFFA e KUBICEK, 2003; VANDENBERGHE *et al.*, 2000).

O ácido cítrico é produzido principalmente pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*, em fermentação submersa utilizando meios com amido ou sacarose (ANDERSEN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2003).

Este ácido é sintetizado durante o Ciclo de Krebs ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) dentro da célula fúngica e é secretado ao meio, onde se acumula em concentrações que podem exceder 200 g/L sob certas condições e utilizando cepas de alta produção (STEIGER *et al.*, 2018; KARAFFA e KUBICECK, 2003). A Figura 2 demonstra de forma resumida, como o ácido cítrico é produzido durante o Ciclo de Krebs.

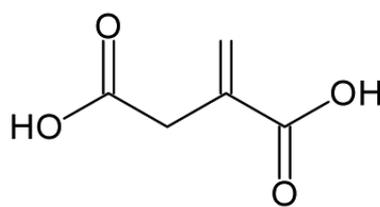


**Figura 2:** Esquema resumido da formação de citrato durante o Ciclo de Krebs (Adaptado de MAGNUSOM e LASURE, 2004).

A produção de ácido cítrico a partir da glicose ou sacarose envolve uma série de etapas enzimáticas ocorrendo em dois diferentes componentes celulares, chamados de citosol e mitocôndria. A glicose é absorvida no interior da célula e pela via glicolítica no citosol, é convertida em duas moléculas de um ácido com três carbonos, denominado piruvato. Uma molécula de piruvato é oxidada pelo complexo piruvato desidrogenase na mitocôndria, com a formação de Acetil-CoA, e outra é carboxilada em oxaloacetato no citosol, pela enzima piruvato carboxilase. Em seguida, o oxaloacetato precisa ser condensado com o Acetil-CoA para a formação do citrato, essa reação é catalisada pela enzima citrato sintase. O produto é transportado para fora da mitocôndria e por fim, para fora da célula (MAGNUSON e LASURE, 2004).

### 3.4 Ácido Itacônico

O ácido itacônico (ácido 2-metilenobutanodióico), Figura 3, também conhecido como ácido metileno succínico e seus derivados, são importantes componentes da indústria química e possuem diversas aplicações na indústria têxtil e farmacêutica. É um ácido dicarboxílico insaturado, cujo grupo metileno pode participar de reações de polimerização, o que o torna atrativo na produção de polímeros sintéticos. Em contraste com os ácidos cítrico e glucônico, o ácido itacônico é utilizado exclusivamente em aplicações não-alimentares, como na síntese de plásticos acrílicos, látex, agentes desincrustantes e substâncias absorventes. Também possui outras aplicações em embalagens de alimentos, produtos farmacêuticos, detergentes, tintas e revestimentos, emulsificantes, herbicidas e produtos químicos para impressão (LIMA, 2019; SINGH *et al.*, 2017; STEIGER; MATTANOVICH; SAUER, 2017).



**Figura 3:** Estrutura química do ácido itacônico.

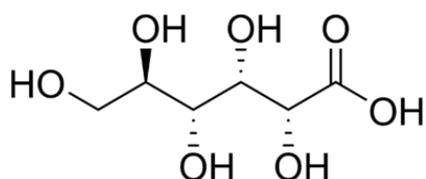
O ácido itacônico foi considerado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos como uma das doze matérias-primas mais promissoras que podem ser produzidas através de bioprocessos. As aplicações do ácido itacônico vêm sendo estendidas para o campo biomédico, onde tem potencial para ser aproveitado nos setores de odontologia e oftalmologia (LIMA, 2019; NARAIAN e KUMARI, 2017).

Entre os microrganismos utilizados na produção de ácido itacônico, cita-se o *Ustilago zae*, *U. maydis*, *Candida sp* e *Aspergillus sp*. O mercado anual de cerca de 80.000 toneladas é atualmente atendido pela fermentação de fungos, que depende de microrganismos do gênero *Aspergillus sp*. O *Aspergillus terreus* é o principal microrganismo produtor do ácido itacônico comercial, com uma concentração de até 80 g/L (BECKER *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2015; OKABE *et al.*, 2009; WERPY e PETERSEN, 2004).

A via bioquímica de produção do ácido itacônico pelo *Aspergillus terreus* segue uma rota paralela à produção de ácido cítrico pelo *Aspergillus niger*, acrescentando duas etapas: desidratação do citrato pela aconitase, formando o *cis*-aconitato e descarboxilação pela *cis*-aconitato descarboxilase para formação do ácido itacônico (MAGNUSON e LASURE, 2004).

### 3.5 Ácido Glucônico

O ácido glucônico (ácido-2,3,4,5,6-penta-hidroxi-hexanoico), Figura 4, é um ácido carboxílico multifuncional, utilizado principalmente na indústria alimentícia, farmacêutica e de construção. Possui aplicações como aditivo no cimento para aumentar a força e resistência à água. É um ácido orgânico não volátil, não corrosivo e não tóxico, utilizado para suavizar o sabor azedo em produtos alimentícios (AHMED *et al.*, 2015 *apud* SINGH *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Estrutura química do ácido glucônico.

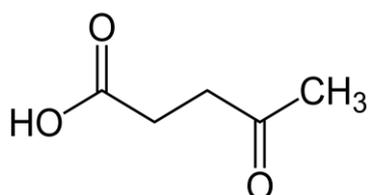
O bioprocesso de produção de ácido glucônico a partir de glicose, utiliza principalmente espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e espécies bacterianas, como as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Acetobacter* e *Gluconobacter* (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Diferentes sais de ácido glucônico são utilizados na indústria farmacêutica para o tratamento de deficiências, assim como em suplementos de cálcio e ferro. O gluconato de zinco é utilizado na cura de diversas doenças, como por exemplo, a letargia mental causada pela deficiência de zinco. Sua propriedade de sequestrar o ferro em uma ampla gama de pH é explorada na indústria têxtil, onde previne a deposição de ferro e para a desengomagem de tecidos de poliéster ou de poliamida. De acordo com um estudo, o valor de mercado global de ácido glucônico tende a crescer a uma taxa de crescimento composta de 9.1% durante o período de 2016 a 2021, estimando atingir uma produção de 100.000 toneladas (STEIGER; MATTANOVICH; SAUER, 2017; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Diferente do processo de produção de ácido cítrico, onde a glicose é absorvida pelo organismo, convertida em ácido cítrico e exportada, o ácido glucônico é produzido no meio extracelular. A glicose do meio é oxidada em uma reação de duas etapas em ácido glucônico, pela ação da glicose oxidase. Este ácido, em condições apropriadas, também pode ser produzido pelas ações das enzimas glicose oxidase e catalase isoladas de *A. niger*, sem a presença de células (MAGNUSON E LASURE, 2004).

### 3.6 Ácido Levulínico

O ácido levulínico (ácido 4-oxopentanóico), Figura 5, é um composto cristalino incolor. Apresenta um grupo cetona e um grupo ácido carboxílico que fazem com que este possa participar de diversas reações químicas.



**Figura 5:** Estrutura química do ácido levulínico.

Devido ao fato de seus dois grupos metílenos se encontrarem entre uma carbonila e uma carboxila, eles possuem reatividades diferenciadas (BEVILAQUA, 2010). Sendo assim, essas características fazem do ácido levulínico, um composto químico versátil e com potencial para a síntese de vários compostos orgânicos, bem como sua implementação como biocombustível (MORONE *et al.*, 2015). O metiltetrahidrofurano (MeTHF), um derivado do ácido levulínico, pode ser combinado em até 50% com gasolina para aumentar o desempenho de veículos e reduzir as emissões de carbono (GODAR, 2016).

Identificado em 1870, diversas rotas para a síntese do ácido levulínico podem ser encontradas na literatura. Entre os mais variados métodos, a rota mais comum, é utilizando a biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar, sendo a hidrólise ácida da celulose a mais reportada (BOMGARDNER, 2015).

Resíduos ricos em amido e biomassa lignocelulósica chamam muita atenção como matéria-prima para a produção de ácido levulínico devido à renovabilidade, abundância, baixo valor e natureza neutra em carbono (KIMURA *et al.*, 2014).

O processo de obtenção do ácido levulínico através da hidrólise de biomassa lignocelulósica segue uma via de reação complexa, envolvendo diversos produtos intermediários. Primeiramente, a fração de celulose é hidrolisada em glicose e convertida em 5-hidroxiacetilfurfural (HMF). Em seguida, ocorre a conversão do produto intermediário HMF, levando à formação de ácido levulínico e ácido fórmico, na razão molar de 1:1 (GIRISUTA *et al.*, 2013). Durante a hidrólise ácida, diferentes compostos derivados da lignina podem ser formados, o que aumenta ainda mais a complexidade de produtos indesejados, como é o caso da humina (GAUDERETO, 2017; PATIL, 2011).

No entanto, esta técnica é relativamente cara e prejudicial ao meio ambiente, o que torna atrativa a busca de alternativas de degradação bioquímica da celulose. Isso pode ocorrer através da ação catalítica de enzimas denominadas celulasas, que estão presentes em microrganismos, como bactérias e fungos. O mecanismo de degradação da celulose por enzimas celulasas não está totalmente desvendado até o momento, porém sabe-se da ocorrência dessas enzimas em fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma viride* (van WYK e SIBIYA, 2001).

A companhia GFBiochemicals (2015) estima que a produção de ácido levulínico atinja 50.000 toneladas por ano, no período de 2020 a 2025 e de acordo com a Global Market Insights (2019) a utilização do ácido levulínico em diversas aplicações como na agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica deve crescer 6% entre 2014 e 2020 com um mercado global reportado em U\$ 26,3 milhões em 2018 e com uma expectativa de se atingir U\$ 34,5 milhões até 2024. Entretanto, os preços deste composto ainda são altos, o que o faz perder em competitividade com os intermediários derivados de petróleo (MUKHERJEE, DUMONT e RAGHAVAN, 2015; PATEL, SERRANO-RUIZ e DUMESIC, 2010). Sendo assim, a produção de ácido levulínico com menores custos, deve aumentar muito o seu uso como um produto químico, o que intensifica as pesquisas na área (KUMAR; SHENDE e WASEWAR, 2020; GAUDERETO, 2017).

O ácido levulínico ainda apresenta potencial como intermediário na produção de diversos químicos com alto valor agregado e variadas aplicações. É citado na síntese de  $\gamma$ -valerolactona (GVL), ésteres de levulinato, ácido succínico, ácido difenólico e combustíveis de hidrocarbonetos (DUTTA *et al.*, 2020; DUTTA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2017; ANTONETTI *et al.*, 2016).

### **3.7 Fungos Filamentosos**

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais utilizados nos processos de biotecnologia industrial. Fazem parte do grupo microbiano com o maior número de espécies e apresentam diversas variações quanto à morfologia e aos atributos fisiológicos e bioquímicos. São denominados assim, pois se desenvolvem formando massas visíveis a olho nu denominadas de micélio, composta por longos filamentos chamados de hifas que se ramificam e se entrelaçam (TAKAHASHI *et al.*, 2017; RAMIREZ, 2015; COLEN, 2006).

Desde a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1929, a partir da espécie *Penicillium crysogenum*, diversos outros bioativos metabólicos produzidos por fungos foram

identificados. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de produtos biotecnológicos que podem ser sintetizados pelo metabolismo de fungos filamentosos.

**Tabela 1:** Exemplos de bioprodutos sintetizados por fungos filamentosos (Adaptado de EL-ENSHASY, 2007).

<b>Produtos</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Antibióticos</b>	
Penicilina G e V	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina C	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>
Penicilina N	<i>Emericellopsis sp.</i>
Pleuromutilina	<i>Pleurotus mutilus</i>
Ciclosporina A	<i>Tolepocladium inflatum</i>
Ciclosporina A e B	<i>Cylinrocarpum lucidum</i>
<b>Enzimas</b>	
Glicose oxidase, pectinase e fitase	<i>Aspergillus niger</i>
Xilanase e invertase	<i>Aspergillus awamori</i>
$\alpha$ -Amilase e glicoamilase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Celulase e hemicelulase	<i>Trichoderma reesei</i>
<b>Ácidos Orgânicos e Outros produtos</b>	
Riboflavina	<i>Ashbya gossypi</i>
Ácido cítrico e glucônico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido kójico e biotina	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>
Pululana	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Biotina	<i>Fusarium culmorum</i>
Alcalóide ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i>
Ácido linoléico	<i>Martierella isabellina</i>
$\beta$ -caroteno	<i>Phycomyces blakesleanus</i>
Interleucina-6 humana	<i>Aspergillus nidulans</i>

Entre um dos gêneros de fungos com maior potencial biotecnológico, o *Aspergillus*, é composto por microrganismos da ordem *Eurotiales*, que são saprófitos anamorfos e compreendem entre 260 e 837 espécies, com aproximadamente dez diferentes gêneros teleomorfos (van LEEUWEN *et al.*, 2013). São os fungos mais abundantes no mundo e podem ser encontrados em diversos tipos de substrato. Não são seletivos, crescem em ambientes e

condições abióticas de pouca umidade e resistem à temperaturas de 6 - 55 °C (KRIJGSHELD *et al.*, 2013).

Pesquisas indicam que algumas espécies deste gênero podem ser patógenas de plantas, ou causar aspergilose em animais e humanos com o sistema imune comprometido (PAWAR *et al.*, 2008; PITT, 1994). Os *Aspergillus* secretam uma grande quantidade de enzimas como amilases, xilanases e pectinases, além de diversos metabólitos como ácidos orgânicos, tornando espécies como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae* e *A. terreus*, atrativas no desenvolvimento de bioprocessos (PARK *et al.*, 2017; MEYER, WU e RAM, 2011).

O *Aspergillus niger* é uma das espécies mais utilizadas na biotecnologia industrial em cultivos submersos e estado sólido devido à sua eficiente produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos, com destaque para a produção de ácido cítrico (ANDERSEN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2003).

O *Aspergillus terreus* também conhecido como *Aspergillus terrestris*, é um fungo que pode ser encontrado no solo, em diversos países, e que atua como produtor de vários tipos de compostos bioativos anticancerígenos. *Aspergillus terreus* é um fungo saprotrófico, com efeitos nocivos e benéficos (SAMSON *et al.*, 2011). Pode produzir metabólitos secundários como patulina, citrinina e gliotoxina (GT), que são prejudiciais aos seres humanos e é um patógeno oportunista que causa aspergilose pulmonar invasiva em pacientes imunocomprometidos (PASTOR e GUARRO, 2014; WALSH e GROLL, 2001).

Em contraste, *A. terreus* produz o princípio ativo lovastatina, redutor de colesterol, e outros compostos bioativos benéficos (GUO e WANG, 2014; SAMSON *et al.*, 2011; SALLAM, *et al.*, 2003). As cepas de *A. terreus* também são utilizadas para a produção de compostos orgânicos, como o ácido itacônico via processo fermentativo (NADUMANE, VENKATACHALAM e GAJARAJ, 2016).

Da mesma ordem que o *Aspergillus*, o gênero *Penicillium* foi classificado como pertencente ao filo *Ascomycota*, ao subfilo *Pezizomycotina*, à classe *Eurotiomycetes*, e à família *Trichocomanaceae* (PITT, 1994). São fungos conhecidos há mais de 200 anos e comuns, ocorrendo em diferentes habitats como o solo, ar e vegetação. Desde a sua identificação, mais de 1000 nomes foram introduzidos ao gênero (VISAGIE *et al.*, 2014; MONTEIRO, 2012).

Os fungos filamentosos *Penicillium purpurogenum* e *Penicillium funiculosum* têm atraído muita atenção atualmente, devido ao seu uso na produção de diversos metabólitos secundários com atividades biológicas antivirais, antifúngicas, fitotóxicas e citotóxicas. O *Penicillium funiculosum* ainda é reportado na produção de importantes enzimas denominadas celulases (SUN *et al.*, 2016; VAN WYK e SIBIYA, 2016; ZHOU *et al.*, 2015).

### 3.8 Imobilização de Células Fúngicas

Os fungos são microrganismos que apresentam uma morfologia bastante complexa com estruturas celulares diferentes em cada etapa do seu ciclo de vida. Em geral, a maioria dos processos fermentativos industriais convencionais faz o uso de células livres em suspensão, porém, o uso de microrganismos imobilizados, como os fungos, permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração celular, o que garante a síntese de metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação (COVIZZI *et al.*, 2007; PRASAD *et al.*, 2005; FREEMAN e LILLY, 1998).

A imobilização de células pode ser definida como o confinamento físico de células intactas em uma determinada região, sem perda de atividade biológica. O uso de técnicas de imobilização celular em bioprocessos possui muitas vantagens em relação ao uso de células livres. Isso se deve ao fato de a imobilização facilitar a separação das células do caldo fermentativo, auxiliando na isolamento e na purificação dos produtos, além de possibilitar a reutilização das células imobilizadas. Essa técnica ainda diminui o tempo de cultivo em batelada alimentada ou operação contínua, o que conseqüentemente reduz os custos de produção (WILLAERT, 2011; EL-ENSHASY, 2007).

Em geral, existem dois métodos para imobilização, o aprisionamento, onde microrganismos são aprisionados em esferas de gel, como o alginato de cálcio, e a adsorção, onde a afinidade química ou física “liga” as células ao material de suporte (EL-ENSHASY, 2007).

O alginato é definido como um polissacarídeo constituído por unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico. Uma desvantagem do uso de géis de alginato para imobilização celular, é que eles podem ser quimicamente instáveis na presença de alguns componentes do meio de cultura, como íons fosfato e citrato, o que pode ocasionar a ruptura ou até a dissolução do gel. Para contornar este problema, é retratado o uso de sais de bário ou o tratamento com quitosana, que podem aumentar a resistência do gel (GUO *et al.*, 2006; YOO *et al.*, 1996).

No processo definido como encapsulação, as células microbianas são colocadas em uma solução de cloreto de cálcio, a qual é gotejada em uma solução polimérica, formando a cápsula envoltória. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  promove a formação de ligações iônicas, que resultam na formação de um gel consistente e insolúvel (WANG *et al.*, 2005).

### 3.9 Técnicas de Separação

#### 3.9.1 Separação por Membranas

Membranas são barreiras semipermeáveis de separação física entre duas fases utilizadas em processos de separação seletiva dos componentes de misturas. Esses processos são caracterizados pela passagem de uma suspensão ou solução através de uma membrana, ocorrendo separação seletiva dos componentes, sob o efeito de uma força motriz que proporcione o transporte de matéria (ARMOA e JAFELICCI JUNIOR, 2011; SANTOS, 1999; BHAVE, 1991).

Os processos de separação por membranas utilizam como barreira seletiva membranas sintéticas, nas quais tenta-se reproduzir as características desejáveis das membranas naturais (biológicas), principalmente as de permeabilidade e seletividade. Tais sistemas são utilizados para separar da água substâncias e sólidos que têm pequenos diâmetros, além de moléculas e compostos iônicos, através da aplicação de algum tipo de força externa. As forças externas utilizadas na filtração em membranas podem ser a pressão, a sucção ou ainda o potencial elétrico (HABERT, 2006; SCHNEIDER e TSUTYIA, 2001).

A morfologia da membrana e a natureza do material que a constitui definem o tipo de aplicação na qual ela pode ser utilizada e a eficiência da separação. Existem diversos processos utilizando membranas, os quais são baseados em diferentes mecanismos de separação e que são capazes de fracionar espécies de distintos tamanhos, variando desde partículas até a um nível molecular (SCOTT e HUGHES, 1996).

O que determina uma microfiltração ou ultrafiltração, é o tamanho do poro da membrana. Sendo assim, membranas utilizadas na microfiltração por exemplo, possuem tamanhos de poros que variam de 0,1 a 5  $\mu\text{m}$ , sendo utilizadas para a separação de partículas, esterilização bacteriana, clarificação de vinhos e cervejas e concentração de células. Já a ultrafiltração, faz o uso de membranas com poros de 50 a 3 nm e é utilizada para o fracionamento ou concentração de macromoléculas como proteínas e na recuperação de pigmentos e de óleos (BELLA de JESUS, 2016; HABERT, 2006).

Membranas porosas possuem um coeficiente de transferência de massa dez vezes maior que membranas sem poros, o que implica em um fator de dez reduções no tamanho da membrana e nos custos (OUTRAM, 2018).

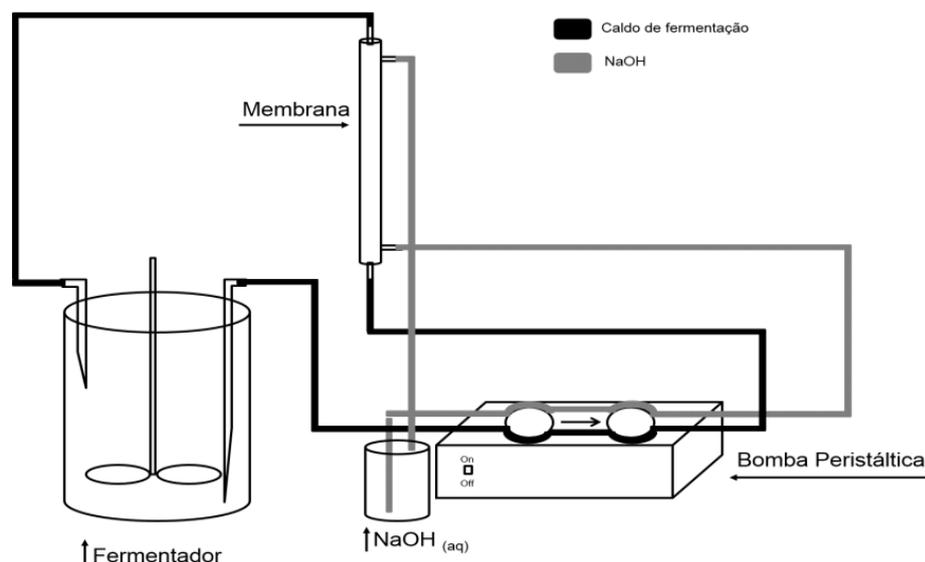
O uso de membranas de fibras ocas na microfiltração permite uma aplicação em maior escala. Isso ocorre devido à uma elevada relação entre a área de permeação e o volume do módulo, constituindo uma vantagem para a utilização dessas membranas, uma vez que há

melhor utilização do espaço, resultando em redução de custos (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

### 3.9.2 Perstração

A perstração é uma técnica que consiste em uma extração com solventes orgânicos, utilizando uma membrana líquida como barreira, a qual funciona por diferença de gradiente de pH, formando um complexo. Quando comparada com a extração líquido-líquido, a utilização da perstração requer menos quantidade de solvente e reduz a sua perda, devido ao seu reciclo durante o processo de extração (BELLA de JESUS, 2016; CAÇCAVAL *et al.*, 2013; CAÇCAVAL, GALACTION e TURNEA, 2009).

A perstração vem sendo estudada como uma técnica alternativa de separação de produtos fermentativos, onde o acoplamento da membrana a um biorreator possibilita aumentar o rendimento do processo, devido à constante remoção dos produtos do meio de cultura, como exemplificado na Figura 6 (MERLET *et al.*, 2017).



**Figura 6:** Esquema do sistema de produção e extração, com biorreator acoplado à membrana de separação (BELLA de JESUS, 2016).

Neste processo, a difusão dos bioprodutos através da membrana é o que controla a velocidade e ocorre devido à diferença de pressão de vapor dos componentes difusores entre a alimentação e a fase extratora. Tendo difundido através da membrana, os produtos são instantaneamente dissolvidos com o agente extrator. Dessa forma, é desejável que a velocidade

de difusão dos produtos de fermentação exceda a velocidade de produção no reator (QURESHI e MADDOX, 2005).

Um estudo econômico realizado por Outram (2018) relata que a perstração foi a única técnica de separação entre outras tradicionais avaliadas, capaz de gerar o maior lucro com o menor tempo de retorno de investimento, além de ocasionar uma redução geral de 5% de demanda de energia de uma planta para produção de biobutanol por via fermentativa.

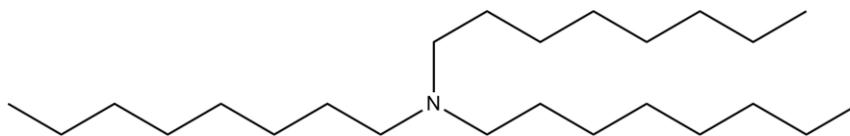
A perstração é composta por três fases, onde o produto é extraído do meio (fase doadora), normalmente aquoso, através de um solvente orgânico imiscível em água (fase extratora) imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa (fase aceptora), presente no lúmen da membrana (BELLA de JESUS, 2016; CAÇCAVAL *et al.*, 2013).

A fase orgânica, por ser imiscível em água, atua como uma barreira entre as fases aquosas, o que impede o contato entre elas e elimina processos de recuperação de solvente, visto que não há sua dissolução durante a extração (de OLIVEIRA *et al.*, 2008; WINDMOLLER, 1995). Como fase extratora reporta-se o uso de 1-octanol (Figura 7), um álcool primário, de cadeia linear e com oito átomos de carbono, amplamente utilizado como agente espumante e solvente, devido à sua baixa solubilidade em água, que é de 540 mg/L (BELLA de JESUS, 2016; CAÇCAVAL *et al.*, 2013; MORAES, 2011; KAUR e VOHRA, 2010).



**Figura 7:** Estrutura química do solvente 1-octanol.

Na literatura há a descrição da adição de um veículo líquido na membrana, como por exemplo, a tri-*n*-octilamina - TOA (Figura 8), que na concentração de 5% (v/v) pode conduzir a uma melhora de rendimento no processo de perstração (BELLA de JESUS, 2016; CAÇCAVAL *et al.*, 2013; KAUR e VOHRA, 2010).



**Figura 8:** Estrutura química da tri-*n*-octilamina.

Isso ocorre devido às suas características de basicidade intermediária e baixa solubilidade em água, que são amplamente utilizadas para a extração de ácidos carboxílicos. O uso de uma base forte como fase aceptora possibilita a interação da amina com o ácido, formando um complexo denominado ácido-amina e assim, proporciona uma distribuição elevada de ácido no processo. A alta afinidade do ácido à base fornece uma vantagem adicional, de forma seletiva sobre os componentes não ácidos na mistura (BELLA de JESUS, 2016; CAÇCAVAL *et al.*, 2013; WASEWAR e YOO, 2012; KAUR e VOHRA, 2010).

A técnica de perstração utilizada nas etapas de *downstream*, possibilita a recuperação e purificação de diversos bioprodutos de interesse comercial, reduzindo custos e diminuindo o número de operações unitárias necessárias para se obter um produto purificado (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2017).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Parte Experimental

A parte experimental deste projeto foi totalmente desenvolvida no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica (LaBioSin), no Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob orientação do Professor Dr. Gustavo Paim Valença da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) e coorientações do Professor Dr. Paulo José Samenho Moran e do Dr. Lucídio Cristóvão Fardelone, uma vez que este projeto foi uma parceria entre a Faculdade de Engenharia Química (FEQ) e o Instituto de Química (IQ) da UNICAMP, no desenvolvimento de processos fermentativos e de separação de produtos através da perstração. Também participou do projeto como colaborador o Professor Dr. José Augusto Rosário Rodrigues (IQ), *in memoriam*.

O laboratório de pesquisa LaBioSin (Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica) dispõe de todos os reagentes e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho, seguindo os níveis de segurança biológica (nível 1 e 2) e química.

### 4.2 Reagentes

Na Tabela 2, estão relacionados todos os reagentes comerciais utilizados ao longo deste projeto.

**Tabela 2:** Relação de reagentes utilizados nos experimentos, com as respectivas fabricantes.

Reagentes	Fabricante	Reagentes	Fabricante
D-Glicose Anidra	Synth	Ácido Levulínico	Sigma-Aldrich
Extrato de Levedura	BD-Biosciences	Ácido Itacônico	Sigma-Aldrich
Peptona de Soja	BD-Biosciences	Ácido Glucônico	Sigma-Aldrich
Cloreto de Cálcio	Synth	Hidróxido de Sódio	Synth
1-octanol	Dinâmica	Glicerol	Merck
Tri- <i>n</i> -octilamina	Sigma-Aldrich	Alginato de Sódio	Synth
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	Quitosana	Synth
Ácido Cítrico	Synth	Ágar Nutriente	Merck

### 4.3 Equipamentos

Na Tabela 3, estão descritos todos os equipamentos utilizados na execução dos experimentos.

**Tabela 3:** Relação de equipamentos utilizados, com as respectivas fabricantes e modelos.

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>
Autoclave vertical	Prismatec	CS
Capela de fluxo unidirecional	Grupo Veco	CFVL 12
Incubadora tipo Shaker	Marconi	MA-420
CLAE	Agilent Technologies	1200 Series
Centrífuga	Novatécnica	NT 800
Balança analítica	Mettler Toledo	AB204-S
Balança semi-analítica	Bel Engineering	-
pHmetro	Digimed	DM-20
Agitador magnético/ Chapa de aquecimento	IKA	C-MAG HS7
Medidor de densidade celular/Colorímetro	Biowave	CO8000
Bomba peristáltica	Milan	-
Bomba peristáltica	Start Bioscience	-
Centrífuga de microtubos	Novatécnica	NT 800
Biorreator	Infors HT	Multifors
Ultrafreezer	Panasonic	Pro-Series

### 4.4 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para a produção dos ácidos orgânicos estudados, estão descritos na Tabela 4 e foram adquiridos da Fundação André Tosello - Fundação Topical (Campinas-SP), com toda a documentação de rastreabilidade e dispositivos legais necessários para o trabalho com microrganismos.

**Tabela 4:** Microrganismos produtores de ácidos orgânicos utilizados no projeto.

<b>Microrganismos</b>	<b>Ácidos Orgânicos</b>
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 11414	Cítrico
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 10020	Itacônico
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9029	Glucônico
<i>Penicillium funiculosum</i> NRRL 3503	Levulínico

Inicialmente, para expansão celular, foram utilizados os meios de cultura basais descritos na literatura, de acordo com cada uma das cepas (BERGEY, 1957), sendo posteriormente otimizados meios de cultura para escala industrial, disponíveis comercialmente.

Estas cepas se encontram no LaBioSin (IQ/UNICAMP) armazenadas na forma de BCM (Banco de Células Mestre) e BCT (Banco de Células de Trabalho) - em inglês MCB (*Master Cell Bank*) e WCB (*Working Cell Bank*), respectivamente e foram preparadas de acordo com os preceitos internacionais para boas práticas de produção e de laboratório (STACEY, 2004; HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH INSPECTORATE, 2002).

#### 4.5 Inóculo

Os estudos iniciais dos processos fermentativos foram conduzidos em escala de 100 mL para se obter os principais parâmetros de produção, como o pH adequado, temperatura, agitação, entre outras condições necessárias para a obtenção dos ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico.

Para todos os processos fermentativos foram utilizados pré-inóculos em condições assépticas, onde 1,5 mL de células do Banco de Células de Trabalho (*Master Cell Bank*) foi transferido para um frasco do tipo Erlenmeyer com abas (*baffled flask*), para melhor aeração, e mantido em estufa incubadora sob agitação orbital nas condições ótimas de cultivo para cada microrganismo (BERGEY, 1957). Além disso, foram utilizados extrato de levedura e peptona bacteriológica como fonte de proteínas e glicose como fonte de carbono, de acordo com a necessidade de nutrição de cada microrganismo, sendo ajustadas também as concentrações destes nutrientes.

Após o crescimento celular, todo o conteúdo do frasco de pré-inóculo foi centrifugado (3.000 rpm por 5 minutos), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em novo

meio de cultura sob condições assépticas. Este frasco foi colocado em estufa microbiológica para novas expansões celulares, sob agitação nas condições ótimas de cultivo para cada microrganismo, que após o crescimento, foi centrifugado e o *pellet* obtido ressuspendido em novo meio de cultura, sendo transferido para o fermentador em seguida.

#### 4.6 Teste de Toxicidade com 1-Octanol em Erlenmeyers

Como o projeto visa avaliar a purificação de ácidos orgânicos por perstração, foi testada a toxicidade do solvente utilizado no processo, o 1-octanol, uma vez que este pode atuar como um inibidor microbiano.

Assim, após as expansões celulares de pré-inóculo e inóculo, o conteúdo de 1,0 g de células foi ressuspendido em 100 mL de novo meio de cultura, contendo peptona, extrato de levedura, 10 - 20 g/L de glicose como fonte de carbono e 1-octanol em diferentes concentrações (0, 540, 1.080 e 1.620 mg/L), em frascos do tipo Erlenmeyer, para a produção dos ácidos e observação de possível inibição microbiana.

#### 4.7 Fermentação em Batelada em Biorreator com Células Livres

Com base nos parâmetros obtidos nas fermentações em Erlenmeyers, foram realizados processos fermentativos utilizando um fermentador da marca Infors HT, modelo *Multifors*, com uma dorna de capacidade para 0,5 L de volume de trabalho. Durante estas fermentações, foi possível realizar o acompanhamento online de pH, temperatura, agitação e aeração, bem como, através de bombas peristálticas do biorreator, fazer adições de nutrientes e retirada de amostras para análises de glicose residual e de produção dos ácidos orgânicos. Também foi possível avaliar o tempo de fermentação, a produtividade e a viabilidade do processo produtivo como um todo.

Estas fermentações foram conduzidas visando a obtenção do meio de cultura adequado à produção destes ácidos, de forma otimizada, com bons e altos rendimentos para que fosse estabelecido um processo de produção e purificação, utilizando a perstração, de forma eficiente e rentável.

As equações utilizadas para os cálculos de rendimento e produtividade foram:

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_0 - S} \quad (1)$$

$Y_{P/S}$ : Rendimento de substrato em produto (g/g)

P: Concentração máxima de produto (g/L)

$S_0$ : Concentração inicial de substrato (g/L)

S: Concentração final de substrato (g/L)

$$Prod = \frac{P_{m\acute{a}x} - P_0}{tempo} \quad (2)$$

Prod: Produtividade em ácido (g/Lh)

$P_{m\acute{a}x}$ : Concentração máxima de produto (g/L)

$P_0$ : Concentração inicial de produto intracelular (g/L)

Tempo: Tempo total de fermentação (h)

A partir do rendimento estequiométrico máximo ( $Y_{P/S}$ ) de cada ácido analisado, o rendimento percentual dos processos fermentativos foi calculado, sendo demonstrado pela Equação 3:

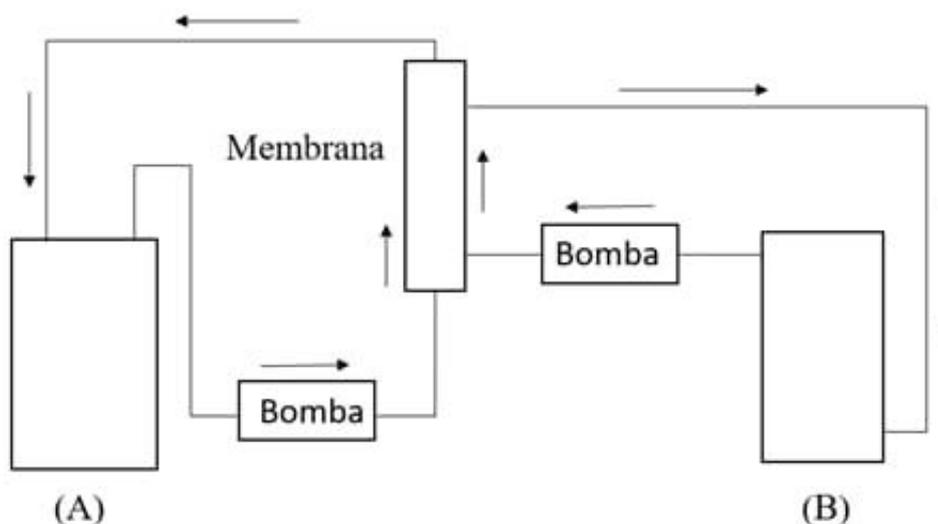
$$Rendimento (\%) = \frac{R_{real}}{R_{te\acute{o}rico}} \times 100 \quad (3)$$

$R_{real}$ : Rendimento de conversão de substrato em produto, obtido experimentalmente (g/g)

$R_{te\acute{o}rico}$ : Rendimento máximo possível de ser obtido, através da estequiometria da reação (g/g)

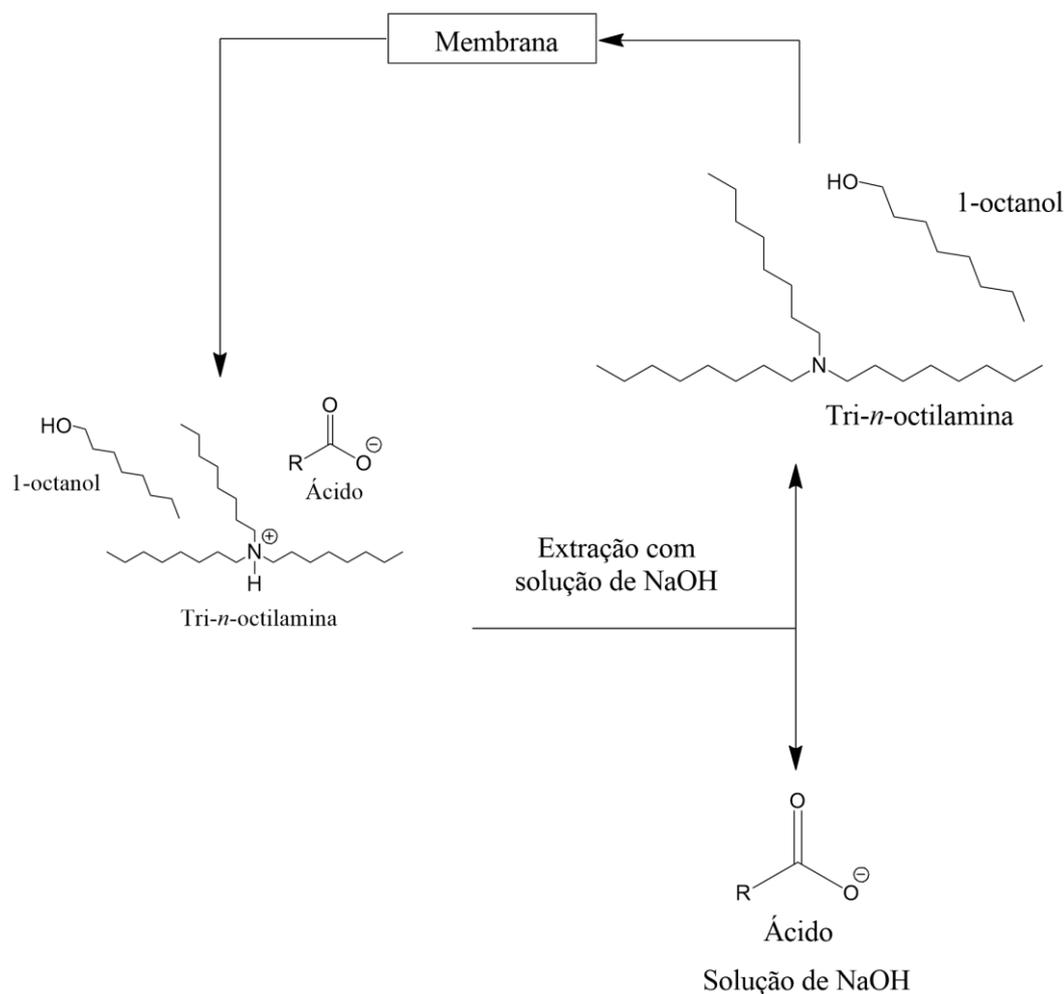
#### 4.8 Perstração

Para os testes com soluções padrão de cada ácido analisado, a perstração foi realizada como o exemplificado na Figura 9. Frascos do modelo Schott foram utilizados, com tampas adaptadas, possibilitando a entrada e saída de líquidos, assim como a adição de um respirador.



**Figura 9:** Esquema de como foi realizado o primeiro sistema de perstração para a extração dos ácidos orgânicos. Sendo (A): Frasco Schott contendo solução padrão com o ácido analisado e (B): Recipiente de extração contendo 1-octanol e NaOH.

O sistema tradicional da perstração foi alterado, onde o 1-octanol, agora passou a ser impregnado nos poros e por fora das fibras da membrana e a fase doadora passou pelo seu interior. A extração passou a ocorrer fora do sistema da membrana. A fase aceptora foi composta por NaOH 10 M, uma base forte o suficiente para desfazer o complexo ácido-amina durante todo o processo de fermentação e separação, desprotonando a amina para que ela retornasse ao sistema, como é possível notar na Figura 10. Como fase extratora, foi utilizado o solvente orgânico imiscível em água 1-octanol, adicionando-se 5% de tri-*n*-octilamina, como reportado na literatura e já testado anteriormente pelo grupo de pesquisa (BELLA de JESUS, 2016; KAUR e VOHRA, 2010).



**Figura 10:** Reações de recuperação do octanol e extração dos ácidos (Adaptado de BELLA de JESUS, 2016).

No recipiente de extração há a formação de duas fases, uma vez que contém a solução de 1-octanol com TOA e dessa forma, não há perda de solvente, pois o mesmo recircula no sistema, sem a necessidade de reposição ao longo do processo. Os ácidos neste recipiente estão desprotonados pela TOA e na presença do NaOH permanecem na solução aquosa, enquanto o solvente retorna à membrana.

A equação utilizada para o cálculo do rendimento percentual de extração de cada ácido analisado, foi:

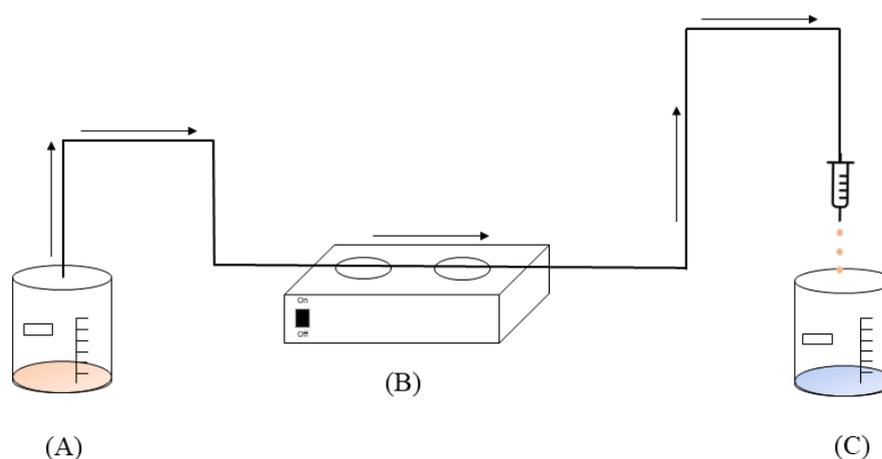
$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{c_e}{c_i} \times 100 \quad (4)$$

$C_e$ : Concentração de ácido extraído e presente na solução de NaOH (g/L)

$C_i$ : Concentração inicial de ácido (g/L)

#### 4.9 Imobilização de Células

Para manter o processo fermentativo em sistema de produção acoplado à extração de forma estável, foi realizada a imobilização das células dos microrganismos estudados, conforme demonstra a Figura 11. Através da imobilização, evita-se a uma possível turbidez do meio de cultura e se reduz a quantidade de operações unitárias necessárias nos processos de separação, além de possibilitar a reutilização das células. A técnica selecionada, já estudada pelo grupo de pesquisa, se baseia no aprisionamento da célula em matriz porosa, através do uso de uma suspensão de alginato de sódio 3% e massa celular, gotejada em solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), formando esferas com diâmetro de aproximadamente 3-4 mm.



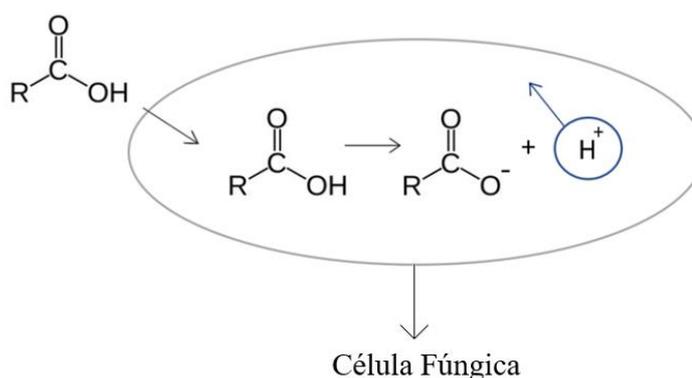
**Figura 11:** Esquema da técnica utilizada para imobilização de células com alginato de sódio. Sendo: (A) Béquer contendo solução de massa de células e alginato; (B) Bomba peristáltica e (C) Béquer contendo solução de cloreto de cálcio, onde são gotejadas as células (Adaptado de SOUSA, 2016).

As esferas foram mantidas em solução de  $\text{CaCl}_2$  por 1 hora, possibilitando uma melhor distribuição do cálcio no gel da matriz de suporte celular. Em seguida, para o revestimento, as esferas foram transferidas para uma solução de quitosana. Com o objetivo de evitar a lixiviação do cálcio presente na rede polimérica das esferas, estas foram curadas mantendo-se em solução de  $\text{CaCl}_2$ .

Por fim, as esferas foram separadas por filtração, lavadas com água destilada e utilizadas nos processos fermentativos em sistema de produção acoplado à extração.

#### 4.10 Sistema de Produção Acoplado à Extração com Células Imobilizadas

Sabe-se que para determinados ácidos orgânicos, como é o caso do ácido cítrico, a alta concentração do produto no meio de cultura pode causar um efeito inibitório aos microrganismos, diminuindo a rentabilidade do processo, pois com a ocorrência de uma alteração no pH da célula, o transporte de nutrientes e o crescimento celular são afetados, sendo esta inibição representada na Figura 12. Portanto, a retirada de ácido pelo sistema de perstração durante a fermentação, possibilita atingir melhores valores de rendimento e produtividade nos processos fermentativos.

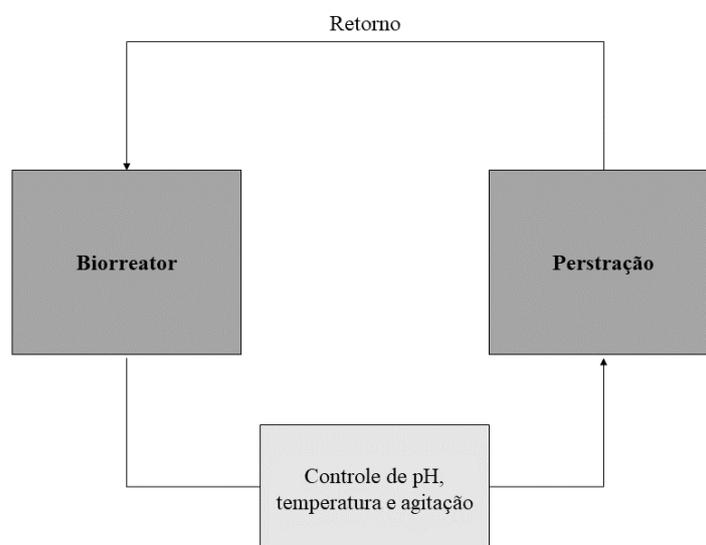


**Figura 12:** Esquema da inibição causada pela alta concentração de ácidos em uma célula fúngica (ZHANG E YANG, 2009).

O sistema de produção e extração utilizado neste projeto, foi totalmente construído e adaptado pelo grupo de pesquisa (BELLA de JESUS, 2016), com o desenvolvimento de um biorreator, com portas de entrada para adição e retirada de caldo de cultivo, adição de base, ajuste de pH e, quando necessário, portas para retiradas de amostras e dreno. O biorreator possui também agitação magnética e aquecimento. Um filtro de retenção foi desenvolvido para caso ocorresse um rompimento das células imobilizadas, evitando que as células em suspensão ocasionassem um entupimento da membrana de separação. Este filtro foi preenchido com poliuretanas, com gradiente de densidade e porosidade diferentes, sendo que as de menores densidades se localizaram na entrada do filtro e as de maiores densidades no topo do filtro, retraindo qualquer particulado, e desta maneira protegendo a membrana de fibra oca quanto à incrustações e depósitos de células. Como as poliuretanas retêm ar, o que pode resultar em uma diferença de pressão na entrada da membrana de fibra oca e desestabilizar o sistema de

perstração, foram desenvolvidos respiradores, para que todo o ar remanescente fosse retirado do sistema.

A montagem do sistema foi realizada de acordo com a Figura 13, onde o biorreator foi ligado ao filtro contendo poliuretanas, o qual foi conectado ao respirador, e este à membrana. Em uma das saídas foi acoplado o coletor de 1-octanol e este ligado ao biorreator, fechando o sistema. O recipiente de extração foi acoplado à outra entrada e saída da membrana de fibra oca. Ambos o caldo de fermentação e a solução de 1-octanol contendo TOA, foram impulsionados ao longo do sistema por duas bombas peristálticas, com velocidades de fluxo de 15 mL/min. Esta configuração de montagem proporciona uma fermentação em sistema estável, possibilitando atingir bons rendimentos de produção e extração dos ácidos orgânicos.



**Figura 13:** Esquema do sistema de produção em biorreator acoplado à perstração (BELLA de JESUS, 2016).

Evitando que ocorresse qualquer desestabilização por entupimento da membrana de separação, para este sistema foram utilizadas células imobilizadas. Com a construção de um banco homogêneo, as células dos microrganismos podem ser crescidas de maneira uniforme em diferentes meios de cultura, onde manterão sua condição de crescimento. Com isso, foi utilizada a sacarose como fonte de carbono, visando uma futura utilização de caldo de cana como meio nutritivo, o que reduziria ainda mais os custos de produção. Também foi adicionado cloreto de cálcio ao meio de cultura, visto que Bazin *et al.* (1995) reporta a ação de ácidos orgânicos como agentes sequestrantes de cálcio, o que poderia ocasionar uma complexação do

cálcio presente nas células imobilizadas com o ácido produzido, causando uma lixiviação e consequente rompimento das esferas.

#### **4.11 Metodologia Analítica**

Para a análise da concentração dos ácidos orgânicos, bem como consumo e glicose residual, foi utilizada a metodologia analítica descrita por Coral *et al.* (2008), com modificações para a neutralização das amostras (BELLA de JESUS, 2016) melhorando o processo de detecção através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE.

O equipamento de CLAE utilizado possui um detector de índice de refração e ultravioleta, sendo a coluna a Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-rad), a fase móvel constituída por uma solução de 0.005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com fluxo 0,6 mL/min. e temperatura do forno de 50 °C. As quantificações dos produtos foram realizadas a partir da construção de curvas de calibração com padrões externos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Banco de Células

O projeto foi iniciado estabelecendo o meio de cultura ideal para cada microrganismo e verificando a forma de crescimento celular, para posterior utilização nos experimentos de produção.

Desta maneira, para a confecção dos bancos de células do *Aspergillus niger* ATCC 11414, produtor de ácido cítrico, *Aspergillus terreus* ATCC 10020, produtor de ácido itacônico, *Aspergillus niger* ATCC 9020, produtor do ácido glucônico e *Penicillium funiculosum* NRRL 3503, produtor de ácido levulínico foram utilizados meios de cultura contendo extrato de levedura, peptona bacteriológica e 10 g/L de glicose. Esta composição permitiu que o crescimento celular ocorresse em suspensão e proporcionou um banco de células homogêneo, o que possibilitou reprodutibilidade e homogeneidade nos experimentos.

Para a composição do meio fermentativo para a produção dos ácidos, foi utilizada peptona bacteriológica, extrato de levedura e 10-20 g/L de glicose, o que forneceu um bom crescimento celular (OD 10).

### 5.2 Teste de Toxicidade com 1-Octanol em Erlenmeyers

Devido à possibilidade do solvente 1-octanol atuar como um inibidor microbiano, sua toxicidade foi avaliada em testes realizados em frascos do tipo Erlenmeyer com abas (*baffled flask*).

Os resultados destes testes, realizados em triplicata, estão representados na Tabela 5 para a produção de ácido cítrico, onde se observa que as células crescidas na ausência de 1-octanol não apresentaram glicose residual, produzindo 0,48 g/L de ácido. Já para o 1-octanol presente em diferentes concentrações, houve um consumo de glicose menor, porém a produção de ácido cítrico foi maior, em torno de 0,69 g/L.

**Tabela 5:** Produção de ácido cítrico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.

Amostra	Concentração de 1-octanol (mg/L)	Glicose residual (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)
1	0	0	0,48
2	540	0,18	0,69
3	1080	0,64	0,69
4	1620	0,64	0,72

Portanto, a presença de 1-octanol não afetou diretamente o crescimento celular e sim promoveu um aumento na produção de ácido cítrico.

Já para o ácido itacônico, os resultados dos testes realizados em frascos do tipo Erlenmeyer estão descritos na Tabela 6, onde se observa que células crescidas na ausência de 1-octanol não apresentaram glicose residual, produzindo 0,9 g/L de ácido itacônico e quando na presença do solvente, na concentração de 540 mg/L, obtiveram um menor consumo de glicose com 4,13 g/L de glicose residual, produzindo 0,11 g/L de ácido itacônico.

**Tabela 6:** Produção de ácido itacônico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.

Amostra	Concentração de 1-octanol (mg/L)	Glicose residual (g/L)	Ácido Itacônico (g/L)
1	0	0	0,90
2	540	4,13	0,11
3	1080	3,62	0,23
4	1620	4,66	0,08

Desta maneira, nota-se que a presença de 1-octanol pode ter afetado o crescimento celular e conseqüentemente a produção de ácido itacônico pelo *Aspergillus terreus* ATCC 10020, quando o processo de fermentação ocorreu em Erlenmeyers, sem controle online de parâmetros como o pH.

Para o ácido glucônico, os resultados constam na Tabela 7, onde se observa que as células crescidas na ausência de 1-octanol apresentaram apenas 0,28 g/L de glicose residual, produzindo 1,26 g/L de ácido glucônico. Já para o 1-octanol presente em diferentes

concentrações, nota-se um consumo de glicose menor, porém a produção de ácido glucônico foi maior, chegando a 4,06 g/L, 31% superior.

**Tabela 7:** Produção de ácido glucônico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyers com diferentes concentrações de 1-octanol.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de 1-octanol (mg/L)</b>	<b>Glicose residual (g/L)</b>	<b>Ácido Glucônico (g/L)</b>
<b>1</b>	0	0,28	1,26
<b>2</b>	540	10,33	0,75
<b>3</b>	1080	12,73	0,67
<b>4</b>	1620	13,33	4,06

Portanto, nestes testes, a presença de 1-octanol não afetou diretamente o crescimento celular e promoveu um aumento na produção do ácido glucônico, quando utilizada a concentração de 1.620 mg/L.

Por fim, os resultados obtidos para a produção de ácido levulínico em Erlenmeyers estão descritos na Tabela 8. Observa-se que células crescidas na ausência de 1-octanol apresentaram 1,45 g/L de glicose residual, produzindo 1,95 g/L de ácido levulínico e quando na presença do solvente, na concentração de 540 mg/L, obtiveram um menor consumo de glicose com 2,35 g/L de glicose residual e produzindo 3,19 g/L de ácido levulínico. Já na presença de 1-octanol em concentrações superiores, nota-se que ocorreu uma inibição na produção.

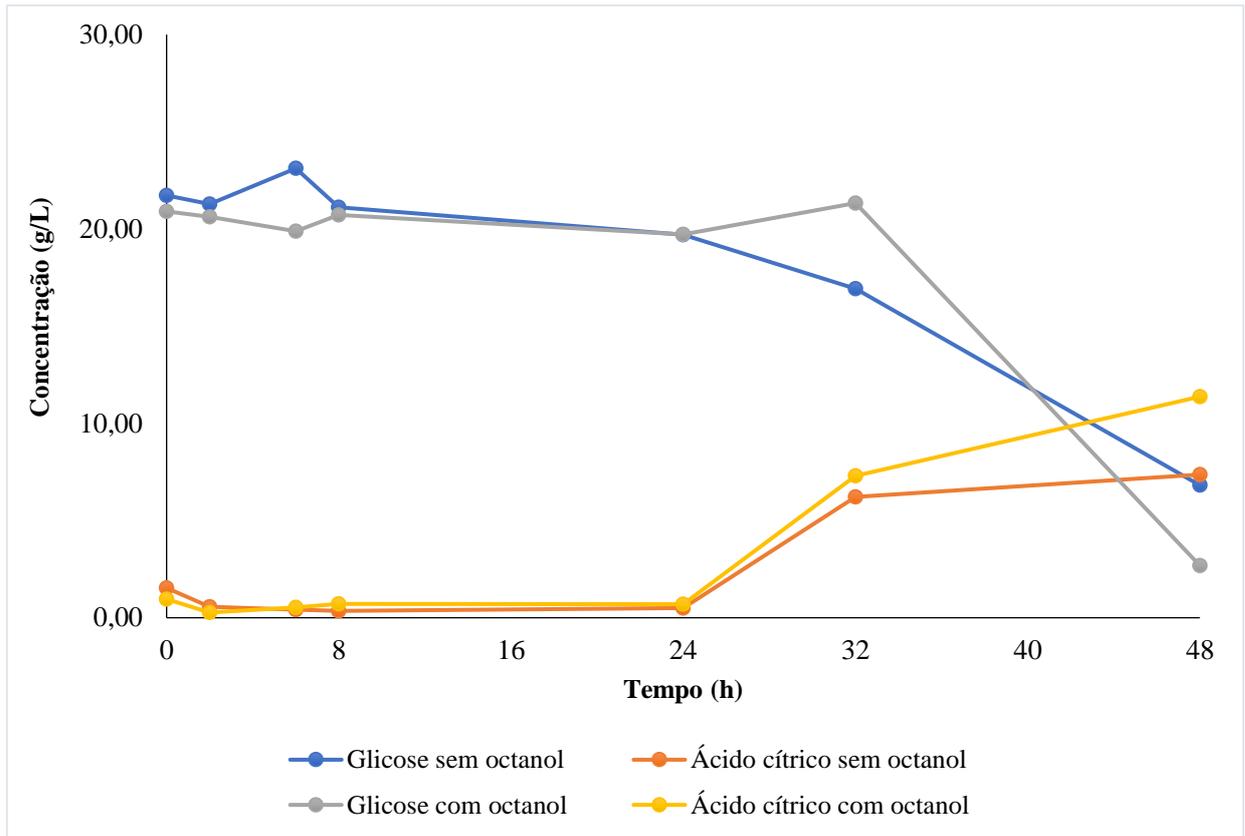
**Tabela 8:** Produção de ácido levulínico em processo de batelada em frasco tipo Erlenmeyer com diferentes concentrações de 1-octanol.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de 1-octanol (mg/L)</b>	<b>Glicose residual (g/L)</b>	<b>Ácido Levulínico (g/L)</b>
<b>1</b>	0	1,45	1,95
<b>2</b>	540	2,35	3,19
<b>3</b>	1080	10,00	0,37
<b>4</b>	1620	10,00	0,60

### 5.3 Fermentação em Batelada em Biorreator com Células Livres

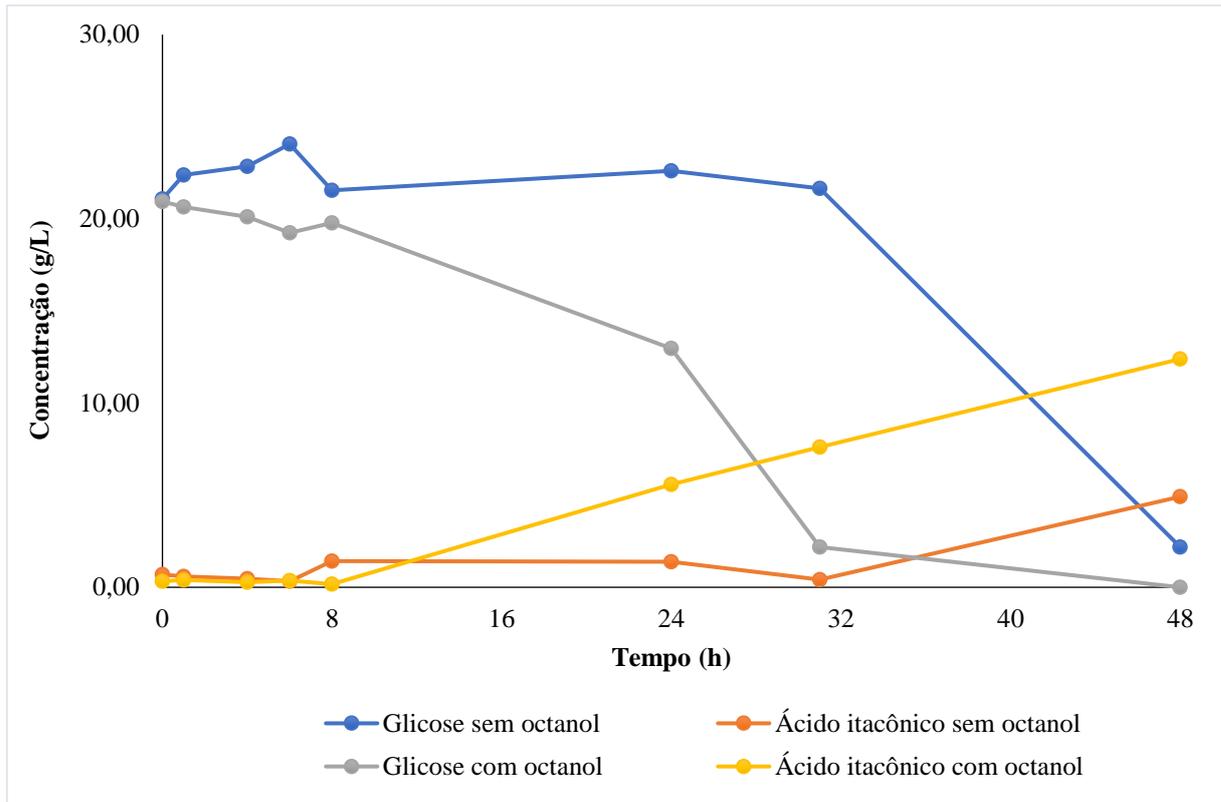
Com o objetivo de aumentar a produtividade dos ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico, na presença de 1-octanol em concentração de solubilidade em água (540 mg/L), foram realizadas fermentações em biorreatores da marca Infors HT, modelo *Multifors*, com uma dorna de capacidade para 0,5 L de trabalho, onde foi possível fazer o acompanhamento online de pH, temperatura, agitação e aeração, bem como, através de bombas peristálticas do biorreator, fazer a retirada de amostras para análises de glicose residual e de produção de ácido. Avaliando-se assim o tempo de fermentação, a produtividade e a viabilidade do processo produtivo como um todo.

Para o ácido cítrico os resultados obtidos estão descritos na Figura 14, onde observa-se que a produção de ácido pelo *Aspergillus niger* ATCC 11414, na ausência de 1-octanol, foi de 1,76 g, com consumo de glicose de 7,31 g, rendimento de 22,6% e produtividade de 0,22 g/Lh. Enquanto na presença de 1-octanol, na concentração de solubilidade em água, obteve-se 3,90 g de ácido cítrico, consumindo 8,18 g de glicose, apresentando rendimento de 44,7% e produtividade de 0,43 g/Lh.



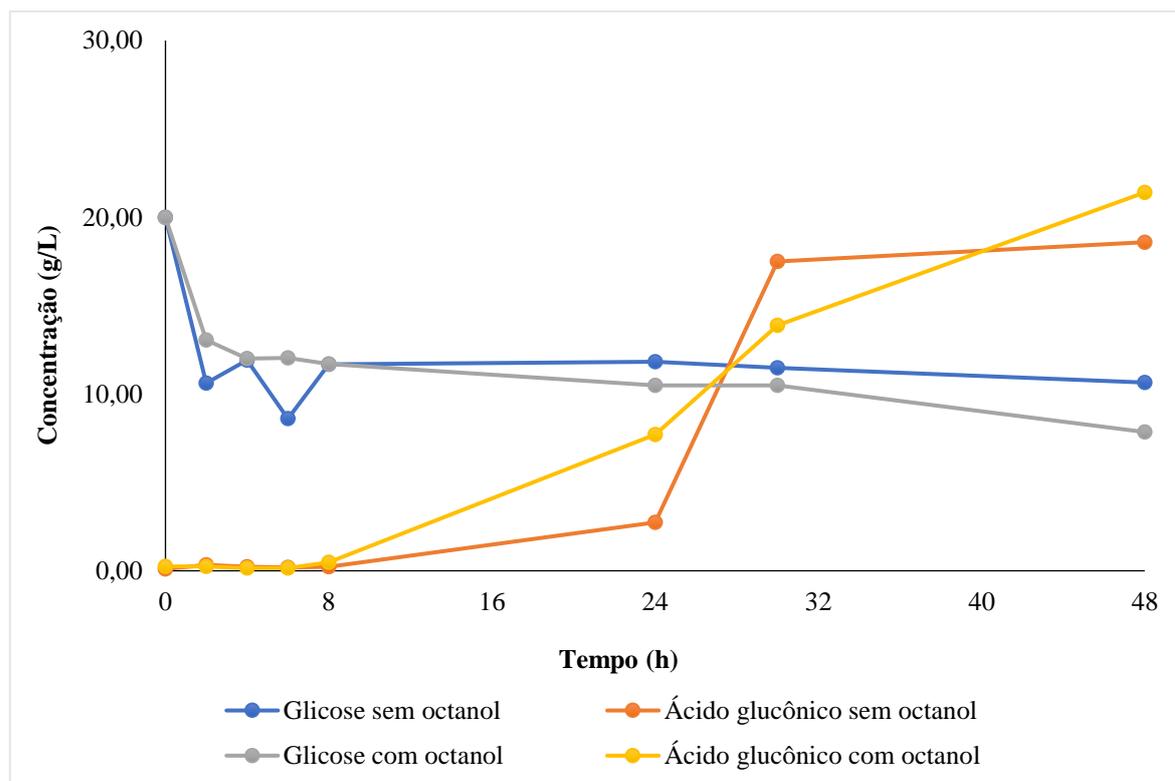
**Figura 14:** Perfil de consumo de glicose e produção de ácido cítrico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol.

Os resultados de produção de ácido itacônico pelo *Aspergillus terreus* ATCC 10020 em biorreator estão descritos na Figura 15, onde nota-se que na ausência de 1-octanol o consumo de glicose foi de 6,74 g, produzindo 1,21 g de ácido e fornecendo 24,8% de rendimento, com produtividade de 0,13 g/Lh. Enquanto na presença de 1-octanol, na concentração de solubilidade em água, obteve-se 8,43 g de ácido itacônico, consumindo 16,12 g de glicose, apresentando rendimento de 72,4% e produtividade de 0,88 g/Lh. Assim, a presença do 1-octanol no meio aumentou a produtividade em ácido itacônico, quando a fermentação ocorreu em biorreator com controle online de parâmetros.



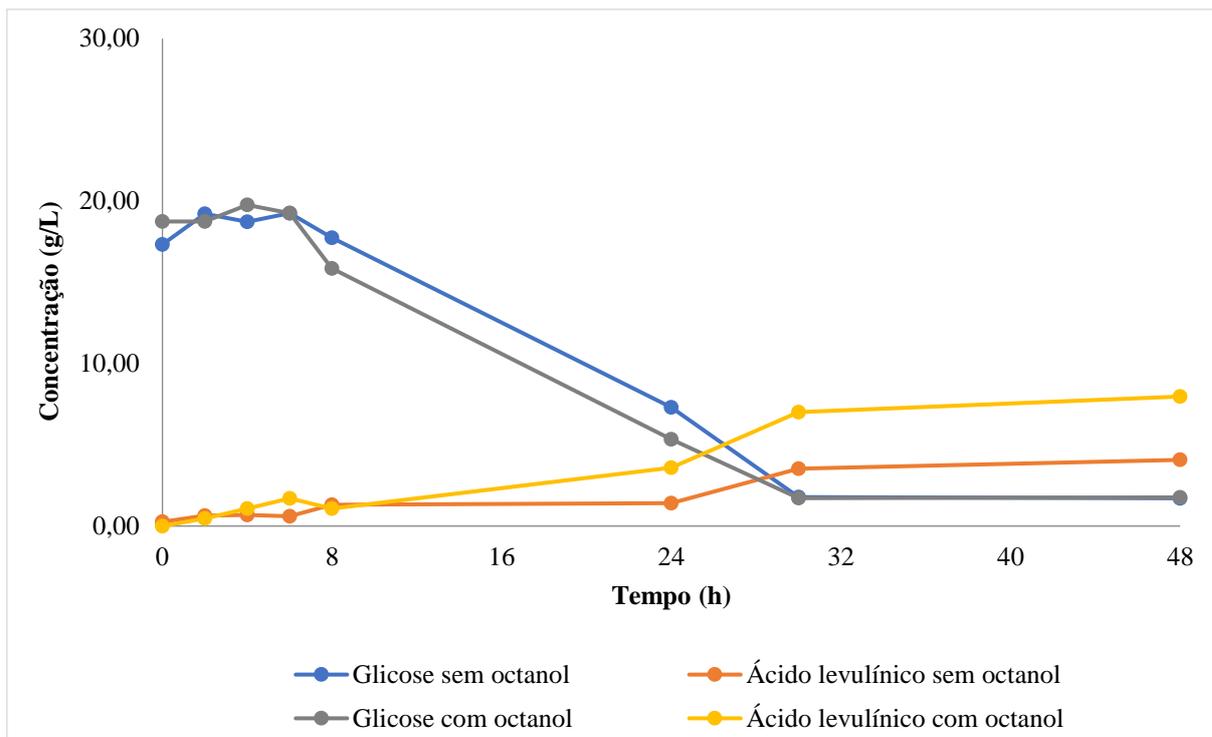
**Figura 15:** Perfil de consumo de glicose e produção de ácido itacônico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol.

Para o ácido glucônico os resultados obtidos estão descritos na Figura 16, onde observa-se que a produção de ácido pelo *Aspergillus niger* ATCC 9029 na ausência de 1-octanol foi de 2,88 g, com consumo de glicose de 2,64 g, rendimento quantitativo e produtividade de 0,38 g/Lh. Enquanto, na presença de 1-octanol na concentração de solubilidade em água, obteve-se 2,54 g de ácido glucônico, consumindo 2,33 g de glicose, apresentando rendimento quantitativo e produtividade de 0,28 g/Lh. Neste caso o 1-octanol não inibiu nem impulsionou a produção de ácido glucônico.



**Figura 16:** Perfil de consumo de glicose e produção de ácido glucônico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol.

Os resultados de produção de ácido levulínico pelo *Penicillium funiculosum* NRRL 3503 em biorreator estão descritos na Figura 17, onde é possível notar que na ausência de 1-octanol o consumo de glicose foi de 3,50 g, produzindo 0,70 g de ácido e fornecendo 30% de rendimento, com produtividade de 0,08 g/Lh. Enquanto na presença de 1-octanol, na concentração de solubilidade em água, obteve-se 1,67 g de ácido levulínico, consumindo 3,75 g de glicose, apresentando rendimento de 69% e produtividade de 0,17 g/Lh. Sendo assim, foi possível notar que, mais uma vez, o 1-octanol atuou causando um aumento na produção de ácido.



**Figura 17:** Perfil de consumo de glicose e produção de ácido levulínico em batelada em biorreator, na presença e ausência de 1-octanol.

A Tabela 9 resume as informações de rendimento de produto em substrato ( $g_{\text{ácido}}/g_{\text{glicose}}$ ) e produtividade ( $g_{\text{ácido}}/Lh$ ) para os ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico, obtidos via fermentação em batelada com células livres, na presença de 1-octanol.

**Tabela 9:** Resultados de rendimento e produtividade obtidos pela fermentação em batelada em biorreator, na presença de 1-octanol.

Ácido Orgânico	$Y_{P/S}$ ( $g_{\text{ácido}}/g_{\text{glicose}}$ )	Prod ( $g_{\text{ácido}}/Lh$ )
Cítrico	0,447	0,434
Itacônico	0,522	0,880
Glucônico	1,000	0,280
Levulínico	0,446	0,170

Nos processos fermentativos em batelada em biorreator com controle online de parâmetros, para a produção dos ácidos cítrico, itacônico e levulínico nota-se que o 1-octanol, na concentração de solubilidade em água (540 mg/L), atuou como um indutor na produção destes ácidos. Entretanto, é possível observar que este solvente não causou efeito significativo

sobre a produção de ácido glucônico, que diferente dos outros ácidos estudados, é produzido diretamente no meio extracelular.

Na literatura, já foram reportados casos em que o uso de solventes orgânicos, como o metanol e o etanol, intensificou a produção de ácido cítrico. No caso do metanol, este pode aumentar a permeabilidade da membrana celular ao citrato, já o etanol causa alteração nas atividades das enzimas citrato sintase e aconitase durante o Ciclo de Krebs. Sabe-se também que o *Aspergillus niger* pode converter o etanol disponível no meio em Acetil-CoA, molécula precursora para a síntese de ácido cítrico (CAMPANHOL, 2018; DHILLON *et al.*, 2010; BARRINGTON e KIM, 2008). Neste projeto, o 1-octanol, na concentração de 540 mg/L, não provocou toxicidade aos microrganismos.

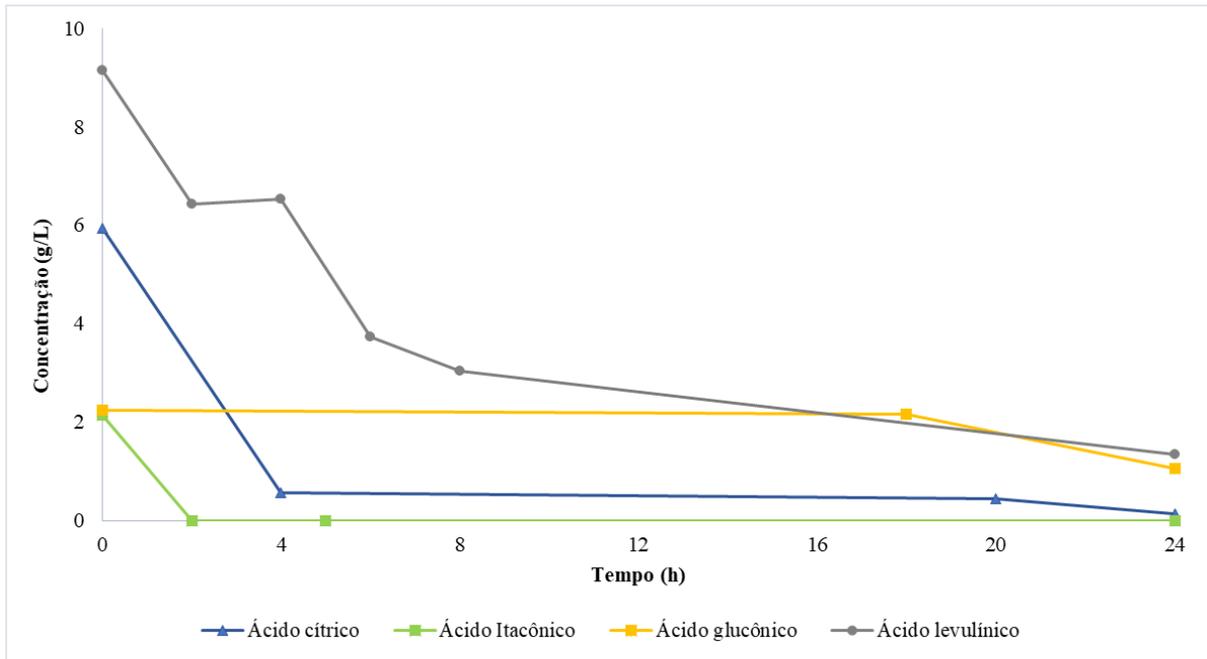
#### 5.4 Rendimento Percentual da Perstração

Para a avaliação de rendimento do processo de extração de ácidos utilizando a perstração, foram realizados testes com soluções padrão de cada um dos ácidos. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

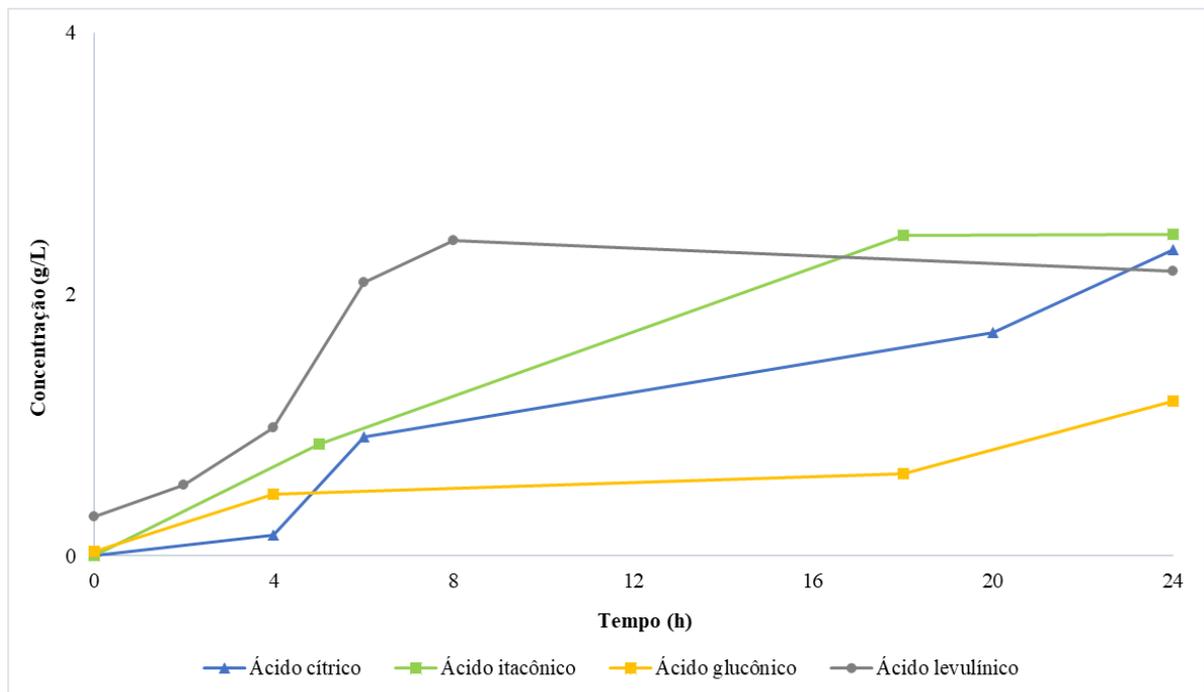
**Tabela 10:** Rendimento obtido na perstração com solução padrão de cada ácido em 24h.

Ácidos Orgânicos	Rendimento da Perstração (%)
Ácido Cítrico	98
Ácido Itacônico	Quantitativo (>99%)
Ácido Glucônico	52
Ácido Levulínico	85

A Figura 18 demonstra a eficiência de extração, com o decaimento da concentração dos padrões utilizados e a Figura 19 retrata o aumento da concentração dos ácidos extraídos, na solução de NaOH. É possível notar que na Figura 19, a concentração de ácidos existente na solução de NaOH é diferente da concentração extraída, o que significa que estes ainda se encontram na forma de complexos dentro da membrana de separação e que levariam mais algumas horas até serem desfeitos na solução de NaOH.



**Figura 18:** Decaimento da concentração de padrões de ácidos utilizados na perstração.



**Figura 19:** Aumento da concentração de ácidos extraídos na perstração.

Assim, é possível notar que o rendimento de extração é variável entre os ácidos, no período de 24 horas. Isso ocorre devido ao fato destes ácidos possuírem estruturas diferentes entre si, como o tamanho da cadeia e número de grupos ácidos que o formam. Sendo assim, ressalta-se que a extração do ácido itacônico, por exemplo, foi completa no período de 24 horas, enquanto a do ácido glucônico necessitaria de mais tempo de processo, devido à sua estrutura.

### 5.5 Sistema de Produção Acoplado à Extração com Células Imobilizadas

Com o objetivo de aumentar a produtividade dos ácidos orgânicos analisados, o sistema composto por um biorreator acoplado à uma membrana de perstração (Figura 13, página 44) foi testado. As células utilizadas foram imobilizadas conforme reporta o item 4.9 da sessão Materiais e Métodos e estão representadas na Figura 20.

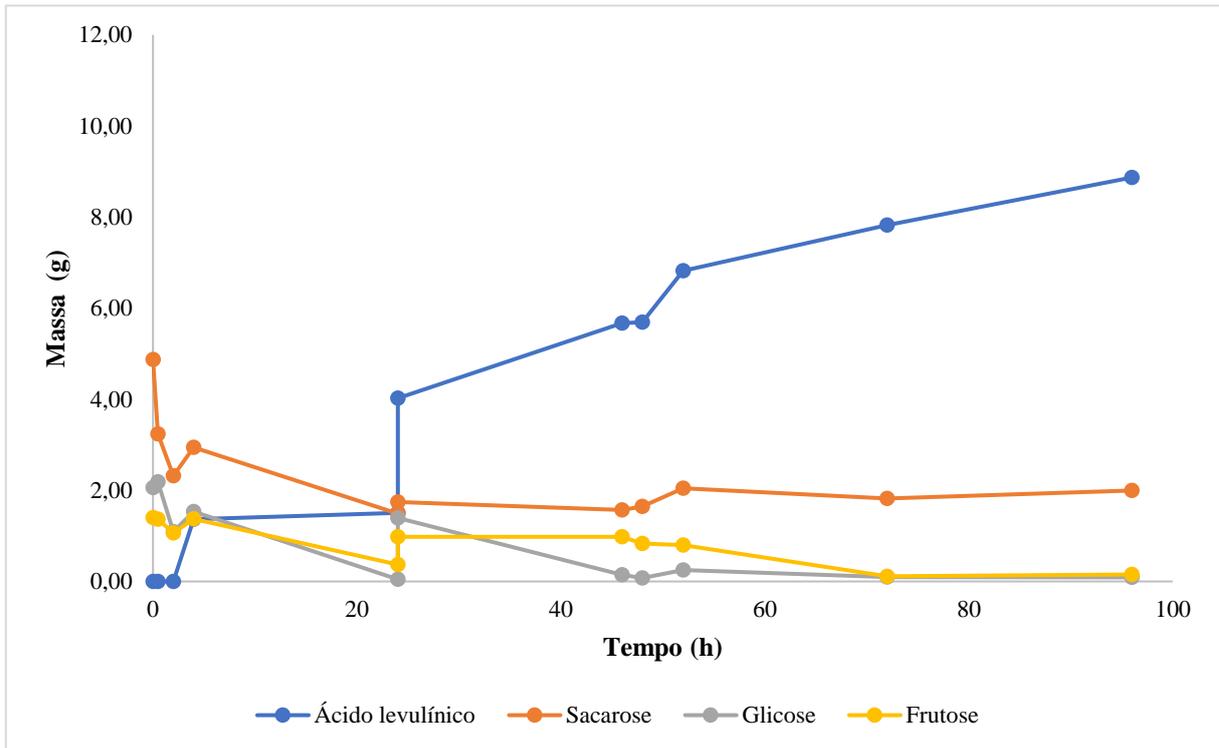


**Figura 20:** Foto representando células de fungo filamentoso imobilizadas em alginato de sódio.

Devido à pandemia enfrentada no ano de 2020 pelo novo coronavírus, que impossibilitou o acesso à Universidade, foi determinada a escolha do ácido levulínico para os testes de produção acoplada à extração utilizando a sacarose como fonte de carbono, visto sua atuação na síntese de diversos outros compostos, sendo que os demais ácidos também serão testados e divulgados sob a forma de publicações posteriormente.

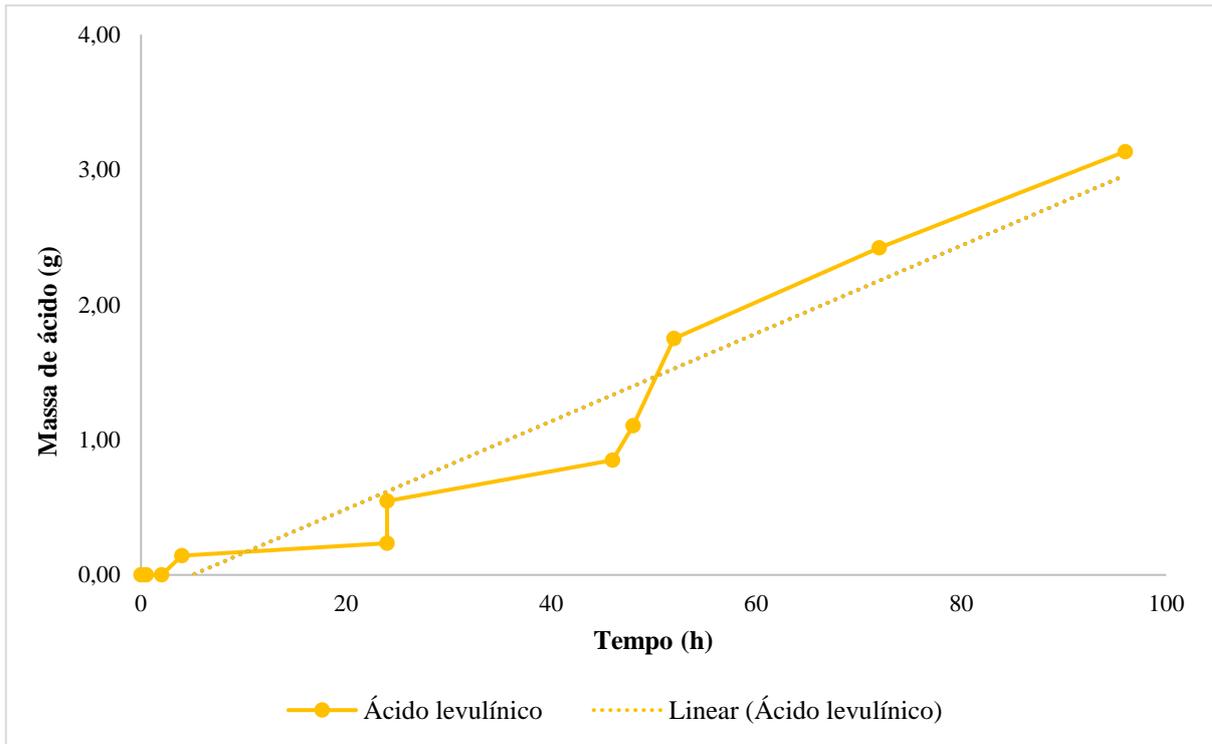
O perfil de produção de ácido levulínico e consumo de carboidratos está representado na Figura 21. Foram produzidos 8,87 g de ácido em 96 horas, com consumo de 3,96 g de frutose, 4,76 g de glicose e 5,26 g de sacarose, apresentando um rendimento total de 94% e produtividade de 0,3 g/Lh. As inflexões nas curvas dos carboidratos representam a adição de novo meio de cultura. Nota-se que houve um residual de sacarose em 96 horas, isso demonstra que o microrganismo ainda não havia convertido totalmente este dissacarídeo, ao final do

processo.



**Figura 21:** Perfil de produção de ácido levulínico e consumo de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) em 96h de sistema de produção acoplado à extração.

A Figura 22 demonstra o perfil de extração de ácido levulínico, através da perstração. Ao decorrer do processo, foi possível extrair aproximadamente 35% do ácido levulínico produzido em 96 horas, o que indicou alguma perda de pressão e/ou desestabilização no sistema de extração, visto que no teste de rendimento percentual da perstração, esse valor havia sido de 85%. Entretanto, o perfil de extração apresentou um crescimento exponencial, o que poderia indicar um maior rendimento, caso a fermentação ocorresse por mais tempo.



**Figura 22:** Perfil de extração de ácido levulínico através da perstração, em sistema de produção acoplado à extração.

A Tabela 11 resume as informações de rendimento de produto em substrato ( $\text{g}_{\text{ácido}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ ) e produtividade ( $\text{g}_{\text{ácido}}/\text{Lh}$ ) para o ácido levulínico, obtido via sistema de produção acoplado à extração.

**Tabela 11:** Resultados de rendimento e produtividade obtidos no sistema de produção acoplado à perstração.

Ácido Orgânico	$Y_{P/S}$ ( $\text{g}_{\text{ácido}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ )	Prod ( $\text{g}_{\text{ácido}}/\text{Lh}$ )
Levulínico	0,635	0,3

## 6. CONCLUSÕES

Como conclusões deste trabalho, primeiramente, destaca-se que foram construídos bancos de células de forma uniforme para todos os microrganismos estudados, o que possibilitou reprodutibilidade dos resultados.

Os testes de toxicidade indicaram que o solvente 1-octanol pode apresentar efeito indutor ou inibitório na produção dos ácidos ao se variar sua concentração no meio de cultura, quando os ensaios foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer, sem controle online de parâmetros. Sendo assim, a concentração de solubilidade do 1-octanol em água 540 mg/L, testada nas fermentações, não apresentou toxicidade aos microrganismos, impulsionando a produção dos ácidos cítrico, itacônico e levulínico.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que foi possível produzir os ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico a partir de processos biotecnológicos, com bons rendimentos. Nos processos fermentativos em batelada em biorreator utilizando células livres e glicose como fonte de carbono, na presença de 1-octanol, os rendimentos de produção dos ácidos cítrico itacônico, glucônico e levulínico foram, respectivamente, de 44,7%, 72,4%, >99% e 69%.

Na realização de ensaios para os testes de rendimento percentual da técnica de extração utilizada, a perstração demonstrou ser viável para a separação de todos os ácidos analisados, variando-se apenas o tempo necessário para total extração de cada produto, de acordo com a sua estrutura química, sendo os rendimentos para os ácidos cítrico, itacônico, glucônico e levulínico de 98%, >99%, 52% e 85%, respectivamente.

A técnica de imobilização de células desenvolvida se demonstrou eficaz, sendo possível de ser aplicada e ampliada para os próximos projetos, com foco na redução de operações unitárias necessárias para a purificação dos produtos e conseqüentemente, a redução de custos para produção industrial.

O sistema de produção acoplado à perstração se mostrou eficiente para a obtenção de ácido levulínico, com rendimento de produção de >90%, encorajando o grupo de pesquisa a desenvolver processos de obtenção dos demais ácidos pretendidos, que precisaram ser interrompidos devido à pandemia pelo novo coronavírus. Ainda, espera-se aprimorar a técnica de separação avaliada em relação ao tempo necessário para total extração, visto que esta demonstrou uma possível desestabilização e atingiu 35%, quando a fermentação ocorreu por 96 horas.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, a partir dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se citar:

- a) As realizações do sistema de produção acoplado à extração para os ácidos cítrico, itacônico e glucônico;
- b) A utilização de resinas do tipo Amberlite XAD, para a separação dos ácidos orgânicos e comparação com a técnica de perstração, determinando o processo mais rentável e passível de ser utilizado em escala industrial;
- c) O ácido levulínico poderia ser testado para a produção a partir da fermentação em cultivo em estado sólido, como por exemplo, fazendo o uso de resíduos industriais, como o bagaço de cana;
- d) O aumento de escala para todos os processos fermentativos analisados.

## 8. REFERÊNCIAS

AHMED, A.S.; FARAG, S.S.; HASSAN, I.A.; BOTROS, H.W. Production of gluconic acid by using some irradiated microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 374-380, 2015.

ALONSO, S.; DE LA VEGA, M.; DÍAZ, M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. **Critical Reviews in biotechnology**, v.35, n. 4, p. 497-513, 2014.

AMATO, A.; BECCI, A.; BEOLCHINI, F. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 199-212, 2020.

ANDERSEN, M. R.; SALAZAR M. P.; SCHAAP, P. J.; VAN DE VONDERVOORT P. J.; CULLEY, D.; THYKAER, J.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BERKA, R. M.; BRAUS, G. H.; BRAUS-STROMEYER, S. A.; CORROCHANO, L. M.; DAI, Z.; van DIJCK, P. W. M.; HOFMANN, G.; LASURE, L. L.; MAGNUSON, J. K.; MENKE, H.; MEIJER, M.; MEIJER, S. L.; NIELSEN, J. B.; NIELSEN, M. L.; van OOYEN, A. J. J.; PEL, H. J.; POULSEN, L.; SAMSON, R. A.; STAM, H.; TSANG, A.; van den BRINK, J. M.; ATKINS, A.; AERTS, A.; SHAPIRO, H.; PANGILINAN, J.; SALAMOV, A.; LOU, Y.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; GRIMWOOD, J.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P.; MARTINEZ, D.; van PEIJ, N. M. M. E.; ROUBOS, J. A.; NIELSEN, J.; BAKER, S. E. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome research**, v. 21, n. 6, p. 885–897, 2011.

ANTONETTI, C.; LICURSI, D.; FULIGNATI, S.; VALENTINI, G.; GALLETTI, A.M.R. New frontiers in the catalytic synthesis of levulinic acid: from sugars to raw and waste biomass as starting feedstock. **Catalysts**, v. 6, n. 12, p. 196, 2016.

ARMOA, M.H.; JAFELICCI JUNIOR, M. Princípios e aplicações de processos de separação por membranas inorgânicas. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal**, v. 2, n. 1, p. 80-97, 2011.

BAFANA, R.; PANDEY, R. A. New approaches for itaconic acid production: bottlenecks and possible remedies. **Critical Reviews in biotechnology**, v. 38, p. 68-82, 2018.

BALAMAN, Ş. Y. Decision-making for biomass-based production chains. **The basic concepts and methodologies**. Izmir: Academic Press, 2019. 258p.

BARRINGTON, S.; KIM, J. W. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 368-377, 2008.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MEJÍA, A. Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (Ed). **Current Developments in Solid-state Fermentation**. Nova York: Springer, 2008. Cap. 14, p. 302-336.

BARROS, A. **Purificação de penicilina G por adsorção em resinas hidrofóbicas**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia Química - UFSCar, São Carlos (SP), 2008.

BAZIN, H; BOUCHU A.; DESCOTES G.; PETIT-RAMEL M. Comparison of calcium complexation of some carboxylic acids derived from D-glucose and D-fructose. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 73, p. 1338-1347, 1995.

BECKER, J.; LANGE, A.; FABARIUS, J.; WITTMAN, C. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 168-175, 2015.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio da hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria (RS), 2010.

BELLA de JESUS, T. S. **Separação de ácido propanóico por perstração, obtido por via fermentativa, em processo contínuo**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2016.

BERGEY, D. H. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1957. 787p.

BEROVIC, M.; LEGISA, M. Citric acid production. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, p. 303-343, 2007.

BHAVE, R. **Inorganic membranes: synthesis, characteristics and applications**. New York: Chapman & Hall, 1991. 336p.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and production formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2261-2268, 2004.

BOMGARDNER, M. Interest in biobased levulinic acid grows. **Chemical & Engineering News**, 2015.

BORZANI, W. Fermentação semicontínua. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Comp.). **Biotecnologia industrial - Vol. 2: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. Cap. 11, p. 219-223.

CAMPANHOL, B. S. **Efeito da solução nutriente na produção microbiana sequencial de ácido cítrico e etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de São Carlos, Araras (SP), 2018.

CAÑETE-RODRÍGUEZ, A. M.; SANTOS-DUEÑAS, I. M.; JIMÉNEZ-HORNERO, J. E.; EHRENREICH, A.; LIEBL, W.; GARCÍA-GARCÍA, I. Gluconic acid: properties, production methods and applications - an excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1891-1903, 2016.

CARVALHO, W.; SILVA, D.D.V; CANILHA, S.; MANCILHA, I. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n. 18, p. 70-76, 2005.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Comp.). **Biotecnologia industrial - Vol. 2: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, Cap. 9, p. 193-205 2001.

CAȘCAVAL, D.; GALACTION, A. I.; TURNEA, M. Study of the influence of solute and carrier characteristics on facilitated pertraction mechanism in pseudosteady-state conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 328, p. 228-237, 2009.

CAȘCAVAL, D.; POȘTARU, M.; GALACTION, A.; KLOETZER, L.; BLAGA, A. C. Fractionation of carboxylic acids mixture obtained by *P. acidipropionic* fermentation using pertraction with tri-*n*-octylamine and 1-octanol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2685-2692, 2013.

CHEN, S.S.; MANEERUNG, T.; TSANG, D.C.W.; OK, Y.S.; WANG, C.H. Valorization of biomass to hydroxymethylfurfural, levulinic acid, and fatty acid methylester by heterogeneous catalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p. 246–273, 2017.

CHOI, S.; SONG, C.W.; SHIN, J.H.; LEE, S.Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. **Metabolic engineering** v. 28 p. 223-239, 2015.

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 22, 2017.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. **Fermentação contínua ou em Batelada?** 2017. Disponível em: <http://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>. Acesso em: 20 jun. 2020.

COLEN, Gecernir. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese de Doutorado - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2006.

CONNOR, J. M. The citric acid industry. **Studies in industrial organization** - SIOR, v. 26, p. 113-136, 2007.

CORAL, J.; KARP, S. G.; de SOUZA, V. P.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Batch fermentation model in propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 333-341, 2008.

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

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

de OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; de SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.

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

DHILLON, G. S.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 83-92, 2011.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 505-529, 2010

DUTTA, S.; YU, I. K.M.; TSANG, D. C.W.; NG, Y. H.; OK, Y. S.; SHERWOOD, J.; CLARK, J. H. Green synthesis of gamma-valerolactone (GVL) through hydrogenation of

biomass-derived levulinic acid using non-noble metal catalysts: a critical review. **Chemical Engineering Journal**, v.372, p.992-1006, 2019.

DUTTA, S.; YU, I. K.M.; TSANG, D.C.W.; SU, Z.; HU, C.; WU, K.C.W; YIP, A.C.K.; OK, Y. S.; POON, C. S. Influence of green solvent on levulinic acid production from lignocellulosic paper waste. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122544, 2020.

EL-BONDKLY, A. M. Gene transfer between different *Trichoderma* species and *Aspergillus niger* through intergeneric protoplast fusion to convert ground rice straw to citric acid and cellulases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, p. 117-132, 2006.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous fungal cultures - Process characteristics, products, and applications. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**, p. 225-261, 2007.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Comp.). **Biotecnologia industrial - Vol. 2: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, Cap. 8, p. 179-190, 2001.

FOX T.R.; COMERFORD N.B. Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the southeastern USA. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 54, p. 1139-1144, 1990.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

FREITAS, P. D. I. **Resíduos da indústria agro-alimentar como possíveis fontes de ácido ferúlico**. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade da Madeira, Madeira, Portugal, 2016.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

GAUDERETO, H. S. Production of levulinic acid from sugarcane bagasse: kinetic study, simulation and economic viability. **Engevista**, v. 19, p. 236-255, 2017.

GFBCHEMICALS. **Levulinic acid is a recognized versatile platform molecule to address a large market potential**. GFBiochemicals, 2015. Disponível em: <<http://www.gfbiochemicals.com/products/>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

GIRISUTA, B.; JANSSEN, L. P. B. M.; HEERES, H. J. Kinetic study on the acid-catalyzed hydrolysis of cellulose to levulinic acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.46, p. 1696-1708, 2007.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Industry analysis of levulinic acid market**. GMInsights, 2019. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/levulinic-acid-market>>. Acesso em: 19 nov. 2020.

GODAR, M. **Can this natural acid replace petroleum for the chemical and biofuel industries?** Labiotech.eu, 2016. Disponível em: <<http://labiotech.eu/levulinic-acid-replace-petroleum-chemicals-biofuel-gfbiochemicals/>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

GUO, C. J.; WANG, C. C. Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-13, 2014.

GUO, X. L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. X. Immobilization of *Rhodococcus sp.* AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

HABERT, A. C. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2006. 181p.

**HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH INSPECTORATE** - Annex 2 to the current edition of the good manufacturing practices guidelines schedule drugs (biological drugs) - GUI- 0027, 2002.

JANG, M. G.; KIM, B.; SHIN, J.H.; CHOI, Y.J.; CHOI, S.; SONG, C. W.; LEE, J.; PARK, H.G.; LEE, S.Y. Bio-based production of C2-C6 platform chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v.109, p. 2437-2459, 2012.

KAMZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA N.V.; MORGUNEY 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.

KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 189-196, 2003.

KAUR, A.; VOHRA, D. K. Study of bulk liquid membrane as a separation to recover acetic and propionic acids from dilute solutions. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 17, p. 133-138, 2010.

KHOSRAVI-DARANI, K.; ZOGHI, A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: experimental design for citric acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6986-6993, 2008.

KIM, H.M.; PARK, J.H.; CHOI, I.S.; WI S.G.; HA, S.; CHUN, H.H.; HWANG I.M.; CHANG, J.Y.; CHOI, H.J.; KIM, J.C.; PARK, H, W. Effective approach to organic acid production from agricultural kimchi cabbage waste and its potential application. **Plos One**, v.13, p. 1-14, 2018.

KIMURA, V. T; POÇO, J.G.R.; DERENZO, S.; MATSUBARA, R.M.S.; GOMES, D. Z.; MARCANTE, A. **Obtenção de ácido levulínico e outros produtos a partir de açúcares usando catalisadores heterogêneos**. 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0427-25529-179099.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

KRIJGSHELD P.; BLEICHRODT R.J.; VELUW G.J; WANG F; MULLER W.G. Development of *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KRULL, S.; HEVEKERL, A.; KUENZ, A.; PRÜBE, U. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 4063-4072, 2017.

KUBICEK, C. P. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 189-196, 2003.

KUMAR, A.; SHENDE, D.; WASEWAR, K. L. Extractive separation of levulinic acid using natural and chemical solvents. **Chemical Data Collections**, v. 28, p. 100417-100427, 2020.

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

LEUCHTENBERGER, W.; HUTHMACHER, K.; DRAUZ, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 1-8, 2005.

LIMA, U. A. (Org.). **Biotecnologia industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2019. 760 p.

LOPES, S. M. **Estudos preliminares de produção de ácido glucônico a partir de sacarose invertida em biorreator airlift**. Dissertação de Mestrado - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

MARZO, C.; DÍAZ, A.B.; CARO, I.; BLANDINO, A. Status and perspectives in bioethanol production from sugar beet. In: RAY, R.; RAMACHANDRAN, S. (Ed). **Bioethanol production from food crops**. Cambridge: Academic Press, 2019. Cap. 4, p. 61-79.

MAGNUSON J.K.; LASURE L.L. Organic acid production by filamentous fungi. In: TKACZ J.S.; LANGE L (Ed.). **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. Boston: Springer US, 2004. Cap. 12, p. 307-340.

MARKETS AND MARKETS. 2015. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/organicacid.asp>>. Acesso em: 06 jul. 2020.

MCMURRY, J. **Organic chemistry**. 7 ed. Nova York: Thonsom Brooks/Cole, 2008. 1340p.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 37-46, 2002.

MERLET, G.; URIBE F.; ARAVENA, C.; RODRÍGUEZ M.; CABEZAS R.; QUIJADA-MALDONADO, E.; ROMERO, J. Separation of fermentation products from ABE mixtures by perstraction using hydrophobic ionic liquids as extractants. **Journal of Membrane Science**, v. 537, p. 337-343, 2017.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A.F. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 469–476, 2011.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação De Fungos Dos Gêneros *Aspergillus* E *Penicillium* Em Solos Preservados Do Cerrado**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras (MG), 2012.

MORAES, L. S. **Extração líquido-líquido de ácido succínico usando contactores com membranas de fibra oca**. Dissertação de Mestrado - Instituto Alberto Coimbra - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro (RJ), 2011.

MORALES-OYERVIDES, L.; OLIVEIRA J.; SOUSA-GALLAGHER, M.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J.C. Perstraction of intracellular pigments through submerged fermentation of *Talaromyces spp.* in a surfactant rich media: a novel approach for enhanced pigment recovery. **Journal of fungi**, v. 3, p. 3-33. 2017.

MORONE, A.; APTE, M.; PANDEY, R. Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 548-565, 2015.

MUKHERJEE, A.; DUMONT, M.J.; RAGHAVAN, V. Review: Sustainable production of hydroxymethylfurfural and levulinic acid: Challenges and opportunities. **Biomass and Energy**, v. 72, p. 142-183, 2015.

NADUMANE, V. K.; VENKATACHALAM, P.; GAJARAJ, B. *Aspergillus* applications in cancer research. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 243-255, 2016.

NARAIAN, R.; KUMARI, S. Microbial production of organic acids. **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals**, p. 93-121, 2017.

OKABE M.; LIES D.; KANAMASA S.; PARK, E. Y. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 597-606, 2009.

OUTRAM, V. **In Situ Product Recovery of Butanol from the Acetone Butanol Ethanol Fermentation**. Tese de Doutorado - Engineering Doctorate in Biopharmaceutical Process Development, Biopharmaceutical and Bioprocess Technology Centre, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, 2018.

PAL, P.; KUMAR, R.; BANERJEE, S. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 104, p. 160-171, 2016.

PANDA, S.K.; LOPAMUDRA, S.; SUNIL K. B.; RAY, R. C. Research and production of organic acids and industrial potential. In: MOLINA, G.; GUPTA, V.K; SINGH, B.N; GATHERGOOD, N. (Ed). **Bioprocessing for biomolecules production**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2020. Cap. 9, p. 195-209.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, vol. 77, p. 149-162, 1999.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 161–202, 2017.

PASTOR, F. J.; GUARRO, J. Treatment of *Aspergillus terreus* infections: A clinical problem not yet resolved. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 281-289, 2014.

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, p.149-159, 2011.

PATEL A.D.; SERRANO-RUIZ J.C.; DUMESIC J.A. Technoeconomic analysis of 5-nonanone production from levulinic acid. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 311-321, 2010.

PATIL S. K. R.; LUND C. R. F. Formation and growth of humins via aldol addition and condensation during acid-catalyzed conversion of 5-hydroxymethylfurfural. **Energy Fuel**, v. 25, p. 4745-4755, 2011.

PAWAR, N.V.; PATIL, V.B.; KAMBLE, S.S.; DIXIT, G.B. First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on *Zingiber officinale* from India. **Plant Disease**, v. 92, p. 1368- 1368, 2008.

PEDROSO, G. B. **Produção biotecnológica de ácido itacônico a partir da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), 2014.

PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 1, p. 17-32, 1994.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y.V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.3, p. 301-307, 2005.

QURESHI, N.; MADDOX, I. S. Reduction in butanol inhibition by perstraction. **Food and Bioproducts Processing**, v. 83, p. 43-52, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: propeties, applications and microbial production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.

RAMIREZ, E. N. M. **Produção biotecnológica de ácido itacônico por diferentes metodologias de fermentação utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus terreus***. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2015.

RICHTER, D. B.; OH, N.-H.; FIMMEN, R.; JACKSON, J. The rhizosphere and soil formation. **The Rhizosphere: An Ecological Perspective**, p. 179-190, 2007.

SAHA, B.C. Emerging biotechnologies for production of itaconic acid and its applications as a platform chemical. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, p. 303-315, 2017.

SALLAM, L. A.; EL-REFAI, A. M.; HAMDY, A. H.; EL- MINOFI, H. A.; ABDEL-SALAM, I. S. Role of some fermentation parameters on cyclosporin a production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p. 321-328, 2003.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39-55, 2011.

SANTOS, L. R. B. **Membranas para ultrafiltração a base de dióxido de estanho preparadas pelo processo sol-gel**. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

SAUER, M. ; PORRO, D ; MATTANOVICH, D.; BRANDUARTE, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 100-108, 2008.

SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Comp.). **Biotecnologia Industrial - Vol. 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. Cap. 8, p. 179-190.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTYIA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. São Paulo: ABES, 2001. 233p.

SCOTT, K.; HUGHES R. **Industrial Membrane Separation Technology**, Chapman & Hall, 1996. 305p.

SINGH. R.; MITTAL, A.; KUMAR M.; MEHTA P.K. Organic acids: an overview on microbial production. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 8, p. 104-111, 2017.

SOCCOL, C.; VANDENBERGHE, L.; RODRIGUES, C. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 141-149, 2006.

SOUSA, G. S. **Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2016.

STACEY, G. Fundamental issues for cell-line banks in biotechnology and regulatory affairs. **Life in the Frozen State**. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida- EUA, p. 437-452, 2004.

STEIGER, M. G.; RASSINGER, A.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. **Metabolic Engineering**, v.52, p.224-231, 2018.

STEIGER, M. G.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Microbial organic acid production as carbon dioxide sink. **Fems Microbiology Letters**, v. 364, n. 21, p.1-4, 2017.

SUN, J.; ZHU, Z.-X.; SONG, Y.-L.; REN, Y.; DONG, D.; ZHENG, J; LI, J. Anti-neuroinflammatory constituents from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. **Natural Product Research**, v. 31, p. 562-567, 2016.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Filamentous fungi and chemistry: old friends, new allies. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAKAYA, R. **Preparação e avaliações comparativas das propriedades físico-químicas entre os hidrogéis de poliacrilato de sódio e de ácido itacônico para potencial aplicação como biomaterial**. Tese de Doutorado - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (SP), 2014.

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

van LEEUWEN M.R.; KRIJGSHELD P.; WYATT T.T.; GOLOVINA, E.A. *et al.* The effect of natamycin on the transcriptome of conidia of *Aspergillus niger*. **Studies in Mycology**, v.74, n.1, p.71-85, 2013.

van PUTTEN, R.J.; VAN DER WAAL, J. C.; DE JONG, E.; RASRENDRA, C. B.; HEERES, H. J.; DE VRIES, J. G. Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. **Chemical Review**, v. 113, p. 1499-1597, 2013.

van WYK, J. P. H; SIBIYA, J. B. M. Bioconversion of waste newspaper into fermentable sugars at different temperatures with different *Aspergillus niger* cellulase concentrations. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 4, n. 9, p. 69-74, 2016.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD J.C.; HONG, S.B; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUSHI, T.; SAMSOM, RA. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014.

WALSH, T. J.; GROLL, A. H. Overview: Non-fumigatus species of *Aspergillus*: perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 2, p. 1366-1367, 2001.

WANG, B.; LI, H.; ZHU L.; TAN, F.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 6, p. 891-899, 2017.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WASEWAR, K. L.; PANGAKAR, V. G. Intensification of propionic acid production by reactive extraction: effects of diluents on equilibrium. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 20, p. 325-331, 2006.

WASEWAR, K. L.; YOO, C. K. Intensifying the recovery of carboxylic acids by reactive extraction. **3rd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering**, v. 38, p. 249-255, 2012.

WERPY, T.; PETERSEN G. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. **Top value-added chemicals from biomass**, v. 1, p. 1-66, 2004.

WILLAERT, R. Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology. In: EL-MANSI, E.M.T; NIELSEN, J.; MOUSDALE, D.; CARLSON, R. P. (Ed.). **Fermentation Microbiology and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2011. Cap. 12, p. 313-367.

WINDMOLLER, D. **Extração de ácidos carboxílicos através de membranas: (perstração)**. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 1995.

YOO, I. K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 5, p. 428-433,1996.

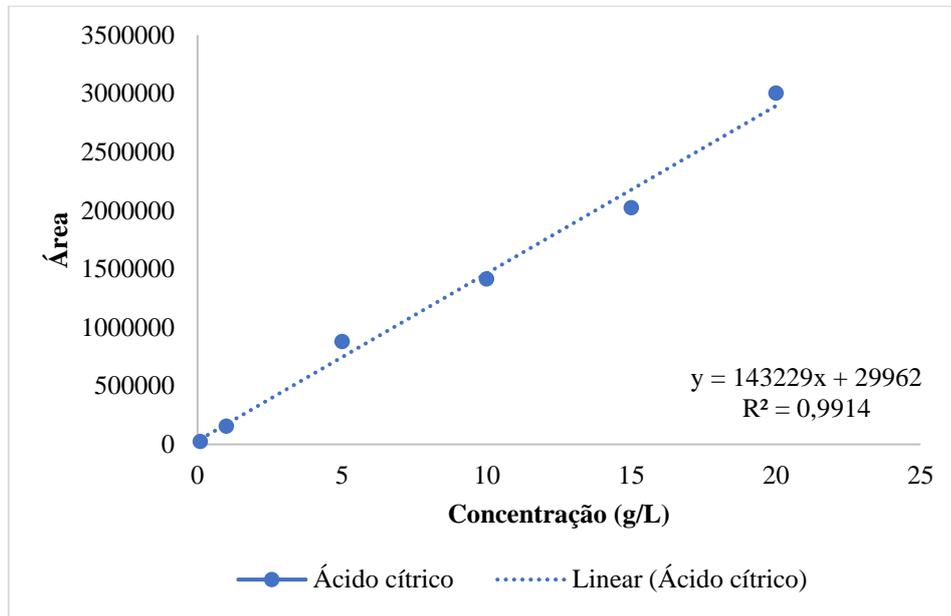
ZHANG, A.; YANG, S. T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineering *Propionibacterium acidipropionici*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1346-1351, 2009.

ZHAO, Y.; DAMGAARD, A.; CHRISTENSEN, T. H. Bioethanol from corn stover - A review and technical assessment of alternative biotechnologies. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 67, p. 275-291, 2018.

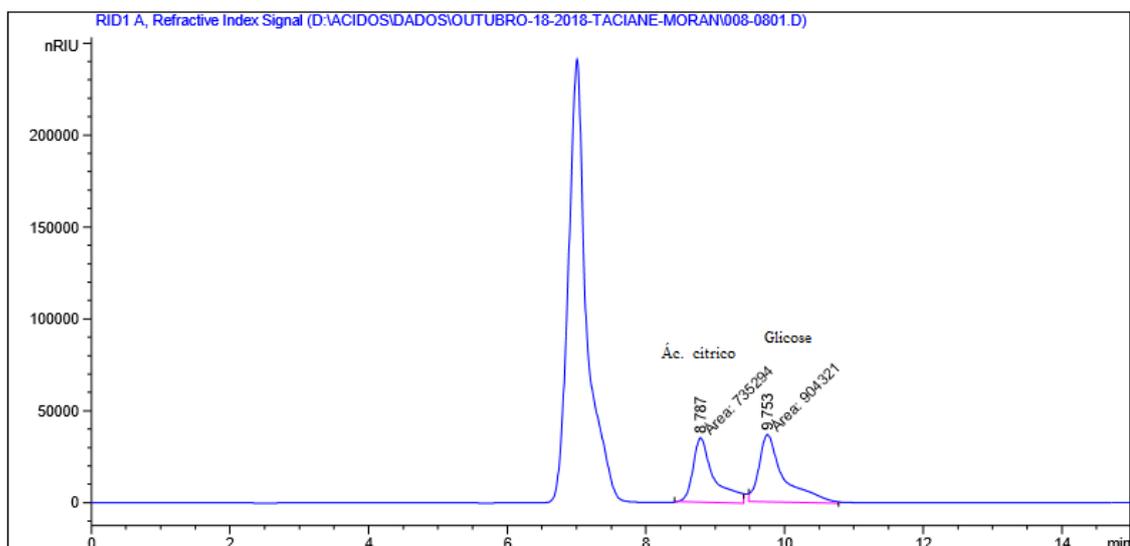
ZHOU, H.; LI, L.; WANG, W.; CHE, Q.; LI, D.; GU, Q.; ZHU, T. Chrodripanins I and J from the Antarctic moss-derived fungus *Penicillium funiculosum* GWT2-24. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1442-1445, 2015.

## 9. APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMAS

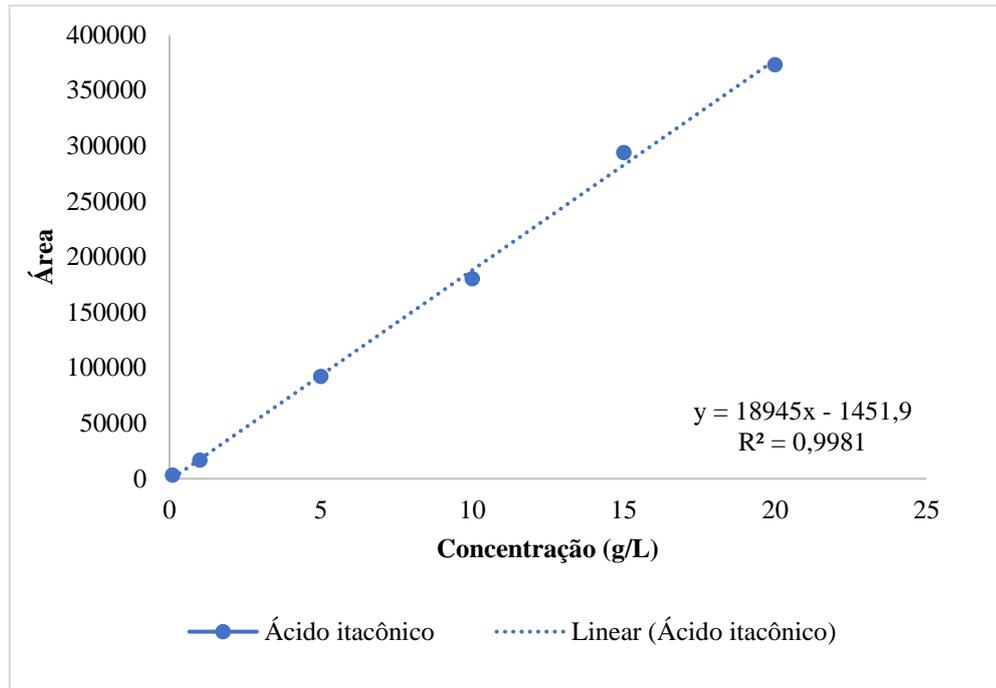
Abaixo podem ser visualizadas as curvas de calibração e exemplos de cromatogramas obtidos ao decorrer do projeto, Figuras de A-1 a A-8. Nos cromatogramas, o primeiro pico foi determinado como ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), utilizado para a neutralização das amostras.



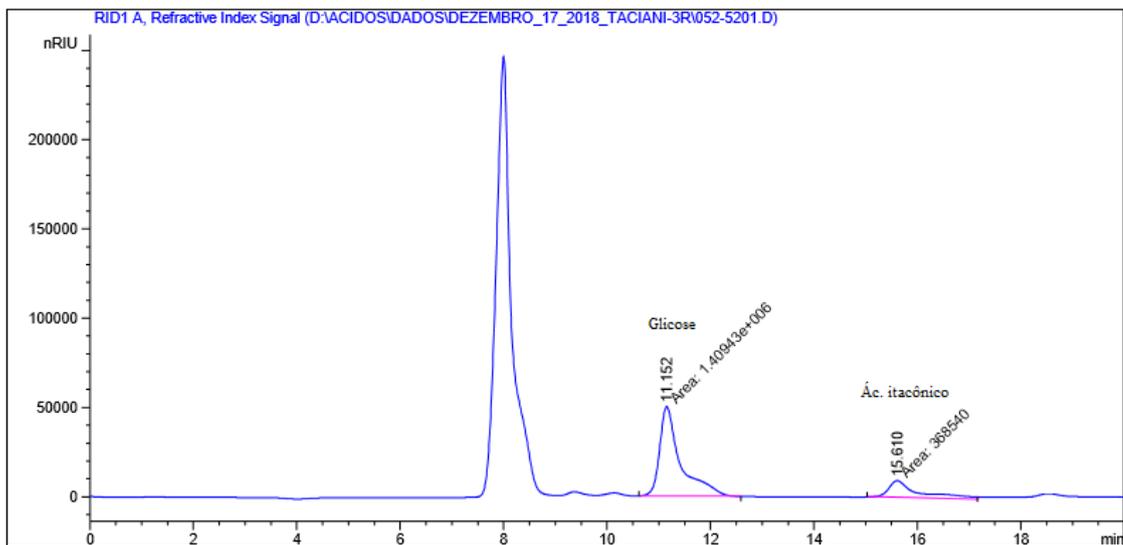
**Figura A-1:** Exemplo de curva de calibração para o ácido cítrico.



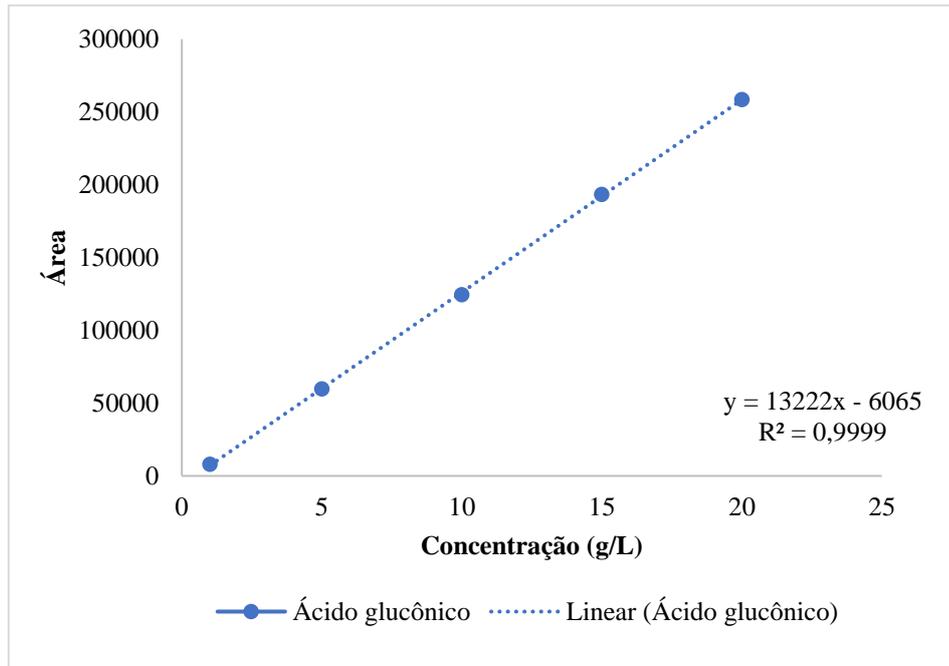
**Figura A-2:** Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido cítrico.



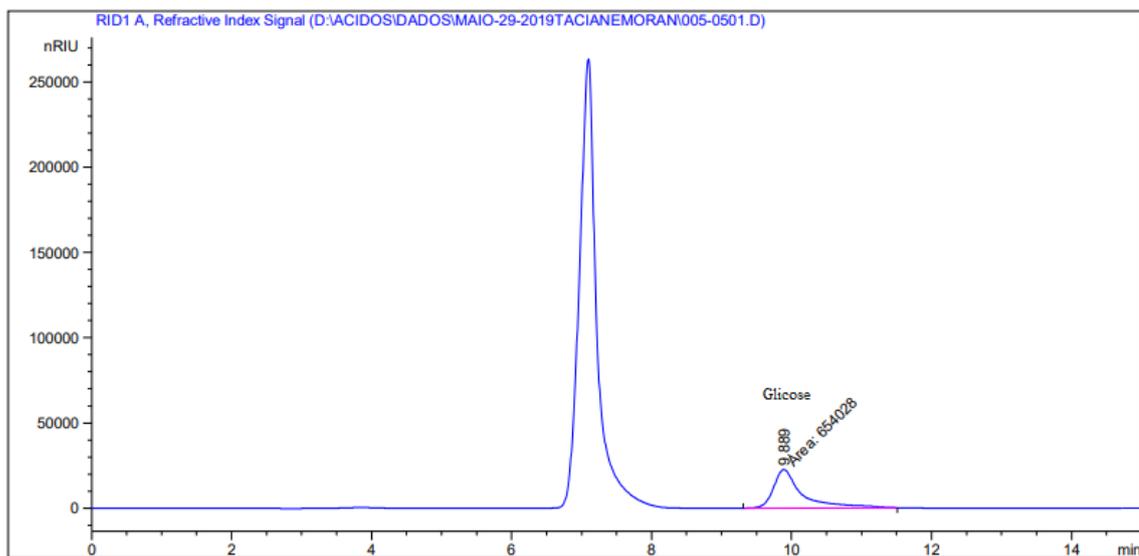
**Figura A-3:** Exemplo de curva de calibração para o ácido itacônico.



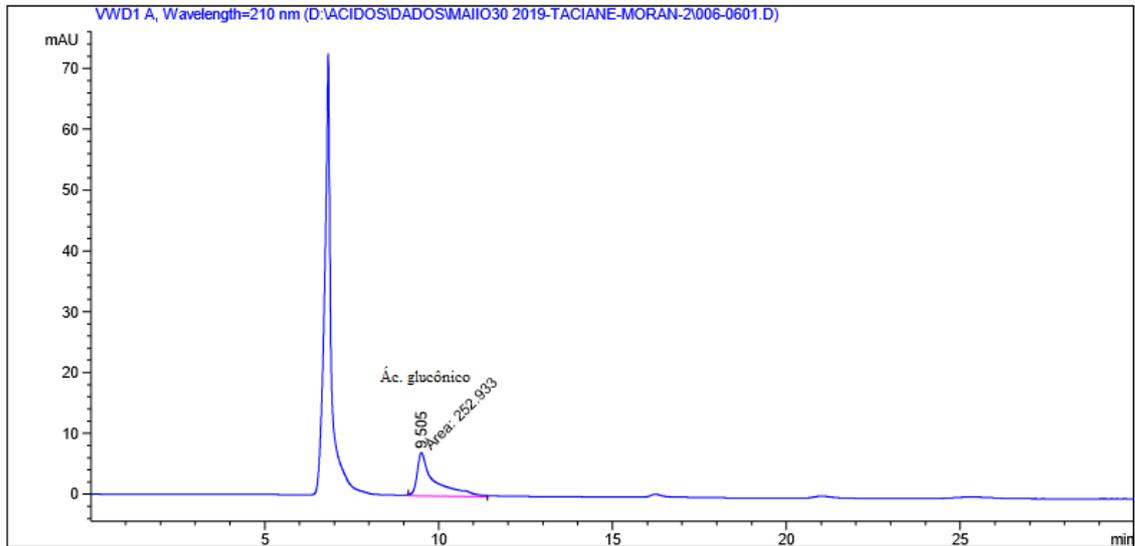
**Figura A-4:** Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido itacônico.



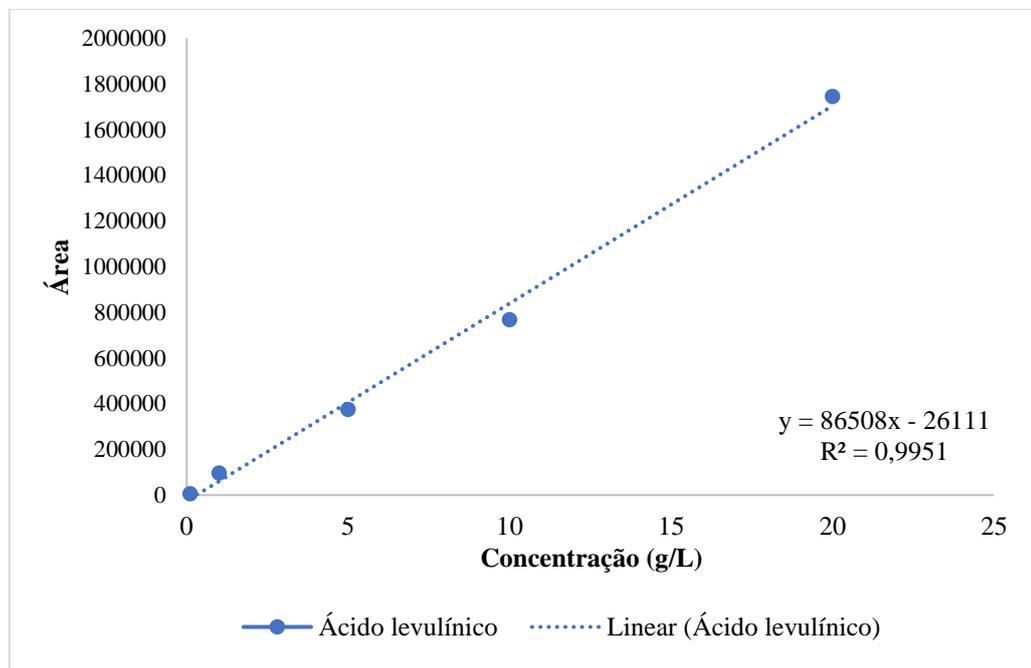
**Figura A-5:** Exemplo de curva de calibração para o ácido glucônico.



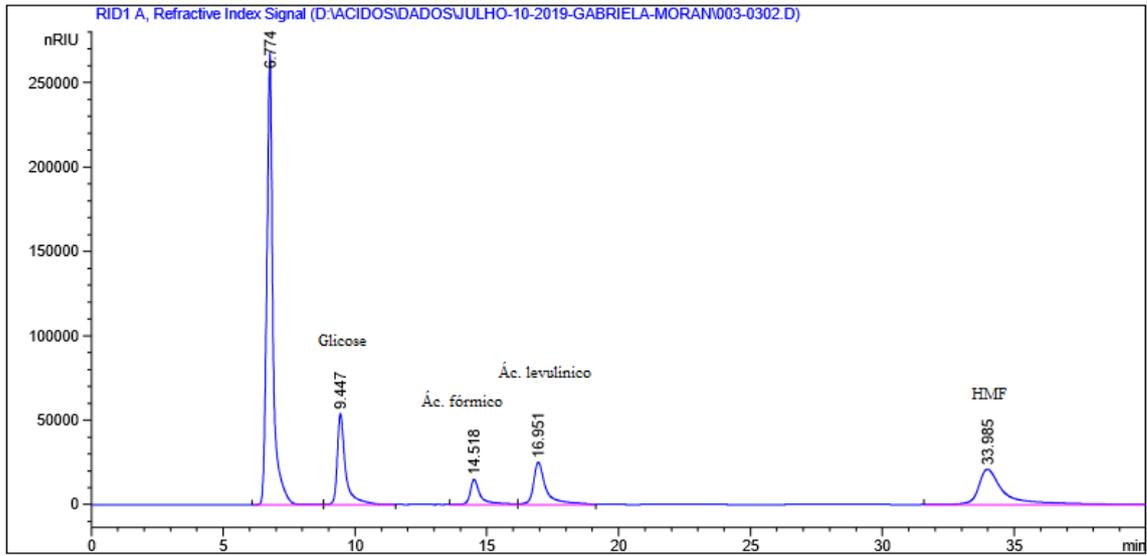
**Figura A-6:** Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido glucônico. Neste caso, as amostras foram analisadas por dois detectores, pois como o ácido glucônico possui o mesmo tempo de retenção da glicose quando utilizado o índice de refração (RID), estas também foram quantificadas por ultravioleta (UV). Dessa forma, é possível se obter o valor de área para a glicose através do índice de refração, descontando-se a área obtida para o ácido glucônico no ultravioleta.



**Figura A-7:** Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido glucônico, analisado por detector UV.



**Figura A-8:** Exemplo de curva de calibração para o ácido levulínico.



**Figura A-9:** Exemplo de cromatograma obtido na produção de ácido levulínico.