



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

JÚNIOR NAKANISHI SILVA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DO
ARROZ**

Assis

2011

JÚNIOR NAKANISHI SILVA

PRODUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO
DO ARROZ

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Idécio Nogueira da Silva

Área de Concentração: Química

Assis

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

NAKANISHI, Júnior Silva

Produção de Ácido Kójico Através da Fermentação do Arroz / NAKANISHI, Júnior Silva. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011. 55p.

Orientador: Idélcio Nogueira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Ácido Kójico. 2.Fermentação. 3. Fungos.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

PRODUÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DO ARROZ

JÚNIOR NAKANISHI SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva

Analisador: Ms. Patrícia Cavani Martins de Melo

Assis
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Primeiramente a Deus.

A todos os amigos que me apoiaram durante esses anos.

A meus pais Carlos e Jaci Joana

A minhas irmãs Patrícia e Tatiane

A meus sogros Maria de Lourdes e Zé Nunes (*in memoriam*)

Em especial a minha esposa Alessandra e a minha pequena Mariana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por iluminar meus passos, a todos os professores, em especial ao Prof. Dr. Idécio Nogueira da Silva pela orientação durante o trabalho.

A todos os amigos pela convivência, pelos momentos agradáveis, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos familiares, meus Pais Carlos e Jaci pelo incentivo e contínuo apoio em todos estes anos.

Agradeço em especial a minha esposa pelo incentivo em horas difíceis e por me apoiar incondicionalmente.

Não é digno de saborear o mel,
aquele que se afasta da colméia
com medo das picadas das
abelhas.

William Shakespeare

RESUMO

O ácido kójico é uma substância natural produzida biologicamente por vários fungos e bactérias, entre elas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter* durante a fermentação aeróbia, utilizando carboidratos como fonte de energia. No presente trabalho para produção do ácido kójico foi utilizado o fungo *Aspergillus*, onde 100 g de arroz cozido passaram por um processo de fermentação durante 240 horas. Após o término da fermentação, a solução fermentada passou por um processo de clarificação, seguida da determinação da concentração de ácido kójico presente no fermentado. A determinação da concentração de ácido kójico foi realizada através de análise no espectrofotômetro do complexo de ácido kójico com Ferro(III) em 505 nm. A partir de padrões de ácido kójico foi obtida uma curva de calibração. A análise do meio após fermentação resultou numa concentração de 6,987 g de ácido kójico por 100 g de arroz. Em seguida o ácido kójico foi cristalizado através de evaporação, resultando em 6,126g de ácido kójico impuro. Visto que o arroz quebrado perde seu valor de mercado, este pode ser utilizado para produção de ácido kójico para ganhar mais valor agregado.

Palavras-chave: ácido kójico; fermentação; fungos.

ABSTRACT

Kojic acid is a natural substance produced biologically by various fungi and bacteria, including species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Acetobacter* during aerobic fermentation using carbohydrates as a source of energy. In the present work for kojic acid production it was used the fungus *Aspergillus*, where 100 grams of cooked rice were submitted to a fermentation process for 240 hours. After fermentation the fermented solution passed through a clarification process followed by determining the concentration of kojic acid present in fermented. Determination of kojic acid concentration was performed by spectrophotometric analysis of kojic acid complex with iron(III) at 505 nm. Using standards of kojic acid it was obtained a calibration curve. Analysis of fermented media resulted in a concentration of 6.987g of kojic acid in 100 g of rice. Then Kojic acid was crystallized by evaporation resulting in 6.126 g of impure kojic acid. Since broken rice loses its market value, it can be used for the production of kojic acid to gain more value.

Keywords: kojic acid; fermentation; fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química do ácido kójico.....	18
Figura 2 -	Biossíntese do ácido kójico a partir da glicose.....	19
Figura 3 -	Dois possíveis caminhos metabólicos para biossíntese da glicose em ácido kójico.....	19
Figura 4 -	Fungo <i>Aspergillus</i>	39
Figura 5 -	Fermentação aeróbica.....	42
Figura 6 -	Parte líquida do fermentado.....	42
Figura 7 -	Fermentado clarificado.....	43
Figura 8 -	Identificação de ácido kójico através da complexação com cloreto de ferro III.....	43
Figura 9 -	Padrões de ácido kójico.....	44
Figura 10 -	Curva de calibração do ácido kójico.....	45
Figura 11 -	Ácido kójico cristalizado.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações sobre ácido kójico.....	20
Tabela 2 - Utilização do ácido kójico.....	21
Tabela 3 - Resultados da concentração de ácido kójico.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EUA	Estados Unidos da América
HHMP	5-hidroxi – 2-hidroximetil – y-pirona
AK	Ácido Kójico
ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos
FDA	Food and Drug Administration
G-6-PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
NB-2	Nível de biossegurança 2
EPI's	Equipamentos de proteção individual

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	ÁCIDO KÓJICO.....	18
2.1	PROPRIEDADES DO ÁCIDO KÓJICO.....	20
2.2	APLICAÇÕES DO ÁCIDO KÓJICO.....	20
2.2.1	Cosméticos e saúde.....	21
2.2.2	Medicina.....	22
2.2.3	Alimentos.....	22
2.2.4	Agricultura.....	23
2.2.5	Laboratórios industriais.....	23
3.	FUNGOS.....	24
3.1	MORFOLOGIA FÚNGICA.....	25
3.2	TAXONOMIA FÚNGICA.....	25
3.3	FUNGOS ASPERGILLUS.....	26
4.	FERMENTAÇÃO.....	27
4.1.	PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DO ARROZ.....	29
4.1.1	Técnicas de fermentação e insumos importantes.....	29
4.1.1.1	Cultivo em meio líquido.....	29
4.1.1.2	Fontes de carboidratos.....	30
4.1.1.3	Fontes de nitrogênio.....	31
4.1.1.4	Fontes de fosfato.....	31

4.1.1.5	Inibidores e estimulantes.....	31
4.1.1.6	Controle de pH.....	31
4.1.1.7	Aeração e agitação.....	32
5.	O TEMA MICRORGANISMO E FERMENTAÇÃO COMO FERRAMENTA INTERDISCIPLINAR.....	33
5.1	ATIVIDADES.....	34
5.1.1	Leitura e discussão de texto.....	34
5.1.2	Realização de experimento.....	34
5.1.2.1	Materiais.....	35
5.1.2.2	Procedimentos.....	35
5.1.3	Avaliação através de questionários.....	36
6.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
6.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	37
6.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	38
6.2.1	Isolamento do fungo.....	38
6.2.2	Processo fermentativo.....	39
6.2.3	Clarificação.....	39
6.2.3	Determinação qualitativa de ácido kójico.....	39
6.2.4	Determinação da concentração de ácido kójico.....	39
6.2.4.1	Reagentes.....	40
6.2.4.2	Procedimento para construção da curva de calibração.....	40
7.	RESULTADOS.....	42
8.	CONCLUSÃO.....	48

9.	REFERÊNCIAS.....	49
-----------	-------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX quando o ácido kójico foi descoberto, tem sido muito estudado devido às várias utilizações em diversos setores como de alimentos, fármacos, cosméticos, entre outros (AYTEMIR; SEPTIOGLU; ÇAHS, 2010). Porém nos últimos anos sua principal valorização esta ocorrendo no setor de cosméticos. No mundo contemporâneo, como a procura pela beleza física vem se intensificando, (MACRINI, 2004), proporciona um grande aumento no consumo de produtos relacionados à saúde, higiene e beleza. Segundo Gandolpho (2011), em 2010, o Brasil alcançou o terceiro lugar no ranking dos maiores mercados de produtos relacionados a cosméticos, dobrando seu faturamento nos últimos cinco anos. Tradicionalmente ingredientes cosméticos costumavam ser limitados aos extratos de plantas, hidrolisados, óleos essenciais e vitaminas, mas agora, novas moléculas estão sendo estudadas e incorporadas aos cosméticos (NOH, et al., 2007), como no caso do ácido kójico, antes utilizado somente nas indústrias alimentícias, vem ganhando destaque neste setor de cosméticos, pois previne a hiper pigmentação da pele restringindo a formação de melanina através da inibição da tirosinase.

Além de possuir atividade antioxidante e ser utilizados em cosméticos destinados ao clareamento da pele, também possui atividade antimicrobiana, antipartícula de pesticidas e inseticidas, antitumoral, antidiabéticos e possui atividades antiproliferativas (AYTEMIR; SEPTIOGLU; ÇAHS, 2010).

O ácido kójico é uma substancia natural produzida biologicamente por vários fungos e bactérias, entre elas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter* durante a fermentação aeróbia, utilizando como fonte de energia carboidratos (FERREIRA, et al., 2010). Foi descoberto no Japão por Saito, em 1907, a partir da fermentação do arroz branco (*Koji* em japonês), onde deu origem ao seu nome ácido kójico (HOWARD, 2009).

No Japão, parte do arroz produzido é destinado as indústrias de produção de bebidas alcoólicas, produtos alimentícios, além de ácidos orgânicos e produtos

farmacêuticos. O primeiro processo fermentativo utilizando arroz como substrato foi na produção de saquê, data do século III. Até meados do século V, os produtores não possuíam conhecimentos de técnicas de fermentação (DANTAS; GONÇALVES, 2007; FERREIRA; SARAIVA, 2007). Atualmente a fermentação é uma ferramenta muito utilizada nos processos industriais e apresenta importância crescente em diversos setores da economia. Muitas empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI, 2001).

Em 1955 a Charles Pfizer and Company, nos EUA, anunciou a primeira tentativa de fabricar este ácido orgânico industrialmente, a empresa patenteou os métodos para a produção e sua recuperação. Embora, o ácido kójico tenha sido produzido em escala industrial, não houve um grande interesse comercial na época, atualmente com o crescimento do mercado de cosméticos, o uso do ácido kójico comercialmente ganhou valorização (ROSFARIZAN, et al., 2010).

O Brasil possui uma grande capacidade no setor de agroindústrias, sendo as que mais se destacam utilizando processos fermentativos são as indústrias de produção de combustíveis, utilizando como fonte de substrato a cana de açúcar (LINS; SAAVEDRA, 2007).

Mesmo o Brasil tendo uma das maiores produções de arroz do mundo, não possui tradição em produtos relacionados à fermentação do arroz (RODRIGUES, et al., 2010). Somente nos últimos anos algumas empresas começaram a produção de saquê em escala industrial e mesmo com a valorização do ácido kójico não se tem registro do produto produzido nacionalmente. Vários trabalhos estão se aplicando para o desenvolvimento de microrganismos e substratos para produção de ácido kójico.

Esse trabalho tem como objetivo a produção de ácido kójico através da fermentação do arroz desclassificado pela indústria para consumo, utilizando linhagens de *Aspergillus* selvagem.

2. ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico (AK) [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona] é uma substância natural produzida por fungos e bactérias, entre elas a mais importante são as espécies do gênero *Aspergillus*. Foi descrito pela primeira vez no Japão por Saito, em 1907. Relatou a descoberta de um novo ácido orgânico produzido por *Aspergillus oryzae*. Desde então, vários autores descreveram a produção de ácido kójico com diferentes tipos de substrato. Mais tarde em 1924, Yabuta conseguiu esclarecer o nome e a estrutura do ácido kójico como 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona (figura 1) (CORRER, 2005; BRTKO, et al., 2004).

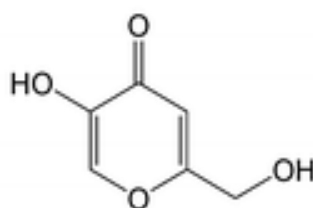


Figura 1: Estrutura química do ácido Kójico (In: CORRER, 2005).

Composto heterocíclico de seis membros contendo oxigênio no seu anel constitui uma importante classe de produtos naturais biologicamente ativos, desempenhando um papel fundamental na química. Possui vários centros importantes que permitem que ele sofra várias reações adicionais, tais como oxidação e redução, alquilação e acilação e reações de substituição nucleofílica e eletrofílica (AYTEMIR; SEPTIOOGLU; ÇAHS, 2010, p. 22). De acordo com Arnstein e Bentley (2006), a principal via biosintética do ácido kójico é a conversão do amido em glicose e a glicose em ácido kójico sem a quebra do anel (figura 2) (FERREIRA, et al., 2010, p. 570),



2.1 PROPRIEDADES DO ÁCIDO KÓJICO

Propriedade	
Forma molecular	$C_6H_6O_4$
Apresentação	Pó cristalino amarelo branco a luz
Massa Molecular	142,12 g/mol
Contaminantes	Metais pesados
Solubilidade em água	43,85 g /L
Especificações adicionais	Sabor e cheiro ligeiramente amargo
pH e pKa	pH: 4,7 (1 w / v % em água) , pKa 7,9 e 8,5
Absorção de Radiação	UV: λ max. 270 nm. (solvente: água)

Tabela 1 – Especificações sobre o ácido Kójico (In: Directorate-General for Health & Consumers).

2.2 APLICAÇÕES DO ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico tem aplicações em diversos setores, como nas indústrias de cosméticos, medicina, indústrias de alimentícios, agroindústrias e laboratórios industriais (tabela 2), porém no Brasil o benefício mais notável do ácido kójico é encontrado na área de cosméticos e saúde (SANTOS, et al., 2006).

Setores	Funções
Medicina	Antibacteriano
	Antifúngico
	Analgésico
Alimentos	Realçador de sabor
	Antioxidante
Agricultura	Antimelanose
	Ativador de inseticidas
Cosméticos	Branqueador de pele
	Filtro ultravioleta
	Antioxidante
	Protetor contra radiação
Química	Reagente para determinação de ferro
	Quelante de ferro

Tabela 2 – Utilizações do ácido kójico (In: ROSFARIZAN, et al., 2010).

2.2.1 Cosméticos e Saúde

No Brasil o benefício mais notável do ácido kójico é encontrado na área de cosméticos e saúde. Utilizado em indústrias de cosméticos em formulação de produtos destinados a proteção da pele contra raio solar e branqueadores de pele para controlar sardas e manchas de idade. De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o setor apresentou um crescimento médio anual de 10,9% nos últimos 12 anos, enquanto o mercado mundial cresceu torno de 2,8%. Devido à exposição da radiação solar, o número de pessoas com doenças de pele vem aumentando rapidamente. O ácido kójico tem a capacidade de atuar como protetor ultravioleta,

segundo o qual, ele suprime a hiperpigmentação da pele, restringindo a formação de melanina através da inibição da formação de tirosinase, uma enzima responsável pela pigmentação (CHAMBERS, et al., 2008). E com a proibição da utilização de hidroquinona na produção de cosméticos em muitos países, assinalado como um possível composto cancerígeno pela Food and Drug Administration (FDA) do EUA, levou a um significativo aumento no uso do ácido kójico como um substituto para a hidroquinona (HESELTINE, et al., 2001).

2.2.2 Medicina

Está molécula também pode ser utilizada na produção de analgésicos, antibióticos e antiinflamatórios. O ácido kójico e seus derivados possuem propriedades antibióticas contra certas bactérias gram-negativas, bem como bactérias gram-positivas, é ativo contra bacilos da tuberculose em humanos, segundo o qual 45 mg / 100 mL de ácido kójico inibem completamente o crescimento de bacilos. Mostra efeitos antifúngicos contra diversas espécies de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Fusarium* (BENJAMIN, 1966).

2.2.3 Alimentos

O ácido kójico tem um grande potencial no setor de alimentos, Seus aspectos em alimentos têm sido avaliados por Burdock; Soni; Carabin (2001). De fato, os pesquisadores sugeriram que o consumo de ácido kójico, em níveis normalmente encontrados em alimentos, não exige uma preocupação para a saúde, sendo assim ele pode ser utilizado como um aditivo alimentar para realçar o sabor dos alimentos e prevenir o escurecimento enzimático e a descoloração de alimentos, já que age como um antioxidante.

2.2.4 Agricultura

Possui atividade inseticida contra certos *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*. Além disso, tem sido empregado como um agente quelante para a produção de inseticidas (BENJAMIN, 1966).

2.2.5 Laboratórios Industriais

É utilizado quimicamente em determinações analíticas de minérios de ferro. (CHAMBERS, et al., 2008). Também utilizado em determinações de amônia na atmosfera (CASTRO, 2005). Numerosas reações químicas do ácido kójico foram estudadas ao longo das décadas desde o seu isolamento. O grupo hidroxila atua como um ácido fraco, que é capaz de formar complexos com alguns metais como o sódio, zinco, cobre, cálcio, níquel e cádmio (CHAMBERS, et al., 2008).

3. FUNGOS

Os fungos foram considerados vegetais durante muito tempo e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino a parte, denominado *Fungi*. Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não tem celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como reserva de energia. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (ROVEDA, 2007).

Os fungos como as algas e os protozoários apresentam uma organização celular eucariótica, ou seja, o seu material genético está contido no núcleo e separado do citoplasma pela membrana nuclear (TRABULSI, et al., 2006). A dispersão dos fungos na natureza é feita por várias vias: animais, insetos, água e principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos (ROVEDA, 2007). Os fungos originam-se de uma única célula ou de um fragmento da hifa e estas unidades apresentam estruturas variadas, sendo que algumas delas são de grande auxílio na taxonomia destes microrganismos (PELCZAR, et al., 1996).

Microrganismos eucariotos têm sido muito importantes para os antigos quanto para os modernos processos biotecnológicos. São conhecidos como excelentes agentes produtores de antibióticos, alcoóis, enzimas, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos e vários outros compostos orgânicos (FERREIRA, et al., 2010).

3.1 MORFOLOGIA FÚNGICA

Segundo Trabulsi *et al.* (2006), os fungos podem desenvolver-se formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são, de maneira geral, pastosas ou cremosas, lisas e brilhantes caracterizando o grupo das leveduras. As colônias filamentosas, que caracterizam os bolores, podem ser algodinosas, aveludadas ou pulverulentas, com os mais variados tipos de pigmentação. Possuem hifas que podem ser contínuas (não-septadas ou cenocíticas) ou septadas.

3.2 TAXONOMIA FÚNGICA

A classificação dos fungos baseia-se primeiramente nos seguintes critérios:

- a) Características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais dos seus ciclos de vida;
- b) Natureza dos ciclos de vida;
- c) Características morfológicas do micélio vegetativo ou das células (PELCZAR, *et al.*, 1996).

Muitos fungos produzem esporos sexuais e corpos de frutificação somente sob certas condições ambientais. Os micologistas dividem o reino *Fungi* em três principais grupos: os fungos limosos, os fungos inferiores flagelados e os fungos terrestres. Os fungos de interesse nesse neste trabalho são os fungos terrestres filamentosos, este grupo inclui bolores, orelhas-de-pau, mofos, fungos em forma de taça, ferrugem, carvão e cogumelos (ROVEDA, 2007). Todos se caracterizam pela nutrição através da absorção e a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas (PELCZAR, *et al.*, 1996).

3.3 FUNGOS *ASPERGILLUS*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são encontrados em todo mundo. A primeira espécie de fungo *Aspergillus* foi identificada pela primeira vez em 1729, pelo biólogo italiano Pietro Micheli. Observando em microscópio, Micheli lembrou-se da forma de um aspergillum (regador de água), e nomeou a espécie de acordo com o objeto. Os fungos *Aspergillus* se reproduzem por esporos minúsculos que podem ser facilmente transportado pelo ar, são identificados em laboratórios principalmente pela sua estrutura (CRUZ, 2007).

As espécies desse gênero são aeróbicas, encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície onde vivem, contaminando restos de comidas (como pães e batatas), e crescem em muitas plantas e árvores. Algumas espécies desse gênero, como *A. Níger* e *A. oryzae*, são de grande interesse industrial por ser amplamente utilizados em processos fermentativos de certas regiões (PEREIRA, 2008).

4. FERMENTAÇÃO

Processos fermentativos são utilizados há muito tempo pela humanidade (OETTERER, 2011). Esses processos deram início à ciência denominada Biotecnologia, que envolve diversas áreas como a Química, Biologia, Genética, Engenharia, Bioquímica, entre outras. A tecnologia de microrganismo é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado (ROVEDA, 2007). Muitas empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tais como: antibióticos, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI, 2001).

Até meados da década de 1940, ao fim da II Guerra Mundial, acreditava-se que os processos industriais de fermentação não eram promissores, pois na época, os produtos que podiam ser produzidos via fermentativa, já eram produzidos em escala industrial por processos químicos convencionais, mais econômicos até então. Devido às necessidades impostas pela II Guerra Mundial como as infecções de mutilados e a falta de matéria prima, surgiram produções em larga escala de produtos obtidos exclusivamente por via fermentativa, como a penicilina, antibiótico produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Desde então, importantes desenvolvimentos tem acontecidos nessa área, os rendimentos e produtividades dos processos têm sido continuamente melhorados (CARVALHO, *et al.*, 2005).

O processo fermentativo industrial consiste em várias etapas, que são divididas em: operações de upstream (pré-tratamento) e operação de downstream (obtenção do produto). Os processos submersos consistem naqueles em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (microrganismo aeróbicos) e outros controladores tais como, medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, consumo de nutrientes entre outros (ROVEDA, 2007).

O processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico e da matéria prima adequada, segue com a transformação da matéria prima no produto desejado, observando as condições que podem exigir o controle do processo como esterilização, aeração e temperatura. Finaliza com a separação e purificação do produto final (ROVEDA, 2007).

Entre os fungos que podem ser utilizados na fermentação do arroz para produção de ácido kójico os mais promissores são os fungos do gênero *Aspergillus*. A duas importantes razões que justificam o uso comercial destes fungos em grande escala, é a grande variedade de produtos que estas espécies são capazes de produzir através de vários tipos de substratos e o fato que algumas espécies do gênero *Aspergillus* serem consideradas microrganismos reconhecidos como de uso seguro, Generally Recognized as Safe (GRAS) (RODRIGUES, *et al.*, 2010).

Estudos relatam a produção de ácido kójico com outras fontes de substratos e utilizando varias espécies de fungos. Segundo El-Aasar (2006), produzindo ácido kójico com *A. oryzae* utilizando como substrato a glicose rendeu-lhe 0,26 g de ácido kójico / g de glicose. Já a produção de ácido kójico com *A. parasiticus* e *A. candidus*, respectivamente, nestes dois casos, o rendimento foi de 0,089 g e 0,3 g de ácido kójico / g de glicose. Por outro lado, um rendimento muito elevado (isto é, 0,453 g kójico ácido / g de glicose) foi também obtido na fermentação com *A. flavus* (ROSFARIZAN, *et al.*, 2007). Nesse processo pode ocorrer a produção de aflatoxinas. No entanto, Rosfarizan, *et al.*, (2007) informou que a produção de aflatoxinas na produção de ácido kójico pode ser inibida por formulações e condições de cultivo adequado, já que a produção de ácido Kójico e a síntese de aflatoxinas segue caminhos diferentes e, portanto, ácido kójico não é um intermediário para a síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.

O aumento do rendimento pode ser melhorado através de mutação genética e técnicas de recombinação. A melhoria da produção de ácido kójico através da *A. oryzae* foi alcançada através de mutações, produzindo cinco vezes mais que seus ancestrais (FUTARAMA, *et al.*, 2001).

Não foram encontrados estudos que relatam o rendimento da produção de ácido kójico utilizando o arroz como substrato.

4.1 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DO ARROZ

Cultivado e consumido em todo o mundo, o arroz se destaca pela produção e área de cultivo desempenhando um importante papel no aspecto econômico quanto social. Aproximadamente 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo cerca de 590 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2010).

É um dos cereais mais importantes em termos de valor econômico, considerado o cultivo alimentar de maior importância no mundo, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida do mundo, alimento básico para aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas (EMBRAPA, 2005).

A fermentação do arroz teve início no Japão com a produção de saquê. Relatos indicam que o arroz começou a ser cultivado por volta do século V a.C. A primeira produção de saquê que se tem notícia data do século III, na qual o cultivo do arroz fez aparecer mofo e leveduras, mas foi a instalação de uma destilaria no palácio imperial de Nara, na época capital do Japão, o principal marco da fermentação do arroz. Após o século VIII, o saquê começou a ser fermentado utilizando esporos, o koji, uma espécie de arroz cozido que tem moldes de esporos cultivados em seu interior (FERREIRA; SARAIVA, 200).

4.1.1 Técnicas de fermentação e insumos importantes

4.1.1.1 Cultivo em meio líquido

O cultivo em meio líquido é amplamente utilizado para alto desempenho da produção de ácido kójico (KITADA et al., 1997). O crescimento de microrganismos

aeróbios submersos em uma cultura é controlado pela disponibilidade de substratos energéticos e enzimas. As culturas são sempre de uma natureza heterogênea, em que as taxas de reações podem ser limitadas pela taxa de substrato ou pela transferência do produto em uma determinada interface. Diferentes técnicas de fermentação, como lote, batelada alimentada e contínua, são possíveis de serem aplicados em fermentação submersa, a fim de alcançar um processo ideal de fermentação. (KITADA et al., 1997.; ARIFF et al., 1996).

Várias técnicas de fermentação, como processos submersos, estado sólido e culturas de superfície, e os modos de fermentação e operação, como lote, batelada e contínua, tem sido desenvolvidos e utilizados para a melhoria dos diversos processos de fermentação. No entanto, poucas tentativas foram feitas para produzir ácido kójico usando fermentação em estado sólido. Por exemplo, Kharchenko (1999) relatou que comparativamente a fermentação submersa o rendimento de ácido kójico na fermentação em estado sólido é muito inferior. A maioria dos relatórios sobre produção de ácido kójico disponíveis na literatura está relacionada à fermentação submersa. A viabilidade do uso diferentes tipos de técnicas de fermentação submersa e modos de operação do fermentador na melhoria da fermentação do ácido kójico são descritas e discutidas a seguir.

4.1.1.2 Fontes de carboidratos

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada como fonte de carboidratos para a fermentação, no entanto dependendo da espécie de fungos ou leveduras, seu rendimento pode ser maior ou menor, havendo uma variação em comparação com a fonte de alimento utilizada (WICKRHAM; BURTON, 1984). Esses substratos incluem amido, sacarose, maltose, glicose, frutose, manose, galactose, xilose, arabinose, sorbitol, acetato, etanol, glicerol entre outras. As fontes mais utilizadas para fermentação com *Aspergillus* são o amido, sacarose, frutose, glicose e xilose.

4.1.1.3 Fontes de nitrogênio

A variação nas fontes de nitrogênio para a fermentação do arroz depende da espécie das cepas, (KITADA, *et al.*, (1967) relataram que fontes orgânicas de nitrogênio são geralmente melhores que fontes inorgânicas para a fermentação. Complexos orgânicos de nitrogênio, tais como levedura e extrato de peptona podem conter vitaminas, que agem como um precursor para produção de ácido kójico. Além disso, algumas fontes orgânicas de nitrogênio tem um bom sistema de tamponamento, já que o pH pode influenciar a síntese de ácido kójico durante fermentação e inibir o seu rendimento. O extrato de levedura tem a fonte de nitrogênio orgânico mais favorável para a produção de ácido kójico (EL-AASAR, 2006). Durante a fermentação a limitação de nitrogênio é necessária para limitar o crescimento e multiplicação do fungo, para que mais amido possa ser convertido em ácido kójico.

4.1.1.4 Fontes de Fosfato

O fosfato é um importante nutriente para o crescimento da maioria dos fungos. É incorporado em moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidios e açúcares desempenhando um papel essencial no metabolismo energético. A concentração de fosfato no caldo de cultura dá uma significativa influência na produção de ácido kójico por *Aspergillus* (ARNSTEIN; BENTLEY, 1953). Estudos anteriores revelaram que a alta concentração de fosfato no caldo de cultura resultou em uma produção rápida de ácido kójico.

4.1.1.5 Inibidores e estimulantes

Alguns componentes em um meio de fermentação ajudam regular a produção de produtos em vez de apoiar o crescimento de microrganismos. Esses aditivos incluem

inibidores e estimuladores, os quais podem ser utilizados para manipular o andamento da fermentação. Estudos anteriores mostraram que o rendimento da produção de ácido kójico podem ser alterados utilizando inibidores metabólicos e estimulantes, tais como fluoreto de sódio, ácido monoiodoacético, arseniato de sódio, malonato, cianeto de potássio, sódio azida dinitrofenol e pentaclorofenol e (KITADA, *et al.*, 1971).

4.1.1.6 Controle de pH

O pH ideal para produção de ácido Kójico varia dependendo da cultura utilizada, e das fontes de substrato, para fermentação com fungo *Aspergillus*, estudos relatam que o melhor pH está entre 4,0 a 4,5 (KITADA *et al.*, 1971).

4.1.1.7 Aeração e agitação

A fermentação para produção de ácido kójico em escalas piloto e industrial é geralmente realizada utilizando agitadores fermentadores, tanques que garantem a transferência eficiente de oxigênio para a cultura. Alguns estudos sobre os efeitos da aeração e agitação na produção de ácido foram realizados por (KITADA *et al.*, 1971).

5. O TEMA MICRORGANISMO E FERMENTAÇÃO COMO FERRAMENTA INTERDISCIPLINAR NO ENSINO MÉDIO

O tema interdisciplinaridade vem sendo amplamente debatido nos meios acadêmicos, especialmente no âmbito educacional (SILVA; RODRIGUES, 2009).

A apresentação dos conteúdos relacionados às Ciências Naturais durante o Ensino Médio ocorre de maneira fragmentada, provocando o fracionamento do conhecimento em disciplinas isoladas. Nesse contexto, a discussão de temas complexos, como as questões ambientais e os problemas de saúde, fica prejudicada devido à necessidade de combinar conhecimentos de diferentes disciplinas (CORREIA, *et al.*, 2003).

A adoção de uma abordagem interdisciplinar pode ser considerada uma maneira de superar a fragmentação do conhecimento. Além de evitar uma visão reducionista, as interações interdisciplinares permitem utilizar assuntos mais interessantes para contextualizar as aulas, favorecem a integração de conteúdos e expõem os alunos à complexidade do processo de geração do conhecimento. A combinação dessas vantagens pode tornar mais significativa a aprendizagem dos conceitos científicos (CORREIA, *et al.*, 2003).

Os conteúdos discutidos nas aulas de Química permitem uma grande quantidade de interações com outras disciplinas do Ensino Médio. Algumas discussões interdisciplinares podem ser promovidas a partir de temas de grande relevância, como os microrganismos e processos fermentativos.

A bioquímica é um nicho interdisciplinar explícito que pode ser estabelecido entre a biologia e a química. No entanto, as discussões bioquímicas ocorrem superficialmente no Ensino Médio.

A utilização de microrganismos e processos fermentativos pode ser uma boa forma de estabelecer discussões bioquímicas no Ensino Médio. O uso de temas interdisciplinares, mesmo sendo uma ferramenta valiosa para o ensino aprendizagem poderia ser mais aproveitado. A utilização de temas que promovem a

interação de matérias no mesmo conteúdo junto com a aula prática é essencial para que o aluno possa ter um conhecimento mais abrangente, e assim facilitando sua compreensão.

5.1 ATIVIDADES

A apresentação das atividades relacionadas a microrganismos e fermentação pode ser aplicada em três momentos diferentes:

- 1- Leitura e discussão de texto
- 2- Realização de experimento
- 3- Avaliação através de questionários

5.1.1 Leitura e discussão de texto

A introdução de subsídios teóricos sobre microrganismo e fermentação pode ser feito por meio de texto e discussão. Os conceitos químicos e biológicos necessários à compreensão dos experimentos devem ser abordados no texto, desta maneira os conhecimentos interdisciplinares podem ser progressivamente integrados aos alunos.

5.1.2 Realização de experimentos

Os conhecimentos teóricos transmitidos em sala de aula e disponíveis em livros, internet ou até mesmo em conversas informais é de fácil acesso aos alunos, porém, a prática do conteúdo apresentado em sala de aula irá favorecer por completo a compreensão do assunto abordado. Na parte experimental um roteiro contendo a descrição das atividades programadas e as informações necessárias devem ser previamente distribuídas aos alunos.

Utilizando fermento biológico o professor terá a oportunidade de transmitir aos alunos alguns conteúdos bioquímicos, como a interferência da temperatura na velocidade de reação.

5.1.2.1 Materiais

- Fermento biológico seco;
- Béquer de 500 mL;
- Açúcar;
- Água;
- Saquinhos de plástico;

5.1.2.2 Procedimentos

Dissolva o fermento biológico no béquer com água.

Marque em dois saquinhos plástico, temperatura ambiente e geladeira.

Coloque a mesma quantidade da solução de fermento biológico em cada saquinho.

Adicione 1 colher de açúcar em cada saquinho e amarre na mesma altura, mexa bem para dissolver todo o açúcar na solução de fermento.

Coloque um deles no balcão e o outro leve à geladeira. Anote o que está acontecendo a cada 10 minutos.

Depois de algum tempo os alunos irão perceber que um saquinho está bem cheio de ar e o outro, continua quase igual ao início da experiência. Mostrando que a temperatura afeta a velocidade de crescimento do fermento.

5.1.3 Avaliação através de questionários

A avaliação através de questionário devera ser realizada antes e depois das atividades, para melhor visualização da absorção dos conhecimentos pelos alunos.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Balança semi-analítica (Gehaka, BK 3000);
- Microdestilador (Tecnalise, TE 012);
- Agitador mecânico (Tecnal, TE 048);
- Banho Maria (Quimis);
- Microscópio (Olympus, CBA);
- Incubadora B.O.D (Marte, MB-155/3);
- Estufa de secagem (Fanem, 311);
- pHmetro (Gehaka, PG 2000);
- Mixer (FISATOM, 715);
- Espectrofotômetro de varredura eletrônica (CIRRUS, 60SA);
- Papel de filtro qualitativo;
- Vidrarias em geral;
- Carvão ativado;
- Ácido clorídrico P.A.;
- Cloreto de ferro III;
- Alfa-amilase;
- Agar (PCA) Plate Count Agar;

6.2 PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1 Isolamento do fungo

Todos os reagentes utilizados para o preparo de soluções foram de grau analítico PA, excetuando-se o padrão de ácido kójico 99,8% que foi de grau farmacêutico.

Os fungos utilizados nesse trabalho foram isolados e identificados através da realização de microcultivos. Seguindo os seguintes passos:

- a) Aproximadamente 300 g de arroz cozido foram mantidos durante 144 horas a 28-30°C em ambiente natural para a proliferação dos fungos. Essa temperatura favorece o crescimento dos fungos desejados no trabalho;
- b) Foram retiradas pequenas porções de colônias e semeadas em placas de Petri contendo meio Agar PCA;
- c) As placas foram identificadas e colocadas na incubadora a 28°C, onde se observou diariamente o crescimento da cultura;
- d) Após 96 horas as placas foram retiradas e através de análises taxonômicas macroscópicas e microscópicas realizou-se a seleção dos fungos *Aspergillus*.

A principal característica taxonômica para identificação dos fungos *aspergillus* é a formação de conídios agrupados em forma de cabeça ao redor de uma vesícula. A (figura 4) mostra o fungo *aspergillus* após a incubação em placa de petri.



Figura 4: Fungo *Aspergillus*

6.2.2 Processo fermentativo

50 mL da solução contendo o fungo retirados através de raspagem das placas de Petri, foi adicionado a 100 gr de arroz cozido e submetidos a fermentação aeróbica submersa em batelada durante 10 dias a 28°C

6.2.3 Clarificação

Após o término da fermentação, o fermentado passou por um processo de clarificação, peneirou-se a biomassa em peneira de orifício de 5mm para separação dos componentes sólidos.

Em seguida a solução foi centrifugada durante 30 minutos para acelerar a sedimentação da parte mais densa. Separou-se o sobrenadante e adicionou-se 3 mL de alfa-amilase para facilitar a clarificação da substancia. Após 72 horas a substancia foi filtrada em papel quantitativo para diminuir a turbidez.

6.2.4 Determinação qualitativa de ácido kójico

Após o processo de clarificação foi retirada uma alíquota da substância e adicionado cloreto de ferro III. Segundo Ronald (1957) o ácido kójico complexa com íons de ferro III, passando de uma cor amarelada para vermelho intenso.



O complexo formado pelo ácido kójico e o íon férrico absorve fortemente na região do visível. Utilizando o espectrofotômetro de varredura, observou-se um máximo de absorção em 505 nm.

6.2.5 Deteminação da concentração de ácido kójico

6.2.5.1 Reagentes

Solução padrão de ácido kójico

Pesou-se 0,1 g. de cristais de ácido kójico avolumados a 100 mL de água destilada. Para solução estoque transferiu-se 10 mL desta solução para um balão de 100 mL e completou-se com água destilada.

Solução de cloreto de ferro III

Pesou-se 1,0 g. de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e dissolveu-se em 100 mL de ácido clorídrico 1 M.

6.2.5.2 Procedimento para construção da curva de calibração.

Transferiu-se alíquotas de 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL e 11 mL da solução estoque para balões de 25 mL e tratados com 10mL da solução de cloreto de ferro III em seguida completados com água destilada. Resultando respectivamente em padrões de concentrações iguais a 0,008g/L, 0,016g/L, 0,024g/L, 0,032g/L e 0,044g/L . O branco

foi preparado com 10 mL da solução de cloreto de ferro III e avolumados em balão de 25 mL com água destilada.

A cor se desenvolve imediatamente. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 505 nm utilizando espectrofotômetro de varredura eletrônica Femto.

7. RESULTADOS

Após os dez dias de fermentação aeróbica a 28 °C, resultou-se em 872,62 gramas em 860,00 mL de fermentado (figura 5).



Figura 5: Fermentação aeróbica.

Após o término da fermentação foi necessário passar o fermentado em peneira para retirar as partes sólidas resultando em uma perda de 68,35 gramas (figura 6).



Figura 6: Parte líquida do fermentado

Devido a turvação do fermentado foi necessário realizar um processo de clarificação, resultando numa solução límpida onde a turbidez não interfira nas análises quantitativas (figura 7).



Figura 7: Fermentado clarificado

Através da mudança de cor da solução de cloreto de ferro III, confirmou-se qualitativamente a presença de ácido kójico na solução (figura 8).



Figura 8: Identificação de ácido kójico através da complexação com cloreto de ferro III.

Confirmado a presença de ácido kójico no fermentado, realizou-se a curva de calibração em espectrofotômetro de varredura eletrônica com padrões de ácido kójico (figura 9), para determinar a concentração total de ácido kójico produzido.



Figura 9: Padrões de ácido kójico

Os resultados obtidos através do espectrofotômetro estão representados na tabela 3 abaixo.

Ácido Kójico (g/L)	Absorbância (505nm)
0.008	0.058
0.016	0.116
0.024	0.174
0.032	0.227
0.044	0.300

Tabela 3: Resultados das concentrações de ácido kójico

Os valores apresentados na tabela 3 mostram excelente linearidade, com coeficiente de correlação de 0,99908. Mostrando ser um eficiente método para determinação do ácido kójico no fermentado. A demonstração visual desses resultados é apresentada na figura 8.

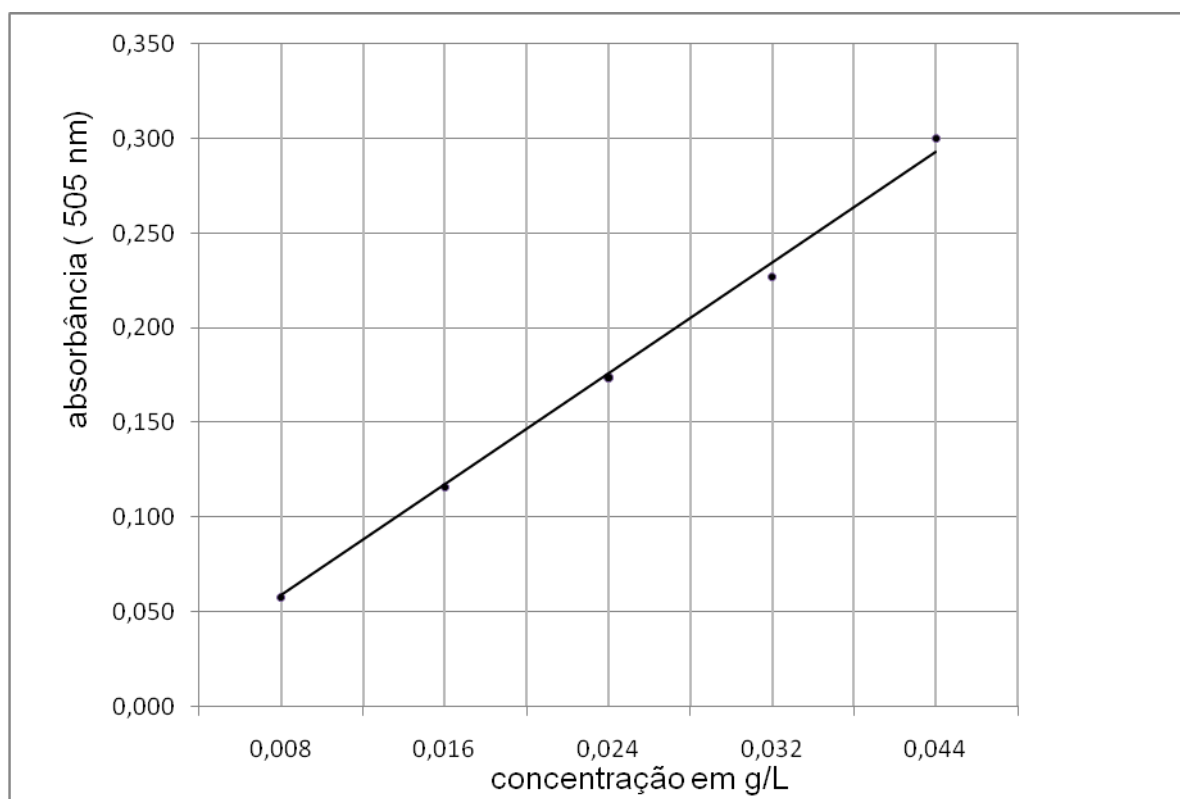


Figura 10: Curva de calibração do ácido kójico

Para determinação da concentração total de ácido kójico produzido, foi retirada 10 mL da solução fermentada e transferida para um balão de 100 mL completado com água destilada, retirou-se 1 mL dessa solução e transferido-se para um balão de 25 mL, adicionando-se 10 mL da solução de cloreto de ferro III e completado o volume com água destilada. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 505 nm resultando em uma absorbância de 0,234. Através da curva de calibração foi possível determinar a concentração de ácido kójico no balão de 25 mL, resultando em 32,5 mg/L.

O valor obtido através da leitura do espectrofotômetro deve ser multiplicado para chegar o valor total de ácido kójico em 860,00 mL de fermentado. Tomando como base de cálculo: $C_1V_1 = C_2V_2$, podemos encontrar o valor na alíquota de 1mL, onde C_1 será o valor encontrado na curva de calibração, V_1 o volume do balão, C_2 a incógnita e V_2 o volume da alíquota 1,0 mL.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$32,5 \cdot 25 = C_2 \cdot 1$$

$C_2 = 812,5$ mg/L na amostra diluída em 1:10 no balão de 100 mL.

Repetindo-se a mesma base de cálculo: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, onde C_1 será a incógnita, V_1 a quantidade pipetada da amostra 10 mL, C_2 a concentração na amostra diluída 1:10 igual a 812,5 mg/L, V_2 o volume do balão 100 mL.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$C_1 \cdot 10 = 812,5 \cdot 100$$

$$C_1 = 8125,0 \text{ mg/L ou } 8,125 \text{ g/L}$$

A concentração da amostra resultou em 8,125 g/L, para obter a concentração em 860 mL, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$X \cdot 1 = 8,125 \cdot 0,860$$

$$X = 6,987 \text{ g de ácido kójico}$$

Os resultados mostram que a fermentação rendeu aproximadamente 7,0 g de ácido kójico por 100,0 g de arroz, vendo que a produção de ácido kójico a partir de glicose é cerca de 26,0 g de ácido kójico por 100,0 g de glicose (EL-AASAR, 2006). Sendo que o arroz apresenta cerca de 70 % de amido em sua composição, seu uso na fermentação em grande escala para a produção de ácido kójico pode ser satisfatório.

Após obter os resultados analíticos, o ácido kójico foi cristalizado através do processo de evaporação em estufa a 100 °C, onde resultou em 6,126 g de ácido kójico impuro (figura 11).



Figura 11: Ácido kójico cristalizado

A massa de ácido kójico resultante foi menor que a calculada, pois não partiu do volume total inicial de 860 mL de fermentado.

8. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos e discutidos neste trabalho é possível concluir que:

É possível a produção de ácido kójico através da fermentação do arroz cozido utilizando fungos *aspergillus* selvagem.

Variações nas características físico-químicas das amostras, notadamente temperatura, tem influência direta sobre a capacidade preditiva do desenvolvimento do trabalho.

O método de quantificação de ácido kójico através da complexação com Fe(III) apresentou-se adequado para a determinação de ácido kójico no fermentado. A curva de calibração apresentou excelente linearidade.

A concentração produzida de ácido kójico utilizando como substrato o arroz cozido foi satisfatória, podendo ser uma alternativa de aumentar o valor econômico do arroz refogado.

9. REFERÊNCIAS

AYTEMIR, Mutlu Dilsiz; SEPTIOGLU, Ebubekir; ÇAHS, Ünsal. Synthesis and Anticonvulsant Activity of New Kojic Acid Derivatives. *Arzne. EVC – Edition Cantor Verlag*, v. 60, 2010, p. 22-29.

BAREL, André O.; PAYE, Marc; MAIBACH, Howard I.; **Cosmetic Science and Technology**, Ed. 3^a, New York, Editora: Informa Healthcare USA, Inc. 2009.

BENJAMIN, Wilson J.; In: American Society for Microbiology, 2, 1966. Nashville, Estados Unidos da América. *Bacteriological Reviews*. Nashville: Departamento de Bioquímica da Universidade Vanderbilt, 1966.

BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugenio. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1. Ed. São Paulo; Editora Edgard Blücher, 2001.

BRTKO, J.; RONDAHL, L.; FICKOVÁ, M.; HUDECOVÁ, D.; EYBL, V.; UHER, M. *Centure Europe Journal Publication Health*, Bratislava, dez, 2004. Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Engenharia Química de Alimentos, p. S16-S18.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; Evaluation of Health Aspects of Kojic acid in Food. **Regul Toxicol Pharmacol**, 33, feb, 2001, p. 80-101.

CALTEX MOLD. Manufacturer of Ecologically Responsible Products Since 1986, Aspergillus. © Copyright 2007 Caltex International. Disponível em: <<http://www.caltexmoldservices.com/aspergillus.mht>>. Acesso em: 01 set. 2011.

CARVALHO, Walter; SILVA, Débora D. V.; CANILHA, Larissa; MANCILHA, Ismael M.; Aditivos Alimentares Produzidos por Via Fermentativa, Parte 1: Ácidos Orgânicos. **Revista analytica**, n. 18, Agosto/setembro, 2005, p. 70-76.

CASSANTI, Ana Cláudia; CASSANTI, Ana Clara; ARAUJO, Eliana Ermel de; URSI, Suzana. **Microbiologia Democrática: Estratégias de Ensino-Aprendizagem e Formação de Professores**. Colégio Dante Alighieri, São Paulo, 2010. 27p.

CASTRO, Jorge Ricardo Moreira. **Estudo Sobre a Determinação de Benzeno e Amônia no Ar, Utilizando Sensor Piezelétrico de Quartzo**. 2005. 101p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAMBERS, C; DEGEN, G; JAZWIEC-KANYION, B; KAPOULAS, V; MARTY, J. P; PLATZEK, T; RASTOGI S. C; REVUZ, J; ROGIERS, V; SANNER, T. ENGELEN, Van J; WHITE, I. R. Opinion on Kojic Acid. In: **Scientific Committee on Consumer Products**, 17° plenary, 30, set, 2008.

COELHO, Renato Sano. **Produção de ácido kójico e Otimização de processo e Utilização de Matérias-Primas de Baixo Custo**. Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, ago. 2011.

CORREIA, Paulo R. M.; DAZZANI, Melissa; MARONDES, Maria Eunice R.; TORRES, Bayardo B. A Bioquímica Como Ferramenta Interdisciplinar. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**. n° 19, maio, 2004.

CORRER, C. Januário; CORDEIRO, Gilcélia; GASPARETTO, João; PERALTA-ZAMORA, Patrício; PONTAROLO, Roberto. **Determinação de Ácido Kójico em produtos Farmacêuticos por Espectroscopia UV-VIS e Processo de Calibração Multivariada**, Acta Farmacêutica Bonaerense, vol. 24, n° 3, 2005. p. 416-420.

CRUZ, Paulo Rodrigues Itami da. **PHS: Doenças Veiculadas por Alimentos. Bactéria: *Aspergillus Parasiticus***. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza. Santos, São Paulo, n.30, 2007.

DANTAS, Eliane; GONÇALVES, Lucas Reyes. O arroz na gastronomia japonesa, **A Influência da gastronomia Nipo-Brasileira na Cidade de São Paulo**, Coletânea de artigos dos alunos de gastronomia da Universidade Paulista, 2007, p. 24-27.

EL-AASAR. Cultural Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY, Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, Egypt. V. 8, n. 4, 2006. p. 468 – 473.

EMAMI, Saeed; HOSSEINIMEHR, Seyed Jalal, TAGHDISI, Seyed Mohammad; AKHLAGHPOOR, Shahram. **Kojic Acid and its Manganese and Zinc Complexes as Potential Radioprotective Agents**. Department of Medical Science, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. Set, 2006.

FERREIRA, Nelson R.; SARQUIS, Maria Inez M.; ALVES, Cláudio N.; SANTOS, Alberdan S. In: ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 3, 2010, Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.3, abril, 2010. p. 569-576.

FERREIRA, Solange G.; SARAIVA, Stella S. Saquê – **A Bebida dos Deuses: A Influência da gastronomia Nipo-Brasileira na Cidade de São Paulo**, Coletânea de artigos dos alunos de gastronomia da Universidade Paulista, 2007, p. 50-55.

GANDOLPHO, Cibele. **Brasil é o Terceiro no Mundo no Consumo de Cosméticos**. Diário de São Paulo. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

HESELTINE, L. Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 79. Lyon. International Agency for Research on Cancer, 2001. HOWARD I. Maibach. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**, 3. Ed. Nova York: Editora Informa Healthcare USA, 2009.

LINS, Clarissa; SAAVEDRA, Rafael. **Sustentabilidade Corporativa no Setor Sucroalcooleiro Brasileiro**. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável, agosto, 2007.

MACRINI, Daclé Juliani. Avaliação de Extratos de Plantas da Região Amazônica quanto à Atividade Inibitória da Tirosinase. 2007, pag. 122, DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - Área de Produção e Controle Farmacêuticos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MALLUTA, Juliana; ZEMF, Fabiane. **Influência da Microencapsulação dos Ativos Despigmentantes Ácido Kójico e Hidroquinona**. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Departamento de Farmácia 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 1ª edição, Brasília, 2004.

NOH, Jin-Mi; KWAK, Seon-Yeong; KIM, Do-Hyun; LEE, Yoon-Sik. Kojic Acid - Tripeptide Amide as a New Tyrosinase Inhibitor. In: WILEY INTERSCIENCE, n. 2, 2007. Seoul, Republic of Korea. **Resumos**. Seoul: Seoul National University. 2007. Res. 88 p. 151-744.

OETTERER, Marília. O processo de Fermentação do Pescado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Universidade de São Paulo, 2010, 43p.

OMAR, Edgar Mendoza-Llerenas; JAVIER, David Pérez-Gómez; SILVA, Valdez Guilherme. Obtención de Ácido Kójico por Fermentación Fed-Batch con *Aspergillus flavus-oryzae*, In: **XVII CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA, VI CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA E VIII JIRNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**. Colima, México. Mar, 2010.

OSIEWACZ, H. D. **The Mycota: Industrial Application**, 1ª edição. New York: editora Springer, 2001.

PELCZAR, Michael J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R. **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**, 2ª edição. Editora: Makron Books, 1997.

PEREIRA, Jr. Nei; BON, Elba Pinto da Silva; FERRARA, Maria Antonieta. **Tecnologia de Bioprocessos**. Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008, 436p.

PIANTAVINI, M. Sérgio. **Desenvolvimento e Validação de um Método Espectrofotométrico Para a Quantificação de Ácido Kójico por Complexação com Alumínio e Caracterização do Complexo**. 2010. 149 p. Dissertação (Mestrado) – Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná, Paraná. Curitiba, 2010.

RODRIGUES, Ana Beatriz Carrijo; ALMEIDA, Carlos Alberto Vieira de; ROCHA, Christiane Pereira; FILHO, Ubirajara Coutinho; CARDOSO, Vicelma Luiz. In: IX ENCONTRO INTERNO & XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010, Uberlândia, Brasil. **Fermentação de Resíduos de Arroz e Maracujá na Produção de Invertase e Amilase por *Aspergillus Niger***. Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Uberlândia.

ROSFARIZAN, Mohamad. MOHD, Shamzi M. NURASHIKIN, Suhaili. MADIIHAH, M. Sale. ARBAKARIYA, B. Tariff. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, Abril, 2010, p. 24-37.

ROVEDA, Mirela. **Produção de Lípases por Microrganismo Isolados de Efluentes de Laticínios Através de Fermentação Submersa**. 2007, 86 p. Dissertação (Mestrado) – Área de Concentração: Infra-Estrutura e Meio Ambiente. Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Passo Fundo, 2007.

SANTOS, F. R.; DEUS, R. J.; HENRIQUES, D. G.; SANTOS, A. S. Investigação do Uso do Amido de Mandioca Como Fonte de Estrutura Piranosídica no Processo Biotecnológico de Produção do Ácido Kójico. In: QUÍMICA E RECURSOS HIDRÍCOS, 16, 2006. Salvador, Brasil. Resumos. Salvador: ABQ, 2006.

SILVA, Orisvaldo Santana da; RODRIGUES, Maria Aparecida. **A interdisciplinaridade na Visão de Professores de Química do Ensino Médio: Concepções e Práticas**, VII Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências. Colégio Estadual Olavo Bilac; Universidade Estadual de Maringá, Florianópolis, 2009.

SILVEIRA, Cristina Moreira da; OLIVEIRA, Melissa dos Santos; BADIALE-FURLONG, Eliana. Conteúdo Lipídico e Perfil em Ácidos Graxos de Farelos Submetidos à Fermentação por *Aspergillus oryzae* em Estado Sólido. **B. CEPPA**, v. 28, n. 1, jun., 2010, p. 133-140.

TRABULSI, Luiz Rachid; CANDEIAS, Jose Alberto Neves; GOMPERTZ, Olga Fischman. **Microbiologia**, 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

WALTER, Melissa; MARCHEZAN, Enio; AVILA, Luis Antonio de. **Arroz: Composição e Características Nutricionais**. Ciência Rural, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. V. 38, n.4, p.1184-1192, jul, 2008.

WICKERHAM, Lynferd J.; BURTON, Kermit A. Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeasts. In: **Northern Regional Research Laboratory**, v. 56, junho 1984.