

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO  
A PARTIR DA CASCA DE ARROZ**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Sheila Montipó**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

# **PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ**

**Sheila Montipó**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Materiais, Aproveitamento e Transformação de Resíduos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos.**

**Orientador: Prof. Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO  
A PARTIR DA CASCA DE ARROZ**

elaborada por  
**Sheila Montipó**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia de Processos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Ayrton Figueiredo Martins, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Marcio Antônio Mazutti, Dr. (UFSM)**

---

**Marli Camassola, Dra. (UCS)**

Santa Maria, 16 de Novembro de 2012.

Dedico esta dissertação à minha mãe Silvana,  
ao meu irmão Pablo e à minha tia Simone,  
que sempre estiveram ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ayrton Figueiredo Martins pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade em integrar-me ao LATER.

Aos componentes da banca examinadora Marcio Antônio Mazutti, Marli Camassola e Djalma Dias da Silveira pela disponibilidade em participar deste importante processo para mim.

Ao Prof. Osmar Damian Prestes, da UNIPAMPA, por facilitar as análises via HPLC-RID.

Ao Prof. Érico Marlon de Moraes Flores, ao Prof. Edson Irineu Müller e ao analista Ubiratan Flores da Silva, do LAQIA, pelas análises via LC-MS/TOF.

Ao funcionário eletrotécnico, Seu Paulino, pela contribuição essencial na confecção da *glovebox*.

Aos meus colegas e grandes amigos do LATER pelo auxílio, incentivo e amizade. Em especial, ao grupo da biomassa, Daiane B. Bevilaqua e Giovanni B. Pedroso, pela colaboração, conselhos e suporte no decorrer deste trabalho. À Carla G. B. Brenner, por contribuir significativamente nas questões envolvendo química analítica, bem como à Daiane Skupin e à Francieli M. Mayer.

Aos meus estimados familiares – minha mãe Silvana, meu irmão Pablo, minha tia Simone e meus avós Zulmira e Luis – que estão constantemente presentes em minha vida.

Ao meu querido amigo Cristian F. Dreyer e à minha ex-colega de graduação e sempre amiga Ana Paula M. Varela.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiador deste projeto.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e,  
ao mesmo tempo, participar da responsabilidade  
coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos  
Universidade Federal de Santa Maria

### PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ

AUTORA: SHEILA MONTIPÓ  
ORIENTADOR: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS  
Santa Maria, 16 de Novembro de 2012.

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz (CA), são fontes renováveis, abundantes e de baixo custo, disponíveis para a biotransformação em produtos com valor agregado. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o aproveitamento da CA com vistas à sua biotransformação em ácido láctico (ALac), partindo-se de hidrolisados desta biomassa residual. Ao mesmo tempo, objetivou-se contribuir para a mitigação do crescente problema ambiental decorrente da disposição irregular deste resíduo no estado do Rio Grande do Sul, maior produtor brasileiro. Para tanto, o delineamento composto central rotacional (DCCR) do planejamento experimental da hidrólise ácida da CA em sistema de conversão à pressão, com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluídos, revelou que, experimentos conduzidos a 175 °C, por 46 min, com concentração de 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, produziram os teores máximos de glicose. Para hidrólises envolvendo HCl, teor de 17,8 g de glicose L<sup>-1</sup>, com rendimento de 106,6 mg de glicose g<sup>-1</sup> CA; para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, teor de 14,1 g de glicose L<sup>-1</sup>, com rendimento de 84,5 mg de glicose g<sup>-1</sup> CA. Ensaio fermentativos prévios foram feitos com o intuito de selecionar micro-organismos resilientes e eficientes para a produção de ALac e, também, para avaliar a necessidade de suplementação do hidrolisado da CA com nutrientes específicos. *L. rhamnosus*, neste trabalho, foi a bactéria mais apropriada à fermentação láctica, dentre os *Lactobacillus* testados, sendo capaz de produzir 5,6 g ALac L<sup>-1</sup>, com rendimento de 33,8 mg ALac g<sup>-1</sup> CA (hidrolisado com HCl, sem adição de nutrientes, 96 h de fermentação). A hidrólise ácida, neste caso específico, foi feita a 160 °C, por 70 min, com 4,0% HCl v v<sup>-1</sup>, gerando 14,7 g L<sup>-1</sup> de glicose. A fermentação láctica via DCCR foi conduzida em vials de 4 mL, em batelada, a 37 °C, pH 6,0, empregando-se *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863, cepa especializada em catabolização de hexoses e pentoses (exceto arabinose). Experimentos com hidrolisados da CA adicionados de nutrientes produziram até 18,8 g ALac L<sup>-1</sup> (rendimento máximo de 997,1 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcares) em substrato hidrolisado com HCl, após 52 h de fermentação; e 14,6 g ALac L<sup>-1</sup> (rendimento máximo de 999,8 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcares) em substrato hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, após 24 h de fermentação. Portanto, neste trabalho, as escolhas de maior influência na produção de ALac foram a fermentação com hidrolisado sulfúrico e emprego de *L. rhamnosus*.

**Palavras-chave:** Biorrefinaria. Casca de arroz. Hidrólise ácida. *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863. Ácido láctico. Otimização de processos. Cromatografia.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduation Program in Process Engineering  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### LACTIC ACID PRODUCTION FROM RICE HUSK

AUTHOR: SHEILA MONTIPÓ  
SUPERVISOR: AYRTON FIGUEIREDO MARTINS  
Santa Maria, November 16<sup>th</sup>, 2012.

Lignocellulosic agroindustrial wastes, such as rice husks (RH), are abundant, low cost, renewable sources, available to biotransformation in value-added products. Thus, the main objective of this study was to investigate the use of RH with the purpose of its biotransformation in lactic acid (LacA) starting from hydrolysates of this residual biomass. At the same time, aiming to contribute to the mitigation of the growing environmental concern about the illegal disposal of this waste in the State of Rio Grande do Sul – the biggest Brazilian rice producer. For this, a central composite rotational design (CCRD) of the hydrolysis experiments of RH in pressurized conversion system with diluted HCl and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, revealed that experiments conducted at 175 °C, for 46 min, with acid concentrations of 2.2% v v<sup>-1</sup>, generate the highest glucose contents. For hydrolysis involving HCl, 17.8 g glucose L<sup>-1</sup>, with an yield of 106.6 mg glucose g<sup>-1</sup> RH; for hydrolysis with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.1 g glucose L<sup>-1</sup>, with an yield of 84.5 mg glucose g<sup>-1</sup> RH. Previous fermentative experiments were carried out with the aim to select resilient and efficient micro-organisms for the LacA production and, also, to evaluate the need of supplementation of the RH hydrolyzate with specific nutrients. *L. rhamnosus*, in this study, was the most suitable bacteria for the lactic fermentation, among all the *Lactobacillus* tested, being able to produce 5.6 g LacA L<sup>-1</sup>, with a yield of 33.8 mg LacA g<sup>-1</sup> RH (hydrolysed with HCl, without nutrient addition, 96 h fermentation). The acid hydrolysis, in this particular case, was carried out at 160 °C, for 70 min, using 4.0% HCl v v<sup>-1</sup>, generating 14.7 g glucose L<sup>-1</sup>. The lactic fermentation via CCRD was batch conducted in 4 mL vials, at 37 °C, pH 6.0, using *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863, specialized in catabolization of both hexoses and pentoses (except arabinose). Experiments with RH hydrolysates containing nutrients added produced up to 18.8 g LacA L<sup>-1</sup> (maximum yield of 997,1 mg LacA g<sup>-1</sup> sugars) in substrate hydrolyzed with HCl, after 52 h fermentation; and 14.6 g LacA L<sup>-1</sup> (maximum yield of 999.8 mg LacA g<sup>-1</sup> sugars) in substrate hydrolyzed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, after 24 h fermentation. Therefore, in this study, the choices of most influence in the LacA production were fermentation with sulfuric acid and employment of *L. rhamnosus*.

**Keywords:** Biorefinery. Rice husks. Acid hydrolysis. *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863. Lactic acid. Process optimization. Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo produtivo do poli(ácido láctico) (PLA).	5
Figura 2 – Estrutura lignocelulósica recalcitrante contendo celulose, hemicelulose e lignina.	7
Figura 3 – Estrutura simplificada para biorrefinaria com base em biomassa de composição lignocelulósica.	8
Figura 4 – Pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas.	9
Figura 5 – Produção de arroz referente à região sul do Brasil.	12
Figura 6 – Isômeros ópticos do ácido láctico.	14
Figura 7 – Fluxograma experimental da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz.	18
Figura 8 – Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) <i>in natura</i> ; b) cominuída.	19
Figura 9 – Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida da casca de arroz. Componentes: 1) vaso de teflon; 2) morteiro de aço inox; 3) sistema de aquecimento/resfriamento; 4) controlador de temperatura.	20
Figura 10 – Caixa-de-luvas empregada na manipulação do micro-organismo: 1) lâmpada germicida; 2) fluxo de N <sub>2</sub> .	23
Figura 11 – Processo fermentativo em semi-micro escala.	24
Figura 12 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional envolvendo HCl (a) e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b) e tendo como variável resposta a concentração de glicose.	33
Figura 13 – Superfícies de resposta (esq.) e curvas de contorno (dir.) para a concentração de glicose (g L <sup>-1</sup> ) envolvendo tratamentos com HCl em função da concentração de ácido x tempo (a) e (b), concentração de ácido x temperatura (c) e (d) e tempo x temperatura (e) e (f).	34
Figura 14 – Superfícies de resposta (esq.) e curvas de contorno (dir.) para a concentração de glicose (g L <sup>-1</sup> ) envolvendo tratamentos com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em função da concentração de ácido x tempo (a) e (b), concentração de ácido x temperatura (c) e (d) e tempo x temperatura (e) e (f).	35
Figura 15 – Perfis de desejabilidades em termos das variáveis codificadas para a eficiência da produção de glicose via processo hidrolítico empregando HCl (a) e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b).	38
Figura 16 – Comparação das análises de glicose via método enzimático <i>versus</i> HPLC-RID em amostras obtidas a partir de processo hidrolítico empregando HCl (a) e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b) conforme as condições do planejamento experimental.	40
Figura 17 – Concentração média dos produtos de interesse e subprodutos formados durante o processo hidrolítico empregando-se HCl (a) e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b) conforme as condições do planejamento experimental.	42
Figura 18 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% (v v <sup>-1</sup> ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: 4-hidroxibenzaldeído [M+K] <sup>+</sup> , m/z 161,07; 5-HMF [M+K] <sup>+</sup> , m/z 164,97; glicose [M+Na] <sup>+</sup> , m/z 203,11 e [M+Na+H] <sup>+</sup> , m/z 204,11 e ácido síringico [M+3K] <sup>+</sup> , m/z 315,23.	48
Figura 19 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (experimento	

n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: 5-HMF  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  149,02; 4-hidroxibenzaldeído  $[M+K]^+$ ,  $m/z$  161,02; glicose  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  203,05 e  $[M+Na+H]^+$ ,  $m/z$  204,05 e ácido siríngico  $[M+3K]^+$ ,  $m/z$  315,16. \_\_\_\_\_ 49

Figura 20 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI-) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: ácido levulínico  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  115,04; furfural  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  118,94 e glicose  $[M-2Na-3H]^+$ ,  $m/z$  131,03. \_\_\_\_\_ 50

Figura 21 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI-) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com  $H_2SO_4$  (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: ácido levulínico  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  115 e glicose  $[M-2Na-3H]^+$ ,  $m/z$  130,98. \_\_\_\_\_ 51

Figura 22 – Cromatograma obtido a partir da injeção de solução-padrão de ácido láctico e uso de coluna Mediterranea Sea 18 (150 mm x 40 mm), eluída em fase aquosa (98%  $v v^{-1}$ ) constituída por 0,1% de ácido fórmico e fase orgânica (2%  $v v^{-1}$ ) constituída por metanol e 1% de ácido fórmico, com vazão de 0,4 mL  $min^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 54

Figura 23 – Cromatograma de uma amostra de fermentado da casca de arroz (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de HCl, 175 °C, 46 min), diluída 10 vezes em água e eluída em condições cromatográficas idênticas àquelas da Figura 22. \_\_\_\_\_ 54

Figura 24 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do fermentado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo o fragmento ácido láctico  $[M+2Na+4H]^+$ ,  $m/z$  140,06. \_\_\_\_\_ 55

Figura 25 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do fermentado da casca de arroz com  $H_2SO_4$  (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo o fragmento ácido láctico  $[M+2Na+4H]^+$ ,  $m/z$  140,06. \_\_\_\_\_ 56

Figura 26 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional envolvendo ensaios fermentativos com *L. rhamnosus*, empregando hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl (a) e com 2,2% de  $H_2SO_4$  (b), tendo como variável resposta a produção de ácido láctico. \_\_\_\_\_ 60

Figura 27 – Superfície de resposta (esq.) e curva de contorno (dir.) para a concentração de ácido láctico 60 h ( $g L^{-1}$ ) envolvendo fermentações com *L. rhamnosus* a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl, em função das concentrações de extrato de levedura x polissorbato 80 (a) e (b). \_\_\_\_\_ 61

Figura 28 – Superfície de resposta (esq.) e curva de contorno (dir.) para a concentração de ácido láctico 24 h ( $g L^{-1}$ ) envolvendo fermentações com *L. rhamnosus* a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de  $H_2SO_4$ , em função das concentrações de extrato de levedura x polissorbato 80 (a) e (b). \_\_\_\_\_ 61

Figura 29 – Perfis do crescimento de *L. rhamnosus* em meio MRS e em hidrolisados da casca de arroz com 2,2% de HCl e com 2,2% de  $H_2SO_4$  (diluição 1:10), durante 60 h. \_\_\_\_\_ 62

Figura 30 – Cinética da produção de ácido láctico e consumo de açúcares ( $g L^{-1}$ ) durante a fermentação láctica de *L. rhamnosus* (37 °C) a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl (a) e com 2,2% de  $H_2SO_4$  (b) suplementado com nutrientes (experimento n° 4: 15,3  $g L^{-1}$  de extrato de levedura e 1,6  $g L^{-1}$  de polissorbato 80). \_\_\_\_\_ 65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química aproximada da casca de arroz. _____	13
Tabela 2 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento da glicose. _____	21
Tabela 3 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento do ácido láctico. _____	25
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação de glicose, xilose e arabinose. _____	25
Tabela 5 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação de ácido láctico, ácido acético e 5-HMF. _____	27
Tabela 6 – Figuras-de-mérito para a determinação dos açúcares. _____	29
Tabela 7 – Figuras-de-mérito para a determinação dos subprodutos. _____	30
Tabela 8 – Resultados do delineamento composto central rotacional para a resposta da glicose. _____	31
Tabela 9 – Análise de variância para o parâmetro glicose. _____	32
Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a determinação do ácido láctico. _____	53
Tabela 11 – Resultados do delineamento composto central rotacional para produção de ácido láctico, após 60 h de fermentação com <i>L. rhamnosus</i> , empregando como substrato hidrolisado da casca de arroz com HCl e após 24 h de fermentação com <i>L. rhamnosus</i> , empregando como substrato hidrolisado da casca de arroz com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . _____	58
Tabela 12 – Análise de variância para o parâmetro ácido láctico. _____	59
Tabela 13 – Avaliação econômica da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz. _____	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ALac – ácido láctico  
ANOVA – análise de variância, do inglês *analysis of variance*  
CA – casca de arroz  
C<sub>ALac</sub> – concentração de ácido láctico  
C<sub>Gli</sub> – concentração de glicose  
5-HMF – 5-hidroximetil-furfural  
D – desejabilidade global  
DCCR – delineamento composto central rotacional  
di – função individual de desejabilidade  
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*  
GOD – glicose oxidase  
HCA – hidrolisado da casca de arroz  
HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *high performance liquid chromatograph with diode array detector*  
HPLC-RID – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração, do inglês *high performance liquid chromatograph with refractive index detector*  
 $\lambda$  – comprimento de onda  
*L.* – *Lactobacillus*  
LAB – bactérias produtoras de ácido láctico  
LAQIA – Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais  
LATER – Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos  
LC-MS/TOF – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo-de-vôo, do inglês *liquid chromatograph with time-of-flight mass spectrometry*  
LD – limite de detecção  
LQ – limite de quantificação  
MAPA – Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MCE – membrana em ester celulose  
MRS – Mann, Rogosa & Sharpe  
P.A. – padrão analítico  
P<sub>ALac</sub> – produtividade de ácido láctico  
P&D – Pesquisa & Desenvolvimento  
PLA – poli(ácido láctico)  
POD – peroxidase  
PTFE – politetrafluoretileno  
 $r^2$  – coeficiente de determinação  
R<sub>ALac</sub> – rendimento de ácido láctico  
R<sub>Gli</sub> – rendimento de glicose  
 $\sigma$  – desvio padrão  
S/N – sinal/ruído  
SHF – hidrólise e fermentação em separado, do inglês *separate hydrolysis and fermentation*  
SSF – sacarificação e fermentação simultâneas, do inglês *simultaneous accharification and fermentation*  
 $\phi$  – diâmetro  
 $\bar{u}$  - média  
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria  
UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo geral	2
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Biorrefinaria – Rota bioquímica</b>	<b>4</b>
2.1.1 Biomassa lignocelulósica	6
2.1.1.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	9
2.1.1.2 Casca de arroz	11
<b>2.2 Fermentação láctica</b>	<b>13</b>
2.2.1 Ácido láctico: aplicações e síntese	13
2.2.2 Biotransformação de resíduos lignocelulósicos em ácido láctico	15
2.2.2.1 Micro-organismos produtores de ácido láctico	15
2.2.2.2 Modos de fermentação láctica	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Pré-tratamento da casca de arroz</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Hidrólise ácida da casca de arroz</b>	<b>20</b>
3.2.1 Otimização do processo hidrolítico	21
3.2.2 Tratamento do hidrolisado	22
<b>3.3 Manutenção e inóculo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i></b>	<b>22</b>
<b>3.4 Fermentação láctica a partir da casca de arroz</b>	<b>23</b>
3.4.1 Otimização do processo fermentativo	24
<b>3.5 Métodos analíticos</b>	<b>25</b>
3.5.1 Determinação de glicose, xilose e arabinose por HPLC-RID	25
3.5.2 Determinação da glicose por método enzimático	26
3.5.3 Análise de ácido láctico, ácido acético e 5-HMF	27
3.5.4 Análise dos hidrolisados por LC-MS/TOF	27
<b>3.6 Cálculos de rendimento e produtividade</b>	<b>28</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Hidrólise ácida da casca de arroz</b>	<b>29</b>
4.1.1 Determinação dos analitos por métodos cromatográficos	29
4.1.2 Otimização da hidrólise ácida	30
4.1.3 Análise de glicose via método enzimático <i>versus</i> HPLC-RID	39
4.1.4 Análise dos produtos de interesse e subprodutos	41
4.1.5 Análise da composição dos hidrolisados por LC-MS/TOF	46
<b>4.2 Fermentação láctica do hidrolisado da casca de arroz</b>	<b>53</b>
4.2.1 Determinação do ácido láctico por HPLC-DAD	53
4.2.2 Detecção do ácido láctico por LC-MS/TOF	55
4.2.3 Otimização da produção de ácido láctico	56
<b>4.3 Avaliação econômica preliminar da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz</b>	<b>66</b>

<b>4.4 Gerenciamento de resíduos</b>	<b>67</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>70</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
Apêndice	82

# 1. INTRODUÇÃO

Neste início de século, a combinação entre os setores econômico, tecnológico, político e de recursos humanos está impulsionando o surgimento de um mercado voltado à utilização integral das matérias-primas renováveis (biomassas) em substituição aos combustíveis fósseis e, com isso, promovendo a sustentabilidade industrial a partir do conceito de *biorrefinaria* (BOZELL & PETERSEN, 2010; ZHANG, 2008). O sinergismo das múltiplas alternativas em matérias-primas, tecnologias de conversão e variedade de produtos compõem o cenário de diversidade que retrata a situação atual da indústria baseada em biomassa.

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz (CA), são fontes abundantes e não dispendiosas para a biotransformação de compostos renováveis em produtos com valor agregado. O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo, servindo como alimento básico para cerca da metade da população mundial. As projeções de produção de arroz, avaliadas pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010), mostram que o Brasil vai colher 15,2 milhões t de arroz na safra 2021/2022, sendo que, somente o estado do Rio Grande do Sul (RS), maior produtor nacional, é responsável por 66,7% desta parcela. Considerando que, deste total de arroz produzido, aproximadamente 20% correspondem à casca, teremos 2,03 milhões t do resíduo agrícola nos solos do RS (WEI *et al.*, 2009). Portanto, a utilização adequada deste resíduo poderá minimizar os problemas ambientais vinculados ao seu acúmulo e diminuir o consumo de combustíveis fósseis, além de resultar em melhora no quadro atual do aproveitamento desta matéria-prima, que desperta grande interesse ultimamente.

O ácido láctico (ALac) é um importante insumo industrial, com vasto mercado em expansão devido a sua versatilidade. Recentemente, o consumo de ALac aumentou consideravelmente pelo uso como monômero na produção de poli(ácido láctico) (PLA) – polímero sustentável e compostável (ROMANI *et al.*, 2008; WEE *et al.*, 2004). A produção do ALac, via fermentação é dependente de distintos fatores, sendo o custo da matéria-prima extremamente significativo (ABDEL-RAHMAN,

TASHIROC & SONOMOTO, 2011). Logo, a CA, descrita aqui como substrato alternativo, torna-se uma matéria-prima promissora para a produção de um ou mais ácidos orgânicos, bases importantes de processos químicos industriais.

Todavia, os componentes lignocelulósicos que integram a CA necessitam ser previamente separados para que as frações de celulose e hemicelulose sejam despolimerizadas, a partir de tratamentos hidrolíticos químicos ou enzimáticos, em sacarídeos fermentáveis (MOSIER *et al.*, 2005). Por várias décadas, a hidrólise eficaz da matriz multicomponente das matérias-primas lignocelulósicas e a fermentação posterior dos açúcares resultantes têm sido um grande desafio.

Uma conversão eficiente de todos os carboidratos presentes no hidrolisado lignocelulósico em ALac é um requisito fundamental para maximizar a rentabilidade do processo, uma vez que a gama de bioprodutos está se expandindo para além de compostos de alto valor / baixo volume, e começando a competir com a produção sintética tradicional de *commodities* químicos (FU *et al.*, 2009; JOHN, NAMPOOTHIRI & PANDEY, 2007). Adicionalmente, conforme os princípios da biorrefinaria, faz-se necessário considerar a utilização efetiva de todos os componentes advindos dos materiais lignocelulósicos com o intuito de minimizar desperdícios e, com isso, competir de maneira eficaz com as opções tradicionais.

A tendência para a sustentabilidade ambiental, em paralelo à *química verde*, tem aumentado significativamente o interesse na valorização dos produtos da rota fermentativa, tal como o ALac, devido às inúmeras vantagens em relação à síntese química tradicional. Assim, na era pós-petróleo, o aproveitamento integral e racional das biomassas lignocelulósicas poderá revolucionar uma série de segmentos industriais, englobando bioprodutos, biopolímeros e biocombustíveis, além de energia e alimentos, trazendo benefícios imensuráveis para países de grandes extensões territoriais e de elevada produtividade de biomassa, entre os quais o Brasil ocupa posição de destaque.

## 1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como principal objetivo investigar o aproveitamento da CA, residual do processo de beneficiamento, visando a biotransformação em

ALac a partir de hidrolisados desta biomassa e, assim, contribuir para a mitigação do crescente problema ambiental, decorrente da disposição irregular de resíduos agroindustriais do RS.

Os objetivos específicos compreendem:

- i) desenvolver processo inovador de produção de ALac, em escala semi-micro, em laboratório analítico-ambiental (não-microbiológico), com ênfase na redução do consumo de reagentes e no número de etapas do processo, bem como de produção de efluentes e resíduos (seguindo os preceitos da Química e da Engenharia Verdes);
- ii) desenvolver metodologia analítica adequada para a quantificação de açúcares e ácidos orgânicos, bem como de subprodutos formados;
- iii) analisar a composição geral dos hidrolisados da CA, buscando identificar subprodutos de interesse, decorrentes da degradação da biomassa lignocelulósica em questão;
- iv) otimizar as condições operacionais com o apoio de ferramentas de planejamento experimental, de tal modo a maximizar rendimentos e produtividade dos produtos de interesse.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biorrefinaria – Rota bioquímica

Os esforços em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) para a utilização diversificada de matérias-primas renováveis (biomassas) em substituição às fontes fósseis têm se intensificado ultimamente. Nesse contexto, a *biorrefinaria* surge como estrutura industrial que emprega biomassas agrícolas e agroindustriais como base para a produção de vasto número de compostos químicos. Tal estrutura compreende as instalações e os processos através dos quais as matérias-primas renováveis e seus resíduos são transformados em biocombustíveis, produtos químicos com valor agregado, além de energia e alimentos (ANTUNES *et al.*, 2010). O desenvolvimento de biorrefinarias possui dois focos estratégicos: i) o incentivo em favor da utilização das biomassas locais (foco energético) e ii) a criação de uma indústria robusta de base biológica (foco econômico) (BOZELL & PETERSEN, 2010).

Os recursos da biotecnologia moderna, aliados aos da indústria química, constituem uma via potencialmente importante na consolidação das biorrefinarias. A produção de insumos químicos a partir da indústria biotecnológica adere aos princípios da *química verde*, tal como redução do consumo energético e da geração de resíduos, uso de catálise seletiva e produção de compostos biodegradáveis. Adicionalmente, a condução dos procedimentos em uma única etapa facilita a otimização da produção – contraditoriamente às múltiplas etapas da síntese química – envolvendo menores gastos energéticos e emprego de menores quantidades de reagentes e, ainda, permitindo a síntese de produtos não possíveis de produção via síntese química (SIJBESMA, 2003).

Como dito anteriormente, os produtos de base biológica podem ser biodegradados em dióxido de carbono e água, sendo utilizados de maneira sustentável durante a fotossíntese para a produção da biomassa vegetal. A Figura 1 ilustra o ciclo produtivo do PLA, biopolímero produzido a partir do ALac, principalmente, para aplicações em embalagens plásticas e na confecção de fibras para a indústria têxtil (JOHN *et al.*, 2009; HATTI-KAUL *et al.*, 2007).

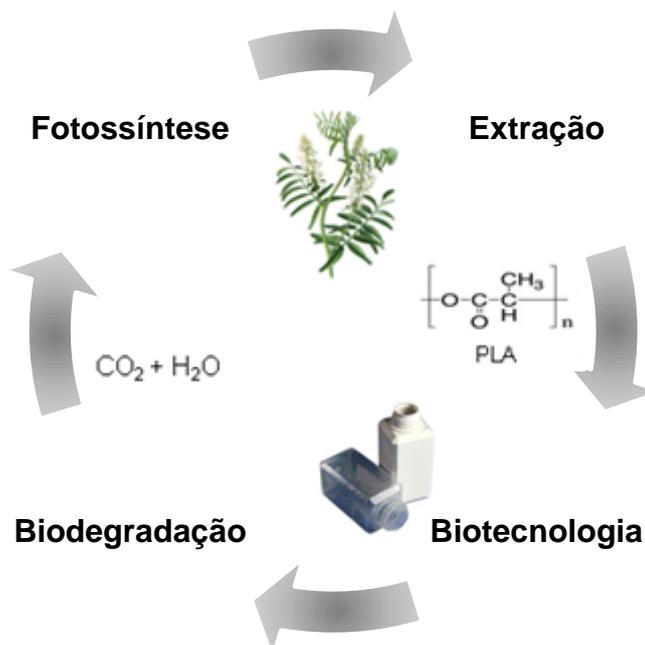


Figura 1 – Ciclo produtivo do poli(ácido láctico) (PLA).

Fonte: Adaptado de HATTI-KAUL *et al.*, 2007.

Conforme Octave & Thomas (2009), dependendo do composto majoritário da estrutura química das biomassas, as biorrefinarias podem ser classificadas como: biorrefinaria base carboidratos, biorrefinaria base lignocelulósica e biorrefinaria base lipídica. A primeira propõe a utilização dos açúcares, que são as reservas de energia nos vegetais (sacarose e amido). São açúcares mais acessíveis às necessidades energéticas dos vegetais e objeto de uso pleno da indústria alimentícia. A segunda baseia-se na utilização dos constituintes estruturais do vegetal. São frações de maior complexidade estrutural e, por isso, de menor acessibilidade. A terceira baseia-se em grupos específicos de vegetais capazes de produzir e armazenar triglicerídeos, que também atuam como reserva energética para o vegetal, tendo enorme aplicabilidade em diversos setores industriais (ANTUNES *et al.*, 2010).

Por tratar-se de uma biomassa extremamente abundante e com elevada capacidade de processamento, renovável e praticamente não dispendiosa, além de não concorrer a nível alimentício, os substratos lignocelulósicos tornam-se mais atraentes à produção de bioprodutos, biocombustíveis e energia (DAMARTZIS & ZABANIOTOU, 2011; DEMIRBAS, 2011).

### 2.1.1 Biomassa lignocelulósica

As biomassas lignocelulósicas, incluindo resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais compõem as fontes de carboidratos mais abundantes na natureza, sendo subutilizadas industrialmente e, paralelamente, destacando-se como potenciais matérias-primas capazes de serem convertidas em *commodities* e energia através de processos bioquímicos. Aproximadamente 3,5 bilhões t de resíduos agrícolas são produzidos anualmente no mundo (JOHN, NAMPOOTHIRI & PANDEY, 2007). No Brasil, resíduos de colheita e do processamento de culturas como arroz, cana-de-açúcar, cítricos, coco, gramíneas, mandioca, milho, trigo e soja representam 597 milhões t anuais. Por conseguinte, o país ocupa posição estratégica para assumir a liderança no aproveitamento integral destas biomassas (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

Os principais constituintes das biomassas lignocelulósicas são celulose (~40-50%), hemicelulose (~25-30%) e lignina (~15-20%), além de extrativos e distintos materiais inorgânicos (KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004). Devido à heterogeneidade destes materiais, tal composição varia conforme as propriedades particulares de cada vegetal. A lignina, juntamente com a hemicelulose, forma uma matriz que envolve a celulose, fazendo com que estes três componentes majoritários encontrem-se estritamente associados em uma estrutura cristalina e complexa (Figura 2) (KESHWANI & CHENG, 2009; ZHANG, 2008). Cabe salientar, que a separação efetiva de cada um destes constituintes durante o processamento, tem papel essencial na composição de fatores de viabilidade econômica dos múltiplos produtos gerados (MENON & RAO, 2012).

Tal como evidenciado na Figura 2, a celulose é empacotada em microfibrilas, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio. Estas microfibrilas são interligadas umas às outras pela hemicelulose, por polímeros amorfos de diferentes açúcares, bem como por polímeros de pectina, sendo, finalmente, cobertos pela lignina. As microfibrilas celulósicas, que estão presentes na matriz hemicelulose-lignina, estão associadas na forma de macrofibrilas. As moléculas individuais de microfibrilas estão empacotadas tão firmemente que, não somente enzimas, mas pequenas moléculas como a água, não conseguem penetrar no complexo (ARANTES & SADDLER, 2010). As regiões cristalinas das microfibrilas são mais resistentes à biodegradação

em relação às partes amorfas e, por isso, são ditas pouco reativas (HALLAC & RAGAUSKAS, 2011).

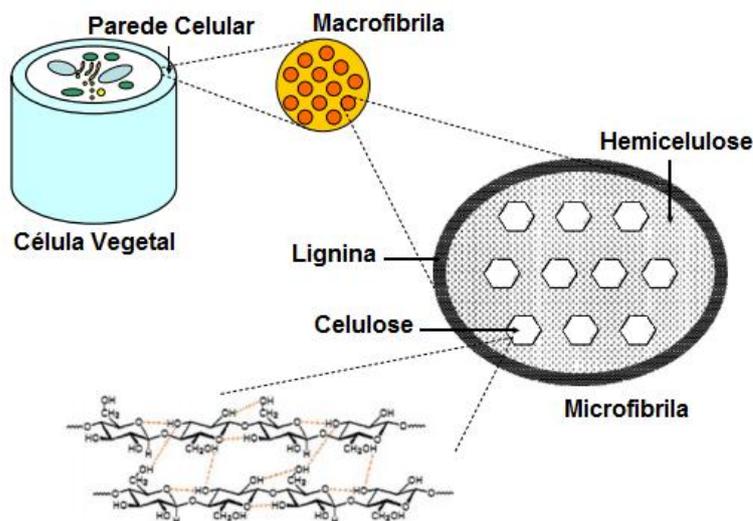


Figura 2 – Estrutura lignocelulósica recalcitrante contendo celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: ZHANG, 2008.

A hidrólise total da celulose gera apenas glicose, que é considerada a principal matéria-prima para processos biotecnológicos, podendo ser convertida a substâncias químicas, como: etanol, lipídeos (LIAN *et al.*, 2010), ácidos orgânicos, 5-hidroximetil-furfural (5-HMF), furfural (BEVILAQUA, 2010), glicerol, sorbitol, manitol, frutose, enzimas, dentre outras (ANTUNES *et al.*, 2010). O produto da hidrólise da fração hemicelulósica é uma mistura de açúcares, predominando, no caso da CA, a xilose, que pode ser convertida a xilitol (RAMBO, 2009) ou demais bioprodutos, quando se emprega micro-organismos capazes de degradar tal açúcar. Quando não é queimada para gerar energia, a maioria da lignina remanescente do processo hidrolítico oferece perspectivas de utilização para a obtenção de produtos com valor agregado. Recentemente, pesquisas têm demonstrado que a lignina possui um potencial que vai muito além do que lhe foi atribuído até o momento – geração de energia através de sua queima. Alguns exemplos destas aplicações são: na produção de dispersante para a indústria química, aditivo/substituto de resinas

fenólicas para produção de painéis, na produção de fibra de carbono, como veículo de fertilizantes e pesticidas, fonte de distintos compostos químicos, etc. (DOHERTY, MOUSAVIOUN & FELLOWS, 2011; ZHANG, 2008)

A planta de uma biorrefinaria lignocelulósica típica deve tirar proveito do sinergismo existente entre os distintos processos, baseando-se no princípio de que *i)* todos os açúcares isolados são utilizados na produção de bioprodutos, biopolímeros e biocombustíveis e *ii)* todos os resíduos do processo (incluindo lignina, hemicelulose e celulose) são utilizados na geração de energia (Figura 3).

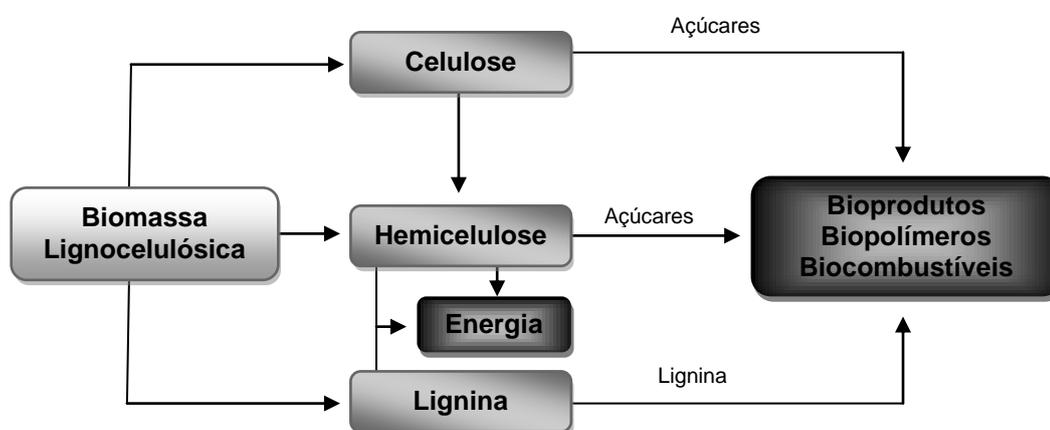


Figura 3 – Estrutura simplificada para biorrefinaria com base em biomassa de composição lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2010.

Segundo Menon & Rao (2012), na biorrefinaria lignocelulósica, a conversão da biomassa geralmente envolve cinco etapas: *i)* escolha da biomassa adequada; *ii)* pré-tratamento eficaz; *iii)* hidrólises ácida e/ou enzimática; *iv)* fermentação a partir das hexoses (glicose, galactose, manose e frutose) e pentoses (xilose e arabinose) e *v)* recuperação e purificação dos produtos obtidos. Todavia, os principais impedimentos no que diz respeito ao desenvolvimento de uma tecnologia economicamente viável para a biodegradação da celulose são: a intrínseca associação com a hemicelulose e com a lignina, a cristalinidade da estrutura, o grau de polimerização e a área superficial.

### 2.1.1.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Tendo em vista que o pré-tratamento interfere nas etapas posteriores, a seleção por um pré-tratamento efetivo é imprescindível, uma vez que a intenção é desorganizar e provocar o rompimento do complexo lignocelulósico, aumentando a digestibilidade da celulose e tornando-a mais acessível à etapa hidrolítica (Figura 4).

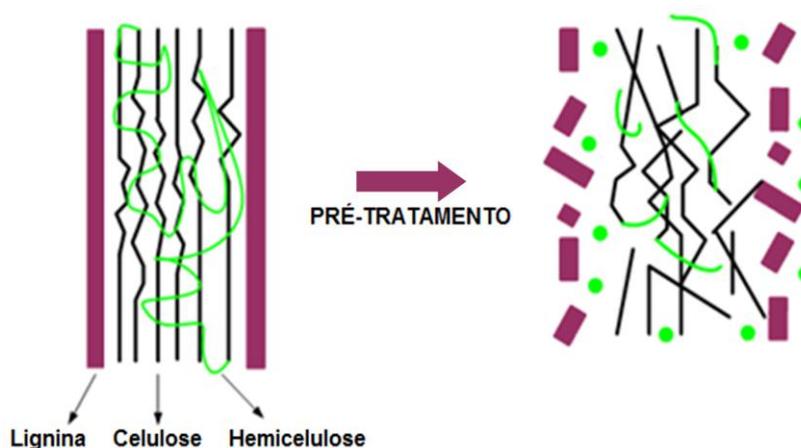


Figura 4 – Pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas.

Fonte: Adaptado de HSU, LADISCH & TSAO, 1980.

Conforme Taherzadeh & Karimi (2008) e Zhang (2008), um pré-tratamento efetivo e econômico deve englobar os seguintes requisitos: *i)* tornar as fibras celulósicas acessíveis às hidrólises ácida/enzimática sem que ocorra degradação da celulose; *ii)* trabalhar em condições brandas de temperatura para evitar a degradação dos açúcares e a formação de possíveis inibidores às enzimas hidrolíticas e aos micro-organismos fermentadores; *iii)* consumir o mínimo possível de reagentes químicos; *iv)* reduzir custos relacionados à construção do reator; *v)* minimizar a demanda energética; *vi)* gerar o mínimo de resíduos e *vii)* diminuir o número de etapas envolvidas.

Conceitualmente, os pré-tratamentos podem ser divididos em quatro tipos: físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, ou, ainda, uma combinação destes,

que dependerá da natureza do material a ser tratado, do grau de separação requerido e do fim a que se destina o processo (KESHWANI & CHENG, 2009). As técnicas usuais de pré-tratamento envolvem sinergismo entre a ação do calor, do pH do meio e do tempo de exposição da matriz, nas condições do processo (ANTUNES *et al.*, 2010).

Os pré-tratamentos físicos, normalmente, envolvem moagem, irradiação e extrusão. O objetivo principal é aperfeiçoar o processo hidrolítico, reduzindo a cristalinidade das fibras celulósicas, bem como eliminando as limitações de transferências de massa e calor (MENON & RAO, 2012). Os mais importantes pré-tratamentos físicos-químicos incluem explosão a vapor (catalisada ou não por CO<sub>2</sub>), explosão de fibras com amônia (AFEX) e água líquida quente (LHW) (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). Dentre as categorias de pré-tratamentos existentes, a classe dos químicos tem sido estudada extensivamente, e inclui tratamentos ácidos e alcalinos, principalmente, além da utilização de solventes orgânicos, peróxidos e ozônio.

Conforme comentado por Taherzadeh & Karimi (2008), a hidrólise ácida diluída a temperaturas intermediárias é, provavelmente, a técnica mais usual entre os pré-tratamentos químicos devido à relação custo-benefício. Pode servir tanto como um tratamento da lignocelulose para a posterior hidrólise enzimática, quanto como um método de hidrólise propriamente dito para fermentar açúcares. É eficiente na remoção da hemicelulose, mas não tanto da lignina (MENON & RAO, 2012). Consiste em adicionar ácido diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, etc.), normalmente 0,2-2,5% (v v<sup>-1</sup>) e hidrolisar a biomassa a temperaturas de 130-210 °C por minutos ou horas (KESHWANI & CHENG, 2009). Sob tais condições, distintos subprodutos são formados a partir da degradação dos açúcares e da lignina. Estes compostos integram três grupos principais: *i*) derivados de furanos, tais como 5-HMF e furfural a partir da degradação de hexoses e pentoses, respectivamente; *ii*) ácidos orgânicos, principalmente acético, fórmico e levulínico, formados a partir da degradação do 5-HMF e do furfural e *iii*) compostos fenólicos como vanilina, siringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído e fenol, gerados pela degradação parcial da lignina (ANTUNES *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2007). Tais produtos secundários afetam negativamente a fermentação devido à ação tóxica aos micro-organismos fermentativos (MUSSATTO & ROBERTO, 2004).

O pré-tratamento com micro-organismos é uma técnica sustentável e promissora, que apresenta a vantagem de não exigir o uso de reagentes químicos, operar em condições amenas de temperatura e necessitar baixa demanda energética (SALVACHÚA *et al.*, 2011; KURAKAKE, IDE & KOMAKI, 2007). Todavia, este pré-tratamento é lento e requer um controle cuidadoso do crescimento microbiano (MENON & RAO, 2012). Adicionalmente, a sacarificação enzimática ainda é economicamente inviável, pois o custo das enzimas utilizadas no processo hidrolítico é relativamente alto e, também, requer emprego de pré-tratamentos físicos/químicos para chegar a rendimentos viáveis.

Durante o processo hidrolítico, a maioria da hemicelulose e parte da celulose são hidrolisadas, sendo que uma grande quantidade de resíduo sólido (40-50%,  $m m^{-1}$ , da matéria-prima), rico em lignina, fica concentrada (DIZHBITE *et al.*, 2011). Caso este resíduo hidrolítico seja também eficientemente utilizado, a produção de insumos de biomassa lignocelulósica pode tornar-se mais viável economicamente e, paralelamente, o impacto ambiental resultante do descarte de resíduos seria prevenido (HUANG *et al.*, 2012).

#### 2.1.1.2 Casca de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) está entre os cereais mais consumidos do mundo. Conforme a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2012), o Brasil é o nono maior produtor mundial e colheu 11,6 milhões t na safra 2011/2012. O cultivo de arroz irrigado, praticado na região Sul do Brasil, contribui, em média, com 77,4% da produção nacional, sendo o RS o maior produtor brasileiro, com 66,7% (Figura 5) (CONAB, 2012).

Após o processo de beneficiamento, a CA torna-se um rejeito agrícola, caracterizado pela natureza abrasiva, baixa densidade, elevado conteúdo de cinza/silica, grande resistência à degradação e difícil digestibilidade (SAHA & COTTA, 2008), sendo que estas particularidades fazem da CA um subproduto com pouco valor nutritivo. Adicionalmente, a CA é comumente eliminada através da queima em campos abertos, desencadeando eventuais problemas ambientais e de saúde pública, bem como, desperdício de energia (LIM *et al.*, 2012).

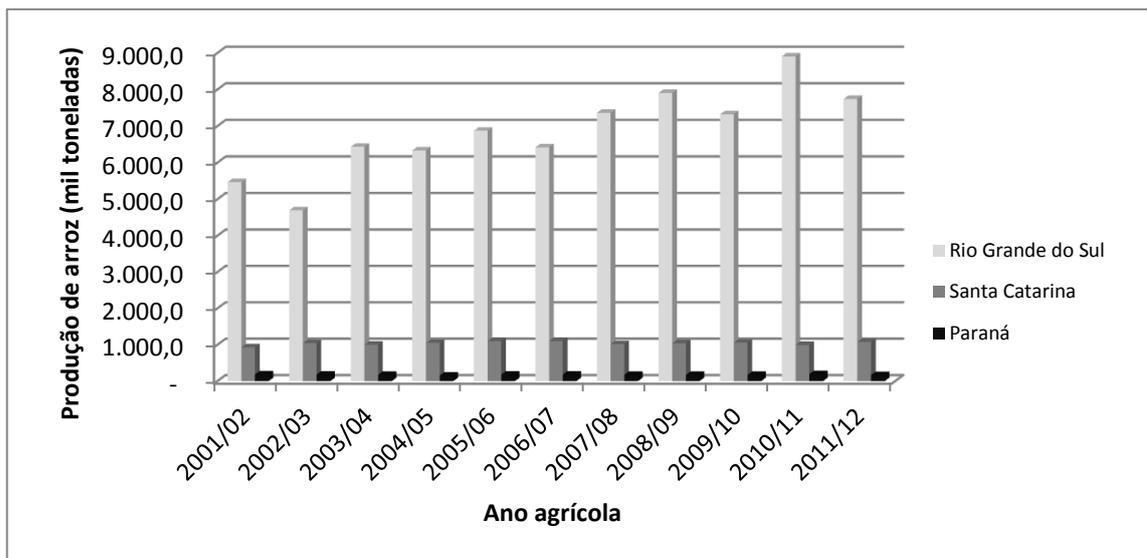


Figura 5 – Produção de arroz referente à região sul do Brasil.

Fonte: CONAB, 2012.

Devido ao teor energético da CA, a pirólise tem sido proposta como processo de valorização deste resíduo (LIM *et al.*, 2012). A cinza da CA, resultante da queima, é rica em sílica ( $\text{SiO}_2$ ), constituindo matéria-prima econômica para a produção de distintos materiais, em diferentes ramos industriais da construção civil (CARLOS & KHANG, 2008). Algumas alternativas para o aproveitamento destas cinzas, além da obtenção de sílica pura, são: produção de carbetos de silício ( $\text{SiC}$ ), utilização como carga em polímeros, produção de cimento e uso em concreto, uso como adsorventes, uso como suporte de catalisadores metálicos, síntese de zeólitas e produção de diferentes tipos de silicatos (FOLETTTO *et al.*, 2005), além do uso como substrato para compostagem e adubação na floricultura.

A CA é um dos resíduos lignocelulósicos, ademais, que tem atraído a atenção dos pesquisadores devido ao seu conteúdo de celulose e hemicelulose (Tabela 1) e ao seu potencial para produção de bioprodutos e biocombustíveis (ANG *et al.*, 2012). Assim, tais fatos tornam interessante o estudo do aproveitamento desta biomassa, largamente disponível, renovável e, praticamente, sem valor comercial (SUXIA *et al.*, 2012; ECONOMOU *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Composição química aproximada da casca de arroz.

Referência Bibliográfica	CA ( $m m^{-1}$ ) (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Ang <i>et al.</i> , 2012	53,18	4,63	19,67
Kong <i>et al.</i> , 2008	23,16	45,32	20,78
Saha & Cotta, 2008	35,6	12,0	15,4
Njie, 2007	47	18	13
Armesto <i>et al.</i> , 2002	28,6	28,6	24,4

Diversos trabalhos sobre a utilização da CA estão disponíveis na literatura, visando a produção de: furfural (SUXIA *et al.*, 2012), etanol (CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011; MEGAWATI *et al.*, 2010; SCHNEIDER & HÖRNER, 1979), ácido levulínico e 5-HMF (BEVILAQUA, 2010) e xilitol (RAMBO, 2009), via hidrólise ácida diluída; ALac por auto-hidrólise na produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) e posterior fermentação (GULLÓN *et al.*, 2008) e por conversão catalítica hidrotérmica com Zn(II), Ni(II), Co(II) e Cr(III) (KONG *et al.*, 2008); furfural por catalisador ácido sólido (SUXIA *et al.*, 2012); etanol por pré-tratamento com  $Ca(OH)_2$  e sacarificação enzimática (SAHA & COTTA, 2008); e, ademais, uma série de compostos produzidos por pré-tratamento com ácido diluído seguido de hidrólise ácida concentrada ou alcalina (MA *et al.*, 2011), pré-tratamento líquido iônico (ANG *et al.*, 2012) e pirólise (MARTINS *et al.*, 2007; TSAI, LEE & CHANG, 2007).

## 2.2 Fermentação láctica

### 2.2.1 Ácido láctico: aplicações e síntese

O ALac (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico de ocorrência natural, com valor agregado e versátil considerando-se inúmeras aplicações na indústria alimentícia (que detém cerca de 85% da demanda), farmacêutica, química, têxtil e do couro (JOHN *et al.*, 2009; JOHN, NAMPOOTHIRI & PANDEY, 2007; DATTA & HENRY, 2006). Pelo fato do ALac possuir dois grupos funcionais reativos, carboxila (-COOH) e hidroxila (-OH), pode ser convertido em diferentes insumos

químicos, como os ácidos acrílico e pirúvico, 1,2-propanodiol, 2,3-pentadiona, acetaldeído, etc. (VARADARAJAN & MILLER, 1999). Recentemente, o consumo do ALac expandiu-se consideravelmente em função da aplicabilidade na indústria de polímeros, como monômero para a produção de PLA (ILMÉN *et al.*, 2007). Estima-se que o consumo global do ALac é de aproximadamente 130.000-150.000 t anuais (WEE, KIM & RYU, 2006).

Em decorrência da sua estrutura química, o ALac apresenta dois isômeros ópticos: D- e L- ALac (Figura 6). Existem duas rotas pelas quais o ALac pode ser produzido: química ou fermentativa. A síntese química fundamenta-se na hidrólise da lactonitrila, um derivado petroquímico, com ácidos fortes, resultando em uma mistura racêmica de DL-ácido láctico (WEE, KIM & RYU, 2006; NARAYANAN, ROYCHOUDHURY & SRIVASTAVA, 2004; DATTA *et al.*, 1995). Todavia, sob o ponto de vista nutricional, o D-ALac é indesejável, uma vez que esta forma isomérica não é metabolizada facilmente pelo organismo humano. A rota fermentativa, responsável por cerca de 90% da produção mundial, converge à produção de isômeros L- ou D- opticamente puros, uma vez que a pureza óptica do ALac é importante para a síntese do PLA altamente cristalino (KARP *et al.*, 2011; SÖDERGÅRD & STOLT, 2002; HOFVENDAHL & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Outro benefício desta técnica é o fato da fermentação requerer baixo consumo energético, sendo conduzida a temperaturas mais brandas (ILMÉN *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2001).

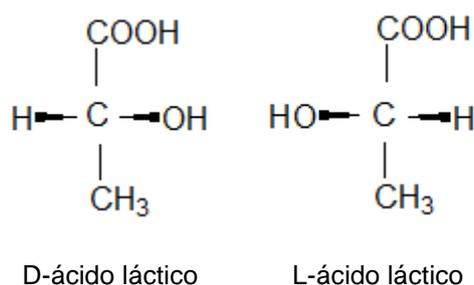


Figura 6 – Isômeros ópticos do ácido láctico.

Fonte: REDDY *et al.*, 2008.

## 2.2.2 Biotransformação de resíduos lignocelulósicos em ácido láctico

Matérias-primas como amido e açúcar refinado, por exemplo, perfazem a maior porção dos custos da rota fermentativa, representando um sério obstáculo na competição com a síntese química (DATTA *et al.*, 1995). A solução deste impasse encontra-se no uso de biomassas lignocelulósicas que, conforme mencionado anteriormente, são abundantes, renováveis, de baixo custo e não competem com a produção de alimentos, e, ademais, servindo como fonte de carboidratos e nitrogênio aos micro-organismos (WANG *et al.*, 2010).

Sabendo-se da grande demanda por ALac pela indústria, hoje, tais características são fundamentais para a viabilidade da produção biotecnológica do ALac (BUSTOS *et al.*, 2007; JOHN, NAMPOOTHIRI & PANDEY, 2007; WEE, KIM, & RYU, 2006). Estes autores enfatizam, ainda, que, além do custo inferior destas matérias-primas, é desejável que o substrato contenha baixos níveis de contaminantes/compostos tóxicos, que permitam a fermentação com o mínimo de pré-tratamentos e, paralelamente, com índices superiores de produtividade e rendimento, havendo pouca ou nenhuma formação de subprodutos.

### 2.2.2.1 Micro-organismos produtores de ácido láctico

De maneira geral, os micro-organismos produtores de ALac, em sua maioria anaeróbios, convertem o ácido pirúvico resultante da rota de Embden-Meyerhof a ALac, sob a ação da enzima lactato-desidrogenase. Contudo, a estereoespecificidade do ALac é dependente do micro-organismo escolhido.

Tipicamente, as bactérias produtoras de ALac (LAB) são gram positivas, constituindo um grupo de micro-organismos específicos. São capazes de produzir ALac como metabólico principal, com alto rendimento e alta produtividade. Os gêneros *Lactobacillus* (L.), *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* são os mais empregados. Com base na natureza fermentativa, as LABs classificam-se em *i*) homofermentativas, produzindo somente Alac, e *ii*) heterofermentativas, que juntamente com ALac, produzem etanol, ácido acético, diacetil, CO<sub>2</sub>, etc. (REDDY *et*

*al.*, 2008; JOHN, NAMPOOTHIRI & PANDEY, 2007; LITCHFIELD, 1996). As LABs são cultivadas a temperaturas entre 5-45 °C, com pH ótimo entre 5,5 e 6,5, sendo tolerantes às condições ácidas (a maior parte das cepas é capaz de crescer em pH 4,4). Estes micro-organismos possuem um requisito nutricional complexo devido a sua limitação em sintetizar aminoácidos e vitaminas (REDDY *et al.*, 2008).

Grande parte das LABs homofermentativas consegue converter somente glicose em ALac. Em contraste, algumas LABs heterofermentativas são capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses, como *L. pentosus* ATCC 8041 e *L. bifementans* DSM 20003, utilizadas na produção de ALac a partir de espigas de milho e farelo de trigo, respectivamente (GIVRY, PREVOT & DUCHIRON, 2008; ZHU, LEE & ELANDER, 2007). Outra cepa selecionada, reportada como fermentadora de glicose e xilose, foi a bactéria homofermentativa *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863, sendo que tal cepa é capaz de consumir outros açúcares presentes em menores quantidades na hemicelulose, exceto arabinose (CUI, LI & WAN, 2011; IYER, THOMAS & LEE, 2000). Ademais, co-culturas de micro-organismos produtores de ALac também podem elevar a eficiência de conversão do substrato (CUI, LI & WAN, 2011).

Culturas mistas de *L. rhamnosus* (cepa homofermentativa capaz de metabolizar somente glicose) e *L. brevis* ATCC367 (cepa heterofermentativa apta a metabolizar glicose, xilose e galactose) foram investigadas por Cui, Li & Wan (2011) com o intuito de melhorar o aproveitamento dos açúcares (pentoses e hexoses) derivados da palha de milho (tratada com NaOH), visando a produção de ALac. O rendimento com o emprego da co-cultura foi de 0,7 g g<sup>-1</sup> e a produtividade de 0,58 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Quando as cepas foram utilizadas individualmente, o rendimento e a produtividade para *L. rhamnosus* foram de 0,6 g g<sup>-1</sup> e 0,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, e para *L. brevis*, de 0,5 g g<sup>-1</sup> e 0,45 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Plessas *et al.* (2008) estudaram a fermentação do ALac com *Kluyveromyces marxianus* (levedura), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *L. helveticus*, a partir de soro de queijo, em culturas individuais e mistas, com e sem agitação. As co-culturas elevaram a produção do ALac em comparação às individuais e foram observados efeitos sinérgicos entre a levedura e as duas LABs. A partir de uma concentração de açúcar de 50-52 g L<sup>-1</sup>, o rendimento encontrado para a cultura mista foi de 0,47 g g<sup>-1</sup> e, a produtividade, 12,8 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Quando as cepas foram empregadas individualmente, o rendimento e produtividade para *K. marxianus* foram de 0,24 g g<sup>-1</sup> e 4,3 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>,

respectivamente; para *L. bulgaricus*, de 0,3 g g<sup>-1</sup> e 4 8 g L<sup>1</sup> dia<sup>-1</sup>; e para *L. helveticus*, de 0,23 g g<sup>-1</sup> e 5,1 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. As fermentações conduzidas de maneira estática apresentaram melhores resultados em relação àquelas com agitação.

Em contraste às LABs, alguns fungos filamentosos como *Rhizopus oryzae* podem converter eficientemente, e de maneira aeróbia, glicose a ALac, bem como distintas cepas, com genes modificados (QIN *et al.*, 2010; THONGCHUL, NAVANKASATTUSAS & YANG, 2010).

#### 2.2.2.2 Modos de fermentação láctica

A conversão das matérias-primas lignocelulósicas para a produção de ALac pode ocorrer de maneira convencional, com hidrólise e fermentação em separado (SHF) ou envolver estratégias de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Esta última não apenas reduz os custos de produção, mas também fornece mais alta produtividade a partir da liberação adequada dos açúcares (JOHN *et al.*, 2009). Entretanto, o sinergismo entre tal integração apenas pode ser atingido quando ambos os processos, hidrólise e fermentação, são compatíveis (KIM *et al.*, 2010).

O ALac é comumente produzido em batelada, batelada alimentada e batelada repetida, sendo que o primeiro incorre em inibição do crescimento celular devido à produção do produto de interesse, bem como à formação de inibidores ao final da fermentação (GAO *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2005). Nas culturas contínuas, as células são mantidas em condições estacionárias de crescimento. Sistemas de reciclagem celular com membranas, acoplados com culturas contínuas ou batelada repetida, demonstraram ser muito eficientes na produção de ALac (WEE & RYU, 2009; KIM *et al.*, 2006; WEE *et al.*, 2006; MIN-TIAN *et al.*, 2005; KWON *et al.*, 2001; TEJAYADI & CHERYAN, 1995).

Neste contexto, pretende-se desenvolver uma proposta de processo economicamente viável para a produção de ALac, em semi-micro escala, almejando possível aproveitamento da CA como matéria-prima de baixo custo e, paralelamente, contribuir para a inovação tecnológica e para a solução de problemas ambientais a partir da biorrefinaria – conceito estratégico para o futuro imediato.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Um fluxograma experimental deste trabalho é apresentado na Figura 7, enfatizando a rota bioquímica da biorrefinaria: aproveitamento da biomassa lignocelulósica por pré-tratamento físico-químico, previamente otimizado, em sistema hidrolítico ácido à pressão; *screening* do hidrolisado, seguido da determinação e quantificação dos sacarídeos de interesse e dos interferentes produzidos; otimização da fermentação láctica a partir dos açúcares fermentáveis da etapa anterior e, por fim, a determinação e quantificação do ALac. Com o diferencial de tudo ser conduzido em escala semi-micro, miniaturizado, em laboratório analítico-ambiental.

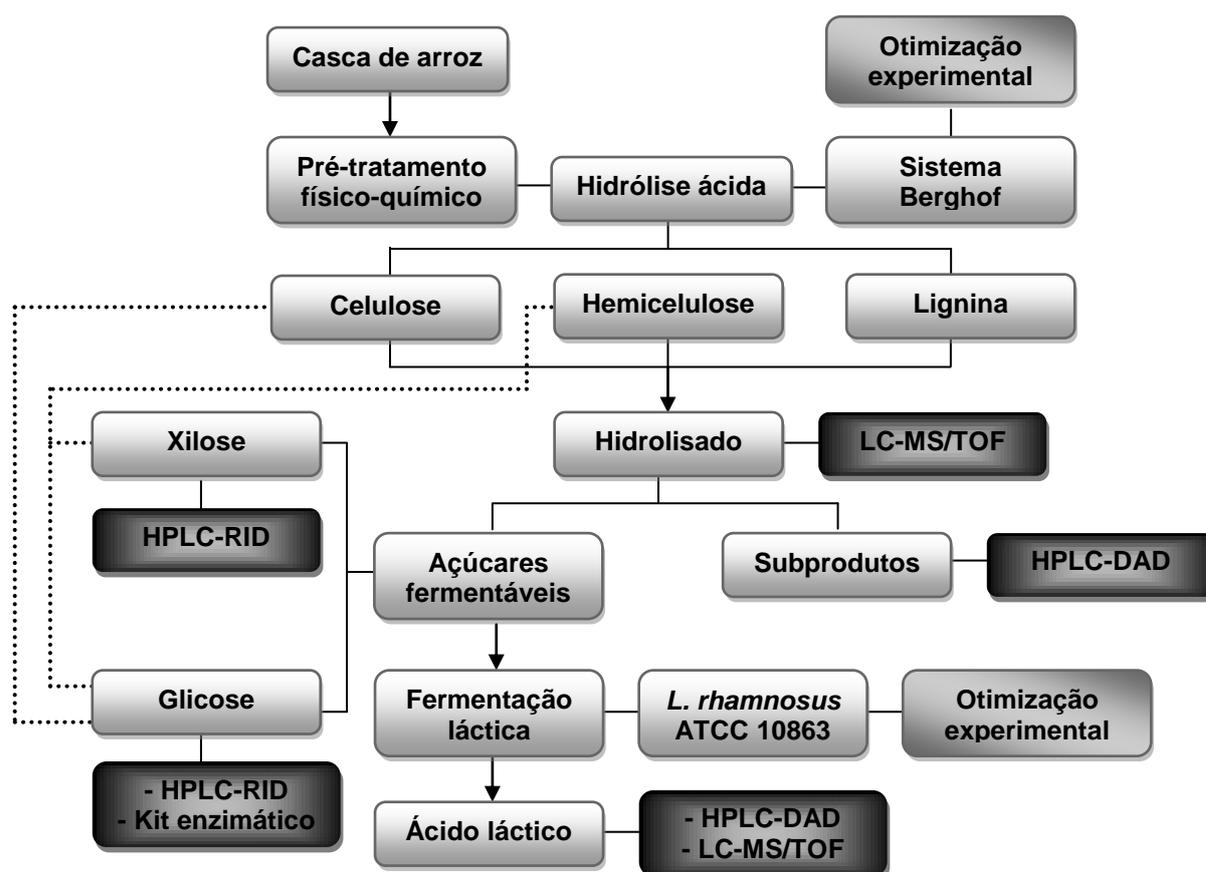


Figura 7 – Fluxograma experimental da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico ou P.A.: ácidos clorídrico, fórmico e sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha); ácido acético glacial e metanol (J.T.Baker, Xalostoc, México); ácido láctico (L+), A-D-glicose anidra, arabinose, xilose e 5-HMF (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha). As soluções injetadas nos cromatógrafos foram preparadas com água ultrapura (Millipore – Direct-Q 3, Billerica, MA, EUA).

### 3.1 Pré-tratamento da casca de arroz

A CA utilizada nos experimentos foi cedida graciosamente pela empresa beneficiadora J. Fighera, localizada em Santa Maria, RS. Inicialmente, a CA foi submetida a pré-tratamento físico, sendo cominuída em moinho analítico de facas (Marconi – TE048, Piracicaba, SP, Brasil), e, em seguida, as partículas da biomassa foram selecionadas em sistema de peneiras padronizadas, providas de agitação automática (Bertel, Laranjeiras Caieiras, SP, Brasil). As partículas de 48 Mesh (288-312  $\mu$ m de diâmetro) foram lavadas com água destilada até a obtenção de um filtrado incolor e secas em estufa (Ideal – Greenhouse 1.1, Arujá – SP, Brasil) a 50 °C, por 24 h (Figura 8).

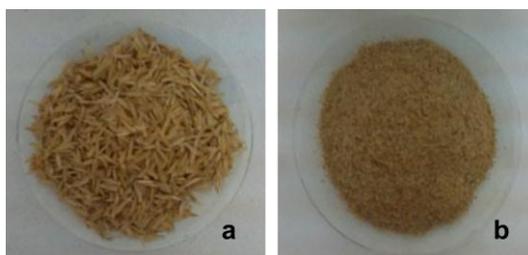


Figura 8 – Amostra de casca de arroz utilizada nos processos: a) *in natura*; b) cominuída.

### 3.2 Hidrólise ácida da casca de arroz

O processo hidrolítico ácido da CA ocorreu em sistema de abertura de amostras Berghof, à pressão (Berghof, Eningen, Alemanha). Para tanto, colocou-se 1,0 g de CA previamente tratada em vaso de teflon com capacidade de 250 mL, acrescido de 10 mL de catalisador ácido diluído (BEVILAQUA, 2010), sendo que as soluções iniciais de HCl (37%) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) foram consideradas 100% concentradas. O recipiente, fechado hermeticamente, foi acondicionado em morteiro de aço inox e posicionado em sistema de aquecimento, conforme evidenciado na Figura 9.



Figura 9 – Sistema Berghof empregado na hidrólise ácida da casca de arroz. Componentes: 1) vaso de teflon; 2) morteiro de aço inox; 3) sistema de aquecimento/resfriamento; 4) controlador de temperatura.

A pressão ( $P$ ) exercida no interior do vaso de teflon foi calculada através da equação para gases reais (Equação 1),

$$\left[ P + a \left( \frac{n}{V} \right)^2 \right] (V - nb) = nRT \quad (1)$$

onde  $n$  é o número de mols,  $V$  é o volume do recipiente (L),  $R$  é a constante dos gases ( $0,0082 \text{ L atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura (K). As constantes de Van der Waals  $a$  ( $5,464 \text{ L}^2 \text{ atm mol}^{-2}$ ) e  $b$  ( $0,03043 \text{ L mol}^{-1}$ ) são correções para a equação dos gases reais, sendo parâmetros ajustáveis característicos de cada gás, neste caso estabelecidos para o vapor d'água. A constante  $a$  está relacionada com as forças de atração intermoleculares, enquanto a constante  $b$  está relacionada com o volume molecular.

Decorrido o tempo de hidrólise ácida, as amostras foram passadas em filtro qualitativo de celulose ( $26 \mu\text{m}$ ) e armazenadas a  $4\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro, para posterior análise dos produtos e subprodutos formados.

### 3.2.1 Otimização do processo hidrolítico

Foram avaliadas estratégias de delineamento experimental visando maior liberação de glicose, baseado em valores ótimos de distintas variáveis independentes do processo. Dentre os fatores estudados encontram-se: concentração de ácido HCl ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $1,0\text{-}7,0\% \text{ v v}^{-1}$ ); tempo ( $30\text{-}110 \text{ min}$ ) e temperatura ( $135\text{-}185 \text{ }^\circ\text{C}$ ), sendo que as pressões variaram de  $44,4$  a  $60,8 \text{ atm}$ . Para tanto, fez-se um planejamento completo – delineamento composto central rotacional (DCCR) – para as três variáveis independentes, com 8 combinações possíveis para os 2 níveis estudados ( $2^3$ ), acrescidas dos 6 ensaios axiais e de 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 2. Os resultados foram avaliados com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

Tabela 2 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento da glicose.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração de ácido ( $\% \text{ v v}^{-1}$ )	1,0	2,21	4,0	5,79	7,0
Tempo (min)	30	46,19	70	93,81	110
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	135	145,12	160	174,88	185

### 3.2.2 Tratamento do hidrolisado

A partir dos resultados do planejamento experimental do hidrolisado, selecionou-se o experimento que apresentou maior liberação de açúcares para ser utilizado no processo fermentativo. Cada batelada do processo hidrolítico rendeu aproximadamente 6,0 mL, sendo necessário fazer várias hidrólises para acumular um volume suficiente à etapa fermentativa. Com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos advindos da etapa hidrolítica, e que atuam como inibidores na fermentação, este hidrolisado foi previamente tratado adicionando-se 2,5% ( $m v^{-1}$ ) de carvão ativo (Synth, Diadema, SP, Brasil), sendo incubado a 50 °C, por 1 h, a 400 rpm (IKA – C-MAG HS 7 S32, Staufen, Alemanha) (RAMBO, 2009). Em seguida, a solução foi passada em filtro qualitativo de celulose (26  $\mu m$ ) e, após, filtrada a vácuo com membrana filtrante de nitrato de celulose (47 mm x 0,45  $\mu m$ ). O pH dos hidrolisados ácidos foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 6M (PHTEC – PHS-3B, Americana, SP, Brasil) e estocados a 4-8 °C, no escuro, até a sua utilização.

### 3.3 Manutenção e inóculo de *Lactobacillus rhamnosus*

O micro-organismo empregado no experimento foi *L. rhamnosus* ATCC 10863, bactéria anaeróbia facultativa, homofermentativa, produtora de L(+)-ALac, procedente da Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello. A cultura liofilizada foi reativada conforme metodologia pré-estabelecida e, após, mantida e repicada em meio comercial Mann, Rogosa & Sharpe – MRS (HIMEDIA, Mumbai, Índia), previamente autoclavado, sendo incubada em estufa com controlador digital de temperatura a 37 °C, por 24 h, pH entre 6,2 e 6,5. O meio MRS é composto por ( $g L^{-1}$ ): peptona (10,0); extrato de carne (10,0); extrato de levedura (5,0); glicose (20,0); polissorbato 80 (1,0); citrato de amônio (2,0); acetato de sódio (5,0); sulfato de magnésio (0,10); sulfato de manganês (0,05) e fosfato dipotássico (2,0). O volume de inóculo fez 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados nos experimentos. A concentração celular foi determinada pelo método de contagem padrão em placas, resultando em  $7,1 \times 10^7$  UFC  $mL^{-1}$ . O crescimento do micro-

organismo ( $1:10 \text{ v } \text{v}^{-1}$ ) foi avaliado por um período de 60 h e, a absorbância, determinada a 620 nm em espectrofotômetro (Shimadzu – UV-1800, Quioto, Japão) empregando o *software* UVProbe.

Como os experimentos foram desenvolvidos em um laboratório de química analítica, confeccionou-se uma *glovebox* (caixa-de-luvas) contendo duas lâmpadas germicidas para a esterilização do ambiente e aberturas nas laterais para a entrada/saída de um fluxo de gás nitrogênio (Figura 10). Com esta medida, foi possível o manuseio adequado da bactéria láctica, mesmo em ambiente não-adequado para procedimentos microbiológicos.



Figura 10 – Caixa-de-luvas empregada na manipulação do micro-organismo: 1) lâmpada germicida; 2) fluxo de  $\text{N}_2$ .

### 3.4 Fermentação láctica a partir da casca de arroz

De maneira a priorizar a miniaturização dos procedimentos, fez-se a etapa fermentativa em vials de 4 mL, contendo 3 mL de hidrolisado da CA (Figura 11), a 37 °C, em pH inicial de 6,0. O tempo de cultivo total foi de 168 h, retirando-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  a cada 12 h para monitoramento da produção de ALac.



Figura 11 – Processo fermentativo em semi-micro escala.

### 3.4.1 Otimização do processo fermentativo

Com o intuito de determinar a produção máxima de L(+) ALac através de *L. rhamnosus*, via fermentação, empregando a CA como substrato alternativo, planejou-se um delineamento experimental baseado em valores pré-estabelecidos das variáveis independentes do processo (ver Apêndice A). Os fatores estudados foram os seguintes: extrato de levedura (Acumedia, Lansing, MI, EUA) ( $2,5-17,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e polissorbato 80 (Synth, Diadema, SP, Brasil) ( $0,1-1,9 \text{ g L}^{-1}$ ). Para tanto, optou-se por um DCCR para as duas variáveis independentes com 4 combinações possíveis para os 2 níveis estudados ( $2^2$ ), acrescidas dos 4 ensaios axiais e de 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 3. Os resultados foram avaliados através do *software* Statistica 7.0.

A partir dos resultados do planejamento experimental do fermentado, selecionou-se o experimento que apresentou maior rendimento de ALac e refez-se tal fermentação, em duplicata. O tempo de cultivo foi de 60 h, retirando-se alíquotas de  $50 \mu\text{L}$  a cada 4 h para acompanhamento do crescimento celular em hidrolisados ácidos ( $1:10 \text{ v v}^{-1}$ ), determinando-se a absorbância em 620 nm, como descrito no item 3.3, e monitorando-se o consumo de açúcares e a produção de ALac.

Tabela 3 – Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a determinação do rendimento do ácido láctico.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	2,5	4,68	10	15,32	17,5
Polissorbato 80 (g L <sup>-1</sup> )	0,125	0,38	1	1,62	1,875

### 3.5 Métodos analíticos

#### 3.5.1 Determinação de glicose, xilose e arabinose por HPLC-RID

A concentração dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) produzidos no processo hidrolítico ácido da CA, bem como o consumo destes por *L. rhamnosus* durante a etapa fermentativa, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RID). O sistema cromatográfico empregado foi (Dionex Softron, Germering, Alemanha), equipado com bomba quaternária LPG 3.400 SD, desgaseificador SRD 3.200, amostrador automático WPS-3.000 TSL, forno para coluna TCC 3.000 SD, detector de índice de refração RI-101 Shodex - Showa Denko KK e *software* Chromeleon 6.8. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 4. Para tanto, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10 v v<sup>-1</sup>) e, após, passadas em filtro para seringa com membrana politetrafluoretileno (PTFE 13 mm x 0,22 µm).

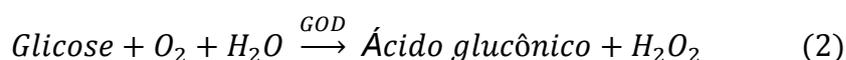
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação de glicose, xilose e arabinose.

Condições cromatográficas <sup>1</sup>	
	Açúcares
Coluna	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm)
Temperatura	50 °C
Fase móvel	Água ultrapura contendo 5 mM de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Vazão	0,6 mL min <sup>-1</sup>
Eluição	Isocrático
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	8,6 min (glicose), 9,2 min (xilose) e 10,1 min (arabinose)

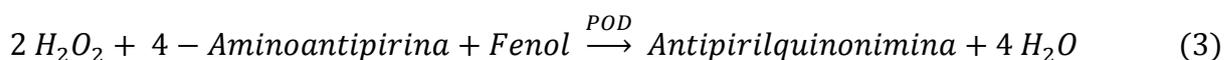
<sup>1</sup> Segundo Jeon, Xun & Rogers, 2010.

### 3.5.2 Determinação da glicose por método enzimático

A análise da glicose também foi efetuada mediante emprego de método enzimático com o kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), para fins de comparação. O princípio deste sistema consiste na oxidação da glicose, catalisada pela glicose oxidase (GOD), formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (Equação 2).



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra (Equação 3).



Para o procedimento analítico, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de amostra em 2 mL do reagente enzimático, sendo a solução resultante incubada em banho-maria a 37  $^\circ\text{C}$ , por 15 min, juntamente com o padrão e o branco. A absorbância do teste foi determinada a 505 nm, como descrito no item 3.3.

A concentração da glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) foi determinada através da razão entre a absorbância do teste e a absorbância do padrão (Equação 4).

$$\text{Glicose } (\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \quad (4)$$

O resultado da medição é linear até 5  $\text{g L}^{-1}$ . Quando se obteve valor igual ou superior a este, a amostra foi diluída com NaCl 0,15  $\text{mol L}^{-1}$ , medida novamente e o resultado foi multiplicado pelo fator de diluição. A verificação da linearidade metodológica e fotométrica foi feita periodicamente.

### 3.5.3 Análise de ácido láctico, ácido acético e 5-HMF

As concentrações de ALac presentes no fermentado, bem como as concentrações de ácido acético e 5-HMF no hidrolisado foram determinadas e quantificadas via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Para tanto, foi empregado um sistema (Shimadzu, Quioto, Japão) constituído por uma bomba quaternária LC-20AT, desgaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, amostrador automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e o *software* LC Solution. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 5. O preparo das amostras consistiu apenas na diluição destas em água ultrapura (1:10 v v<sup>-1</sup>) e, após, passadas em filtro para seringa com membrana em ester celulose (MCE 33 mm x 0,45 µm).

Tabela 5 – Condições cromatográficas utilizadas na determinação de ácido láctico, ácido acético e 5-HMF.

<b>Condições cromatográficas</b>			
	<b>ALac</b>	<b>Ácido Acético</b>	<b>5-HMF</b>
Coluna	Mediterranea sea 18 (150 mm x 40 mm, Φ = 3 µm)		
Fase aquosa	Água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico <sup>2</sup>		
Fase orgânica (2%)	Metanol contendo 1% de ácido fórmico	-	-
Vazão	0,4 mL min <sup>-1</sup>	0,4 mL min <sup>-1</sup>	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Eluição	Gradiente	Isocrático	Isocrático
Volume de injeção	20 µL	20 µL	20 µL
Detecção (λ)	210 nm	210 nm	210 nm
Tempo de retenção	5,5 min	5,8 min	20,7 min

<sup>2</sup> Segundo Quirós, Lage-Yusty & López-Hernández, 2009.

### 3.5.4 Análise dos hidrolisados por LC-MS/TOF

Os distintos compostos presentes, tanto nos hidrolisados quanto nos fermentados, pertencentes aos tratamentos contendo os maiores teores de açúcares, foram investigados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo-de-vôo (LC-MS/TOF) (Waters – Xevo G2 QTof, Milford, MA,

EUA). As amostras foram previamente diluídas em água ultrapura (1:1000  $v v^{-1}$ ), passadas em filtro para seringa com membrana PTFE (13 mm x 0,22  $\mu\text{m}$ ) e, então, diluídas em metanol (1:1  $v v^{-1}$ ). O sistema operacional consistiu em fonte de ionização *electrospray* operando, em modos positivo e negativo, nas seguintes condições: tensão do capilar de 3 kV (positivo) e 2,5 kV (negativo); tensão do cone de amostragem de 40 kV (positivo) e 35 kV (negativo); tensão do cone de extração de 4 kV; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação de 350 °C; fluxo dos gases no cone de 50 L h<sup>-1</sup> e fluxo dos gases de dessolvatação de 800 L h<sup>-1</sup>. Foi utilizada infusão direta da amostra (10  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) para estudo e obtenção dos dados.

### 3.6 Cálculos de rendimento e produtividade

Após a determinação das concentrações de glicose ( $C_{Gli}$ ), o rendimento ( $R_{Gli}$ ) foi calculado a partir da quantidade de glicose produzida (g) pela quantidade de CA utilizada (g) (Equação 5). Os cálculos de rendimento do ALac ( $R_{ALac}$ ) envolveram a razão entre a quantidade de ALac produzido (g) e a quantidade de glicose utilizada (g) e a produtividade do ALac ( $P_{ALac}$ ) foi calculada a partir da concentração de ALac ( $C_{ALac}$ ) produzido (g L<sup>-1</sup>) pelo tempo (h), conforme as equações 6 e 7, respectivamente.

$$R_{Gli} = \frac{mg \text{ glicose}}{g \text{ CA}} \quad (5)$$

$$R_{ALac} = \frac{mg \text{ ALac}}{g \text{ açúcares}} \quad (6)$$

$$P_{ALac} = \frac{g \text{ ALac}}{L \text{ h}} \quad (7)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Hidrólise ácida da casca de arroz

#### 4.1.1 Determinação dos analitos por métodos cromatográficos

As condições cromatográficas foram otimizadas, previamente aos processos hidrolítico e fermentativo, com o intuito de obter-se a melhor resolução. Para assegurar o elevado desempenho do método analítico, a faixa linear da curva de calibração, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), bem como os limites de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente) foram estabelecidos como parâmetros confiáveis e interpretáveis para cada um dos analitos estudados nas respectivas amostras. O LD fundamenta-se na relação sinal/ruído (S/N)  $\geq 3,0$ , enquanto que o LQ, na relação S/N  $\geq 10$  (INMETRO, 2010).

O método de determinação dos açúcares por HPCL-RID foi desenvolvido com o auxílio das soluções-padrão de glicose, xilose e arabinose (seção 3.5.1), enquanto que o método de determinação dos subprodutos por HPLC-DAD foi feito com soluções-padrão de ácido acético e 5-HMF (seção 3.5.3). As figuras-de-mérito obtidas para os açúcares e para os subprodutos estão expostas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os  $r^2$  obtidos para as curvas de calibração na faixa linear de trabalho evidenciam linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação dos analitos, pertencentes à complexa matriz hidrolítica, pelo método de padrão externo.

Tabela 6 – Figuras-de-mérito para a determinação dos açúcares.

Analitos	Faixa linear (g L <sup>-1</sup> )	Equação da reta	$r^2$	LD (g L <sup>-1</sup> )	LQ (g L <sup>-1</sup> )
Glicose	0,25-2,0	$y = 3,954767x - 0,002313$	0,999996	0,01	0,033
Xilose		$y = 4,646936x + 0,000203$	0,999998		
Arabinose		$y = 4,698889x - 0,006542$	0,999997		

Tabela 7 – Figuras-de-mérito para a determinação dos subprodutos.

Analitos	Faixa linear (g L <sup>-1</sup> )	Equação da reta	r <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Acético	0,01-2,0	$y = 1.565,536x + 22.943$	0,999995	0,1	0,33
5-HMF		$y = 35.776.425x - 1.293.161$	0,993935	1	3,33

#### 4.1.2 Otimização da hidrólise ácida

Para o processo hidrolítico foram desenvolvidas estratégias de planejamento – um envolvendo a hidrólise com HCl e outro envolvendo a hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – explorando todo o espaço amostral, com um número reduzido de medidas, visando analisar o sinergismo entre as variáveis independentes do processo e suas influências na produção da glicose. Os fatores analisados nas hidrólises ácidas diluídas, conforme descrito na seção 3.2.1, foram: concentração de ácido (1,0-7,0% *v v*<sup>-1</sup>), tempo (30-110 min) e temperatura (135-185 °C). Na Tabela 8 encontram-se os valores codificados dos ensaios experimentais. Os valores referentes a este DCCR correspondem às respostas da glicose analisadas via HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 8, as concentrações de glicose variaram de 0-17,77 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0-106,63 mg glicose g<sup>-1</sup> CA (ou 0-10,6% *m m*<sup>-1</sup>) para o HCl; e de 0-14,08 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0-84,47 mg glicose g<sup>-1</sup> CA (ou 0-8,45% *m m*<sup>-1</sup>) para o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conforme as circunstâncias do DCCR, demonstrando a influência das variáveis independentes na resposta final. A exigência dos três pontos centrais para a resposta desejada indica a reprodutibilidade do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Através do planejamento projetado, percebe-se que reações contendo 2,2% (*v v*<sup>-1</sup>) de ácido e incubadas a 175 °C por 46 min (experimentos 5) apresentaram concentrações superiores de glicose: 17,77 g L<sup>-1</sup> ( $\bar{u} = 3$ ,  $\sigma = 1,1$ ), indicando um rendimento de 106,63 mg glicose g<sup>-1</sup> CA (ou 10,6% *m m*<sup>-1</sup>) em hidrolisados com HCl; e 14,08 g L<sup>-1</sup> ( $\bar{u} = 3$ ,  $\sigma = 0,7$ ), indicando um rendimento de 84,47 mg glicose g<sup>-1</sup> CA (ou 8,45% *m m*<sup>-1</sup>) em hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os experimentos 8 retratam a degradação completa da glicose quando reações a 175 °C com duração de 94 min interagem com ambos os ácidos a uma concentração de 5,8 % (*v v*<sup>-1</sup>). Ademais, os experimentos 14 evidenciam a degradação da glicose quando reações hidrolíticas

são feitas em temperaturas impactantes de 185 °C. De fato, a eficiência dos processos de pré-tratamento é resultante do sinergismo entre acidez do meio, tempo e temperatura. O conceito que pode relacionar tais fatores é denominado *grau de severidade*, sendo empregado como parâmetro por muitos pesquisadores. Basicamente, há um grau de severidade ótimo, acima do qual será menor a eficiência de hidrólise, pois maior será a degradação dos açúcares e a formação de outros inibidores (Mc MILLAN, 1994).

Tabela 8 – Resultados do delineamento composto central rotacional para a resposta da glicose.

Experimentos	HCl ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Temperatura (°C)	HCl		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
				C <sub>Gli</sub> <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	R <sub>Gli</sub> <sup>4</sup> (mg g <sup>-1</sup> CA)	C <sub>Gli</sub> <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	R <sub>Gli</sub> <sup>4</sup> (mg g <sup>-1</sup> CA)
1	-1	-1	-1	3,64	21,86	2,88	17,26
2	1	-1	-1	4,65	27,88	4,96	29,77
3	-1	1	-1	5,21	31,28	4,90	29,42
4	1	1	-1	11,61	69,69	10,93	65,59
5	-1	-1	1	17,77	106,63	14,08	84,47
6	1	-1	1	4,57	27,45	1,23	7,39
7	-1	1	1	9,07	54,40	7,03	42,18
8	1	1	1	0	0	0	0
9	-1,68	0	0	5,29	31,75	5,90	35,42
10	1,68	0	0	12,44	74,65	6,06	36,38
11	0	-1,68	0	8,13	48,79	7,42	44,54
12	0	1,68	0	14,17	85,03	11,12	66,70
13	0	0	-1,68	3,60	21,62	3,08	18,51
14	0	0	1,68	0	0	0	0
15	0	0	0	14,14	84,85	12,63	75,80
16	0	0	0	15,06	90,37	12,28	73,66
17	0	0	0	14,86	89,16	13,40	80,41

<sup>3</sup> Concentração de Glicose (C<sub>Gli</sub>); <sup>4</sup> Rendimento de Glicose (R<sub>Gli</sub>) (mg glicose g<sup>-1</sup> CA).

Posteriormente, a matriz contida na Tabela 8 foi processada com auxílio do *software* Statistica 7.0 e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% (p<0,05). As equações 8 e 9, representando os tratamentos com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente, descrevem as concentrações de glicose previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes (*t* correspondendo ao tempo e *T* à temperatura), contendo apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos. O resultado da análise de variância (ANOVA) para os ácidos estudados está apresentado na Tabela 9.

$$\text{Glicose (g L}^{-1}\text{)} = 14,670 - 4,507 T^2 - 3,709 \text{ HCl} * T \quad (8)$$

$$\text{Glicose (g L}^{-1}\text{)} = 12,731 - 2,27 [\text{H}_2\text{SO}_4]^2 - 1,106 t^2 - 3,843 T^2 - 3,499 \text{ H}_2\text{SO}_4 * T - 2,035 t * T \quad (9)$$

Tabela 9 – Análise de variância para o parâmetro glicose.

Tratamento	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F <sub>calculado</sub>
HCl <sup>5</sup>	Regressão	418,78	2	209,39	35,01
	Resíduos	83,80	14	5,98	
	Total	502,58	16		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>6</sup>	Regressão	341,4	5	68,28	47,09
	Resíduos	16,01	11	1,45	
	Total	357,41	16		

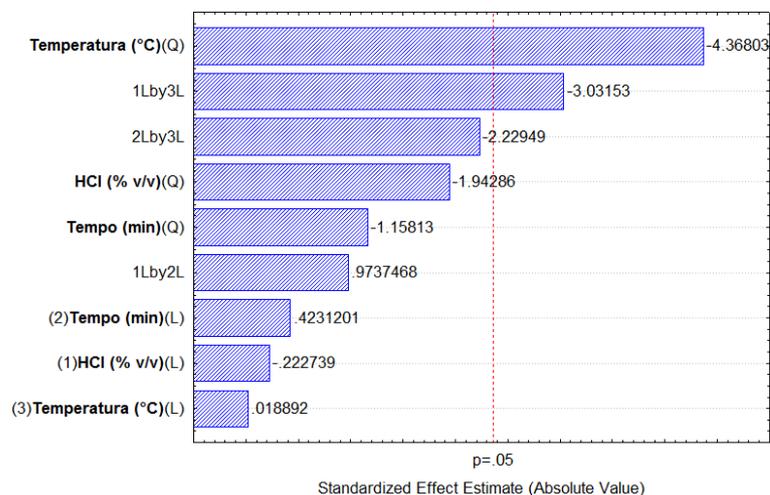
<sup>5</sup>  $r^2 = 83,3\%$  e  $F_{2, 14; 0,05} = 3,74$ ; <sup>6</sup>  $r^2 = 95,5\%$  e  $F_{5, 11; 0,05} = 3,20$ .

A ANOVA da Tabela 9 revela que os modelos que descrevem as respostas das concentrações de glicose em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, são considerados adequados. Os valores do  $r^2$  assegura que 83,3% (HCl) e 95,5% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático, sendo que o F calculado foi significativo ( $p < 0,05$ ). Aproximadamente nove vezes superior ao valor do F tabelado, no caso do HCl; e quinze vezes superior, no caso do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o que satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno.

Os diagramas de Pareto para os tratamentos com HCl e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 12) evidenciam os valores do teste  $t$  para cada uma das variáveis independentes – concentração de ácido (%  $v v^{-1}$ ), tempo (min) e temperatura (°C) – bem como as suas interações. Para o caso do hidrolisado com HCl, dentre os fatores estudados, somente a temperatura (quadrática) e a interação entre esta e a concentração de ácido apresentaram efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) (Figura 12, a). Já para o hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os três parâmetros avaliados (quadráticos), bem como as interações entre tempo e temperatura e entre concentração de ácido e temperatura, foram significativos no estudo dos efeitos (Figura 12, b). De modo

geral, para os dois ácidos em questão, há um decréscimo no rendimento da glicose quando tais variáveis migram do nível -1,68 ao nível 1,68.

(a)



(b)

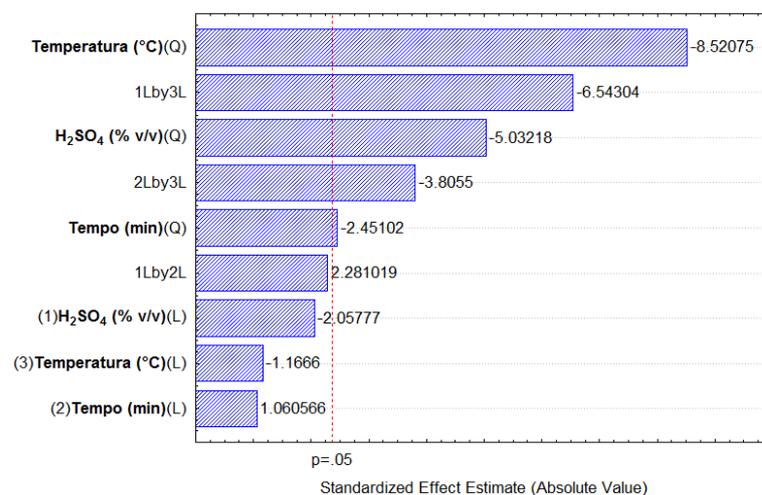


Figura 12 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional envolvendo HCl (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) e tendo como variável resposta a concentração de glicose.

As representações gráficas das respostas, dispostas nas Figuras 13 e 14, relativas às investigações da produção de glicose, auxiliam na visualização dos resultados.

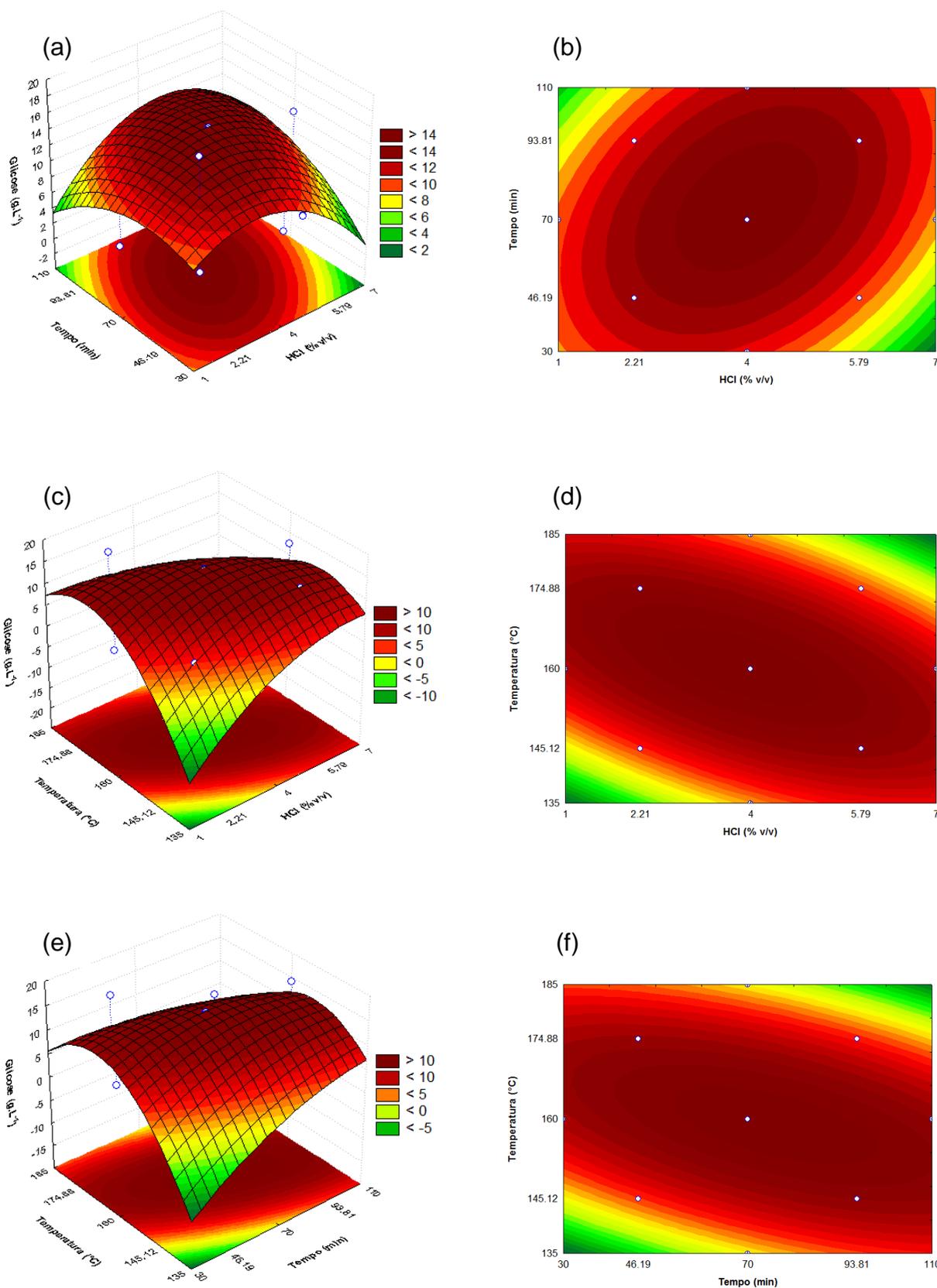


Figura 13 – Superfícies de resposta (esq.) e curvas de contorno (dir.) para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) envolvendo tratamentos com HCl em função da concentração de ácido x tempo (a) e (b), concentração de ácido x temperatura (c) e (d) e tempo x temperatura (e) e (f).

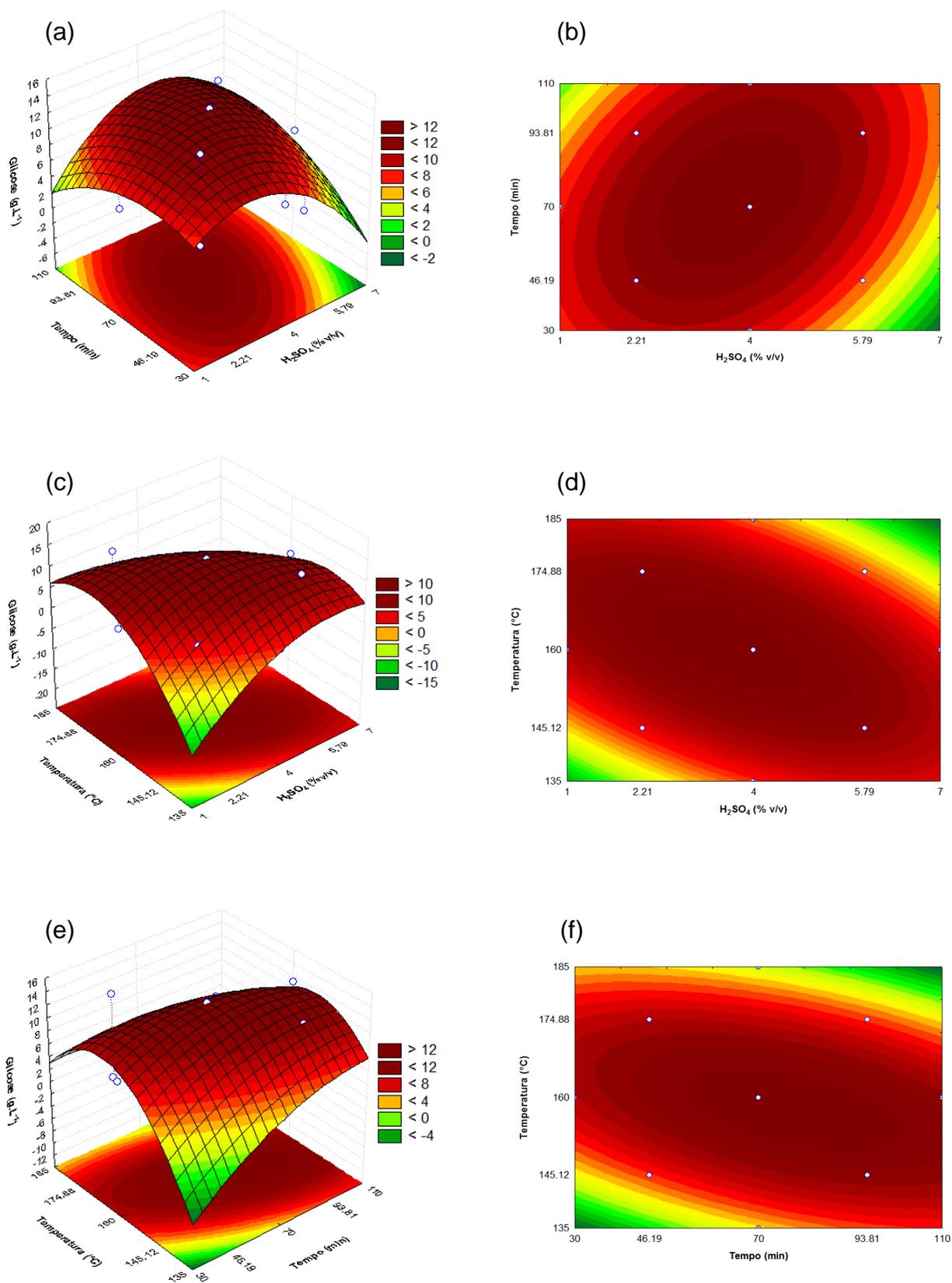


Figura 14 – Superfícies de resposta (esq.) e curvas de contorno (dir.) para a concentração de glicose (g L<sup>-1</sup>) envolvendo tratamentos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em função da concentração de ácido x tempo (a) e (b), concentração de ácido x temperatura (c) e (d) e tempo x temperatura (e) e (f).

Resumidamente, constata-se que ambos os ácidos empregados no processo hidrolítico apresentaram comportamentos semelhantes no rendimento da glicose. Ademais, para todas as variáveis, as regiões compreendendo os níveis intermediários, ditas otimizadas, circundadas pelos pontos centrais, estão relacionadas a maior produtividade de glicose. Dessa maneira, os níveis extremos que compõem o planejamento foram responsáveis por uma produção inferior.

As Figuras 13 e 14 (a) e (b) demonstram que na interação entre concentração de ácido diluído e tempo de hidrólise, as faixas ótimas referente às concentrações de ácidos empregadas foram de 2,2-5,8% ( $v v^{-1}$ ) para HCl e 2,2-4,0% ( $v v^{-1}$ ) para  $H_2SO_4$ , enquanto o tempo reacional foi de 46-110 min para os dois catalisadores. Conforme previsto, ao se fixar a temperatura no intervalo considerado ótimo (mediano), percebem-se rendimentos elevados na produção de glicose. As superfícies de resposta e curvas de contorno indicam regiões em que a concentração da glicose é superior a  $14 g L^{-1}$  e  $12 g L^{-1}$ , para HCl e  $H_2SO_4$ , respectivamente. Os resultados das atuações entre concentração de ácido diluído e temperatura, que constam nas Figuras 13 e 14 (c) e (d), mostram que os intervalos considerados ideais para a primeira variável situam-se de 2,2-5,8% ( $v v^{-1}$ ), enquanto que para a segunda variável os intervalos foram de 160-175 °C para ambos os ácidos estudados. Já a interação entre tempo e temperatura das Figuras 13 e 14 (e) e (f), as faixas desejadas referentes ao tempo de hidrólise concentram-se de 46-110 min, enquanto a temperatura foi de 160-175 °C.

De modo geral, o planejamento experimental visando a máxima produção de glicose, via hidrólise ácida a pressão, revelou-se mais eficiente nos processos envolvendo HCl. O  $H_2SO_4$  é um ácido mais forte e mais fixo em comparação ao HCl, necessitando condições um pouco mais brandas (menores concentrações, tempo reacional e/ou temperatura) para liberar a glicose contida no interior da estrutura lignocelulósica, uma vez que, provavelmente, parte da glicose produzida inicialmente tenha degradado e resultado em subprodutos hidrolíticos.

A análise dos valores das variáveis independentes que maximizam a produção de glicose foi feita através da função de desejabilidade. Tal técnica de otimização simultânea foi introduzida por Derringer & Suich (1980) e consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas ou, então, as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-lineares.

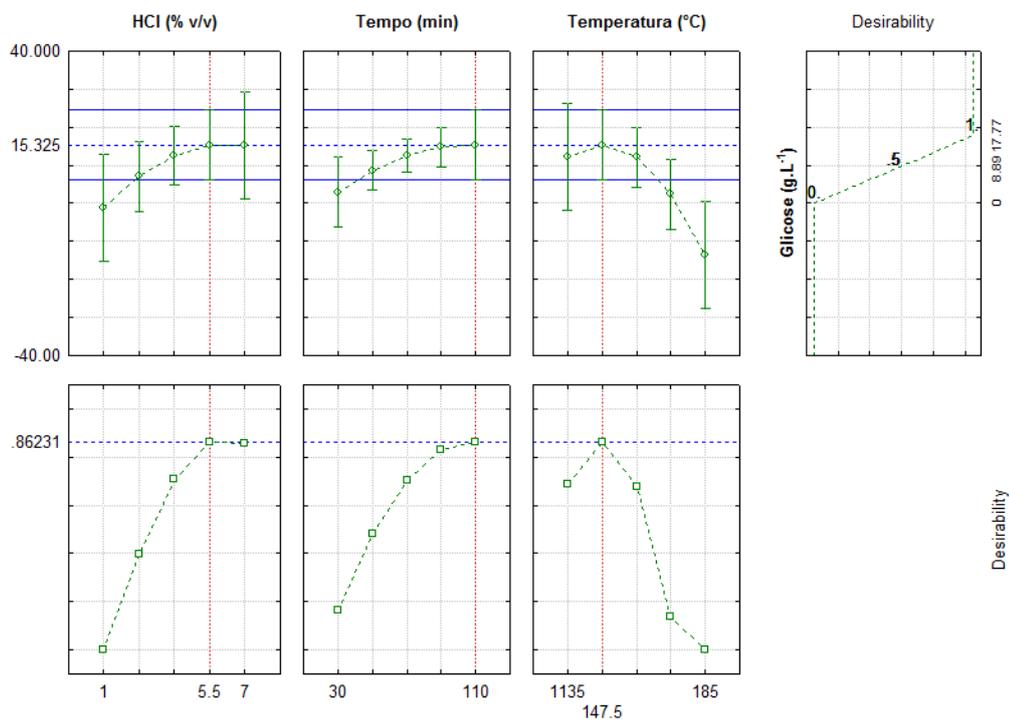
Inicialmente, essa função converte cada resposta em uma função individual de desejabilidade  $d_i$  que varia de  $0 \leq d_i \leq 1$ . Se a resposta for o valor mais desejável,  $d_i = 1$ , caso contrário,  $d_i = 0$  e a resposta está fora da região aceitável. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global ( $D$ ), que representa a média geométrica das  $n$  desejabilidades individuais, conforme a equação 10 (BERTELLI *et al.*, 2008):

$$(d_1 * d_2 * \dots * d_n)^{1/n} \quad (10)$$

A Figura 15 evidencia os gráficos dos perfis dos valores otimizados, as funções de desejabilidade e os valores otimizados das três variáveis independentes.

Verifica-se que os três primeiros perfis são relativos à resposta da glicose com cada uma das variáveis independentes, mantendo-se fixas as demais nos pontos centrais. O quarto perfil mostra a desejabilidade da produção de glicose, ou seja, a faixa da resposta de desejabilidade aceitável ( $0 \leq d_i \leq 1$ ), sendo que o valor 0 diz respeito à mínima produção de glicose ( $0 \text{ g L}^{-1}$ , para ambos os ácidos) e o valor 1 corresponde à máxima produção de glicose, ou seja,  $17,77 \text{ g L}^{-1}$  para experimento envolvendo hidrólise com HCl (a) e  $14,08 \text{ g L}^{-1}$  para experimento envolvendo hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b). Quanto maior o valor da desejabilidade, mais conveniente é a resposta do sistema, isto é, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo da desejabilidade é a condição otimizada do sistema. Os três últimos perfis mostram a  $d_i$  para cada fator e a  $D$  igual a 0,86 para a hidrólise com HCl (a) e 0,91 para a hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b). As linhas verticais em vermelho nos gráficos correspondem aos valores ótimos dos parâmetros estudados. Assim, a função da  $D$  permitiu obter os valores ótimos dos parâmetros experimentais do DCCR: concentração de ácido de 5,5% ( $\text{v v}^{-1}$ ), tempo de 110 min e temperatura de 147,5 °C.

(a)



(b)

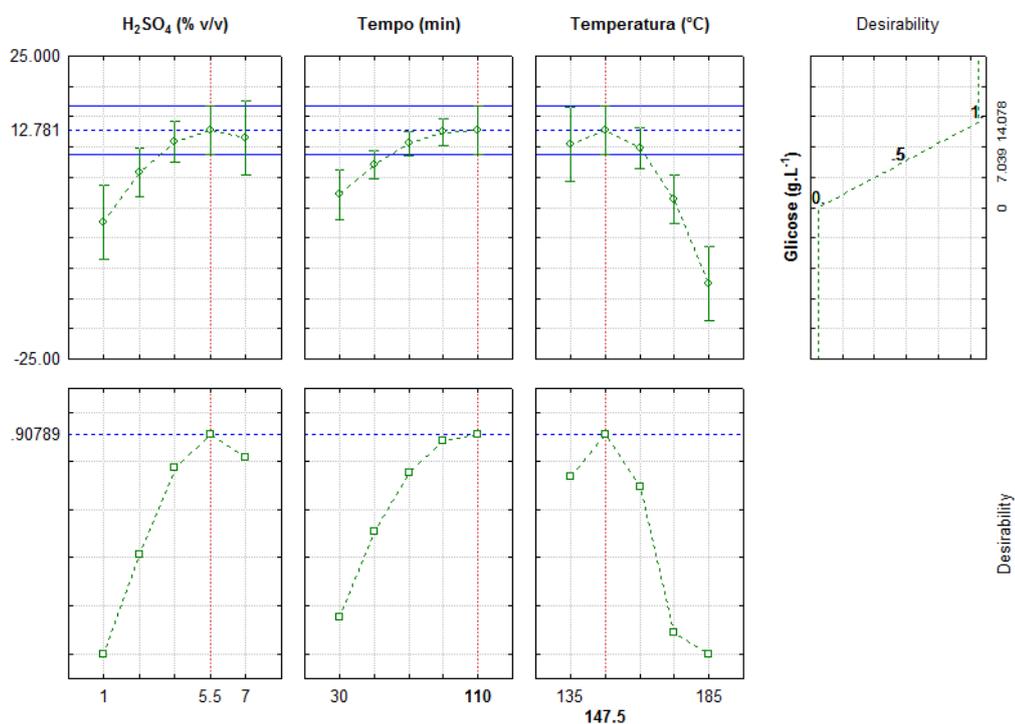


Figura 15 – Perfis de desejabilidades em termos das variáveis codificadas para a eficiência da produção de glicose via processo hidrolítico empregando HCl (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b).

Apesar do ensaio hidrolítico acima integrar a região otimizada e apresentar resultados satisfatórios tanto para os tratamentos com HCl quanto para os tratamentos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para o processo de fermentação posterior optou-se em empregar os hidrolisados pertencentes aos experimentos n° 5. Nestes ensaios, as concentrações dos ácidos foram mais amenas, empregando-se menos que a metade dos reagentes em questão (2,2% ao invés de 5,5% v v<sup>-1</sup>) e o tempo de reação foi inferior (46 min e não 110 min), mesmo que a temperatura de reação tenha sido aproximadamente 27 °C superior (175 °C ao invés de 147,5 °C).

#### 4.1.3 Análise de glicose via método enzimático *versus* HPLC-RID

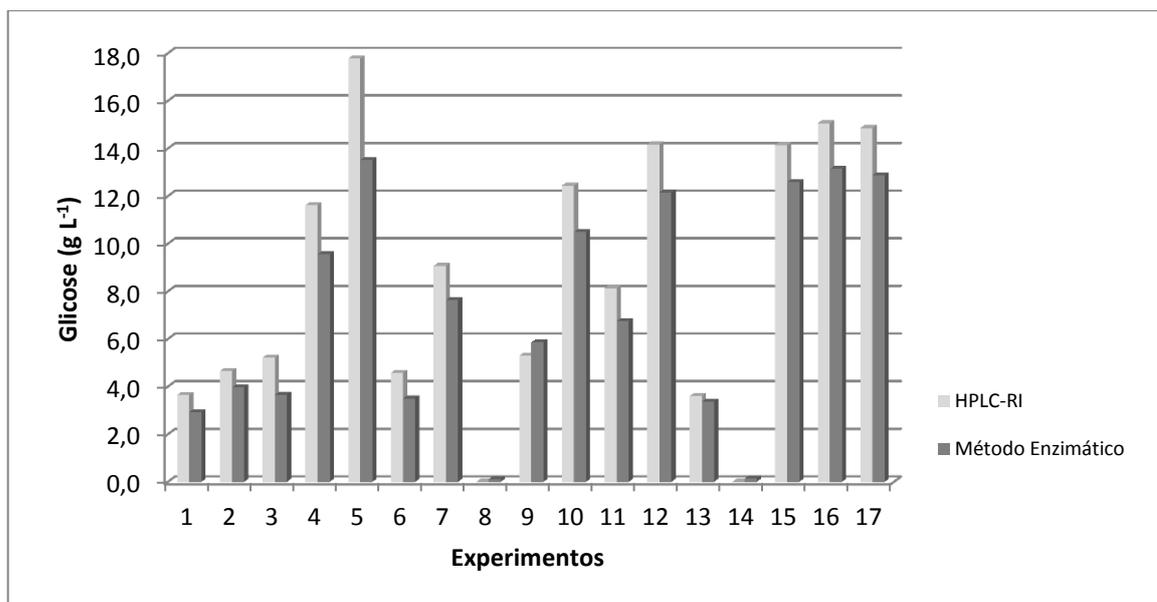
Para fins de comparação, a quantificação da glicose proveniente dos DCCRs das hidrólises ácidas diluídas com HCl e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi feita tanto por HPLC-RID quanto por método enzimático alternativo.

Para tanto, as amostras hidrolisadas foram injetadas em equipamento de HPLC-RID, conforme consta na seção 3.5.1, caracterizado pela elevada sensibilidade e estabilidade, fornecendo, assim, resultados de alta resolução, com grande confiabilidade e rapidez na quantificação dos açúcares. Entretanto, o elevado custo da instrumentação dos métodos cromatográficos limita a adoção de tais técnicas (JARDIM, COLLINS & GUIMARÃES, 2006).

Alternativamente, os mesmos hidrolisados concentrados foram submetidos à metodologia enzimática pelo método de ponto final, seção 3.5.2, caso em que o reagente é apresentado pronto para uso, caracterizando-se por ser um método simples, prático, relativamente estável e pouco dispendioso, além da grande especificidade analítica. A quantificação da glicose pelo método enzimático é amplamente utilizada em amostras biológicas de animais (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A Figura 16 contém os gráficos que fornecem a comparação entre ambas as técnicas em relação à quantificação de glicose, após processo hidrolítico empregando HCl (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b). De maneira geral, os resultados podem ser considerados bastante satisfatórios: as concentrações de glicose resultantes da hidrólise ácida da CA analisada via método enzimático concordam com as analisadas via HPLC-RID.

(a)



(b)

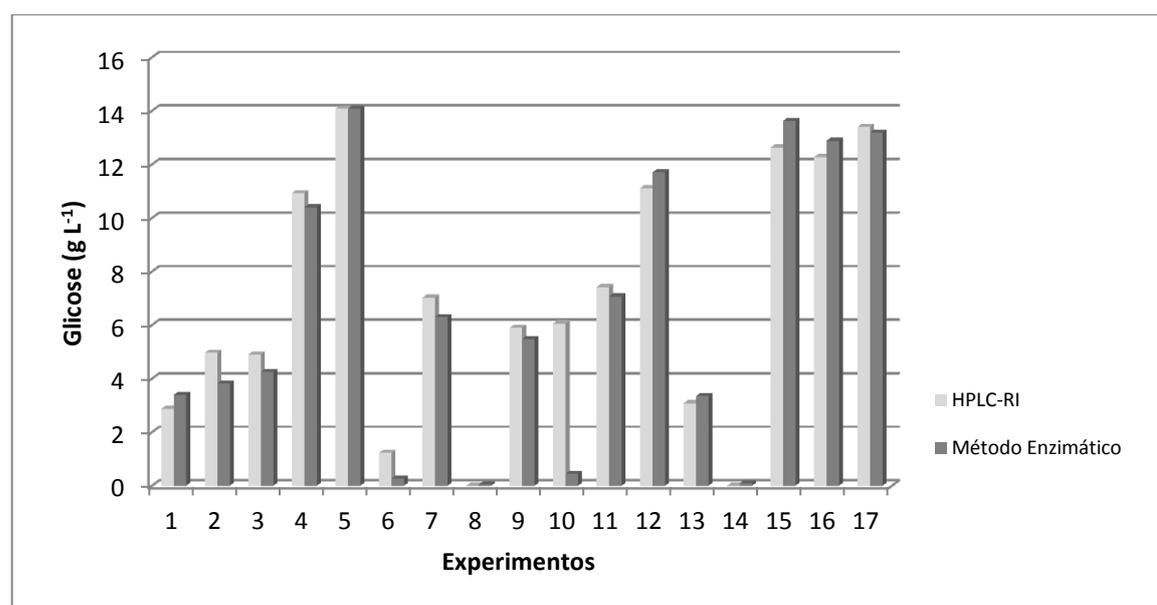


Figura 16 – Comparação das análises de glicose via método enzimático *versus* HPLC-RID em amostras obtidas a partir de processo hidrolítico empregando HCl (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) conforme as condições do planejamento experimental.

Na Figura 16 (a) percebe-se que os resultados da metodologia cromatográfica para a quantificação da glicose foram um pouco superiores, em especial no experimento nº 5 (4,2 g L<sup>-1</sup> superior), justamente o que foi selecionado anteriormente

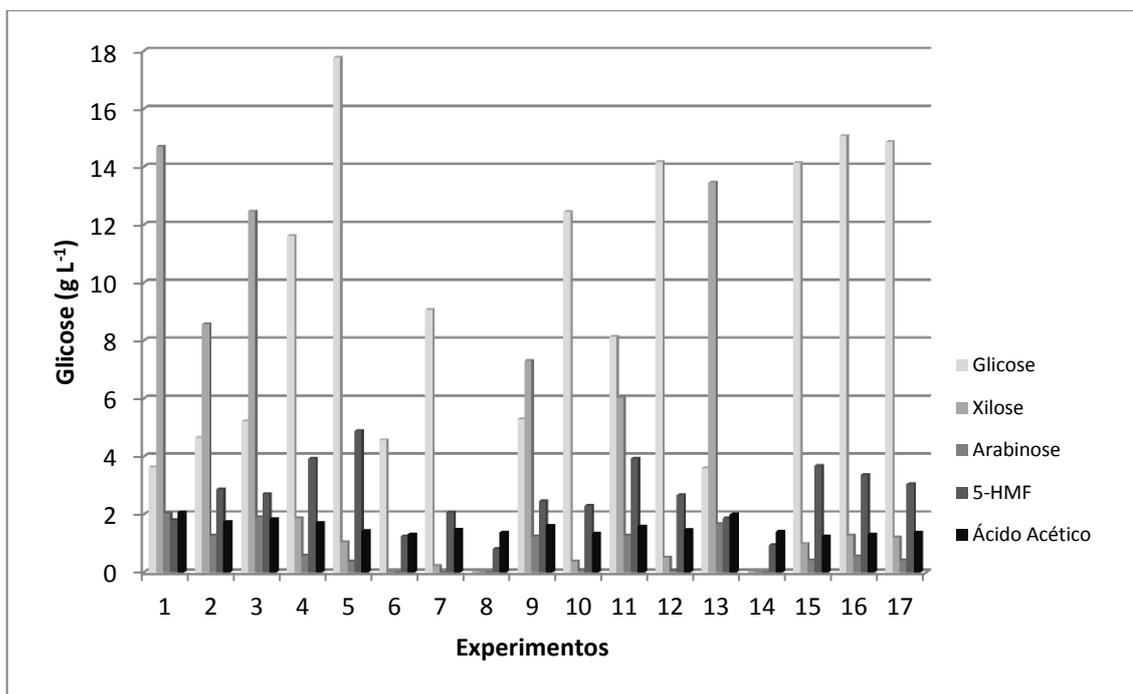
como o melhor tratamento no DCCR do HCl. Na Figura 16 (b), entretanto, praticamente não houve discrepância quando amostras de hidrolisados com  $H_2SO_4$  foram analisadas por método enzimático – de certo modo, neste caso, tal método mostrou-se mais sensível no que diz respeito à combinação das reações enzimáticas com o ácido em questão. Deve-se enfatizar que esta técnica foi extremamente específica para o analito glicose, tratando-se de um método enzimático com elevada seletividade e vantajoso em relação à técnica cromatográfica.

Os resultados e interpretação das ANOVAs, diagramas de Pareto, superfícies de resposta e curvas de contorno, bem como os perfis de desejabilidade mostraram-se semelhantes quando ambas as técnicas de quantificação foram empregadas (dados não disponíveis). Sob tais condições, optou-se em apresentar e discutir, nesta dissertação, somente a análise do planejamento experimental fatorial pertencente aos resultados de glicose obtidos via HPLC-RID.

#### 4.1.4 Análise dos produtos de interesse e subprodutos

Além da glicose, sacarídeo produzido abundantemente durante a hidrólise ácida decorrente das estruturas de celulose e, em menor escala, de hemicelulose da CA, procurou-se quantificar também xilose e arabinose, uma vez que a cepa selecionada para o processo fermentativo é capaz de degradar tanto hexoses quanto pentoses contidas na hemicelulose. Ao mesmo tempo, foram quantificados alguns dos interferentes gerados no decorrer do processo hidrolítico, como ácido acético e 5-HMF. Os resultados decorrentes dos experimentos do planejamento experimental para HCl e  $H_2SO_4$  podem ser evidenciados na Figura 17.

(a)



(b)

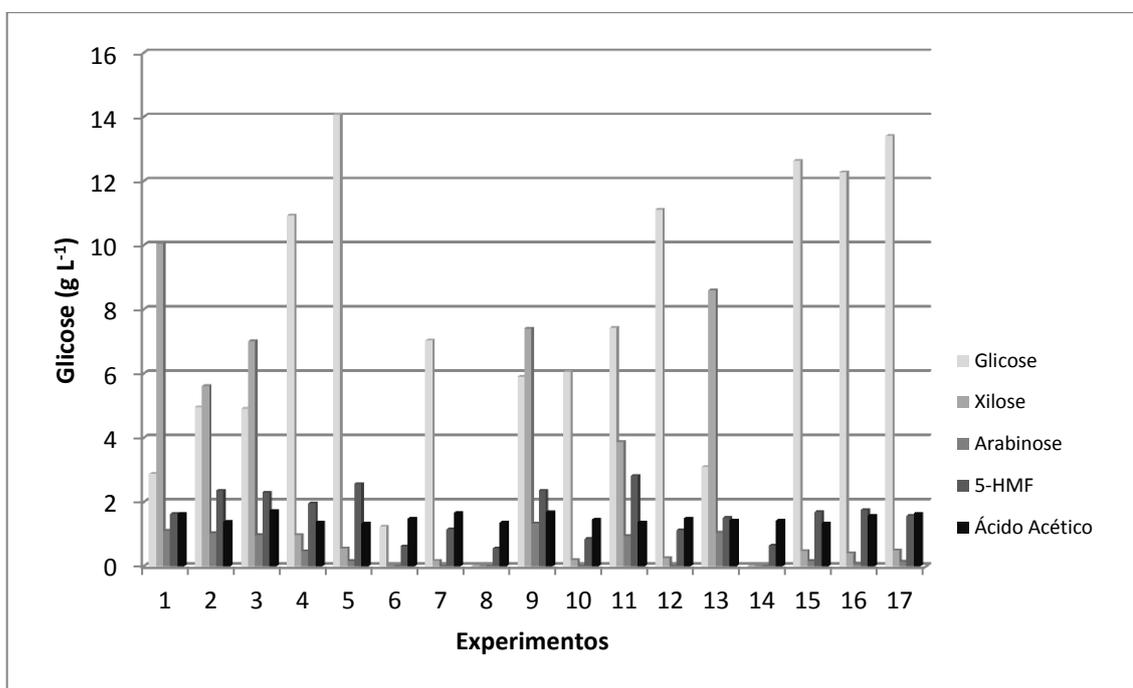


Figura 17 – Concentração média dos produtos de interesse e subprodutos formados durante o processo hidrolítico empregando-se HCl (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) conforme as condições do planejamento experimental.

Através da Figura 17, percebe-se que a xilose, após a glicose, foi o açúcar mais produzido nas condições pré-definidas anteriormente, variando de 0-14,7 g L<sup>-1</sup> (0-88,2 mg xilose g<sup>-1</sup> CA de rendimento mássico ou 8,8% de rendimento teórico) quando empregou-se o HCl; e de 0-10,0 g L<sup>-1</sup> (0-60,3 mg xilose g<sup>-1</sup> CA de rendimento mássico ou 6,0% de rendimento teórico) quando fez-se uso do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Resumidamente, o intervalo ideal para a produção de xilose ocorreu com o emprego de 1,0-5,8% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, com tempo de residência variando de 30-94 min a temperaturas de 135-160 °C. Os experimentos em que resultaram nos teores de xilose mais elevados foram os mesmos para ambos os ácidos: no caso das hidrólises com HCl foram experimentos n° 1 (14,7 g L<sup>-1</sup>), n° 13 (13,4 g L<sup>-1</sup>), n° 3 (12,5 g L<sup>-1</sup>), n° 2 (8,6 g L<sup>-1</sup>), n° 9 (7,3 g L<sup>-1</sup>) e n° 11 (6,0 g L<sup>-1</sup>); enquanto no caso das hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram experimento n° 1 (10,0 g L<sup>-1</sup>), n° 13 (8,6 g L<sup>-1</sup>), n° 9 (7,4 g L<sup>-1</sup>), n° 3 (7,0 g L<sup>-1</sup>), n° 2 (5,6 g L<sup>-1</sup>) e n° 11 (3,9 g L<sup>-1</sup>). Tais resultados indicam que concentrações elevadas de xilose foram obtidas quando condições mais amenas foram empregadas ou, então, quando houve um equilíbrio entre as variáveis – diferentemente da glicose, açúcar produzido em condições mais severas. Nos experimentos n° 5, por exemplo, tratamento em que se obteve maiores índices de glicose, produziu-se apenas 1,4 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrólises com HCl e 0,5 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os experimentos n° 6, 8 e 14 retratam a total degradação da xilose, sugerindo que temperaturas acima de 175 °C, aliadas às demais condições extremas, produzem tal efeito. Em um primeiro momento, pode-se acreditar que, quanto mais elevada a temperatura, maior será a eficiência de hidrólise. No entanto, temperaturas muito altas podem levar à degradação dos açúcares, diminuindo a eficiência do pré-tratamento e aumentando a toxicidade dos hidrolisados. Por outro lado, mesmo com temperaturas menores, o mesmo poderá ocorrer se o tempo de exposição for prolongado. De modo geral, temperaturas maiores implicam em menores tempos e vice-versa (MOSIER *et al.*, 2005; Mc MILLAN, 1994).

Em comparação a este trabalho, Suxia *et al.* (2012) obtiveram rendimento de 97,04% de xilose ao fazer hidrólise ácida diluída com 2,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m m<sup>-1</sup>) empregando CA (8 mL g<sup>-1</sup>) a 110 °C durante 4 h de reação. Porém, cabe mencionar que o DCCR empregado aqui teve o intuito de analisar somente a resposta glicose e, por isso, a faixa ótima de xilose não foi estudada.

A arabinose, no entanto, apresentou um índice inferior de produção quando comparada aos outros sacarídeos, variando de 0-2,0 g L<sup>-1</sup> (0-12,2 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA) em hidrolisados com HCl e de 0-1,3 g L<sup>-1</sup> (0-7,95 mg arabinose g<sup>-1</sup> CA) em hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo que estas concentrações máximas foram obtidas nos experimentos n° 1. A formação de arabinose parece estar interligada àquela da xilose: teores superiores de arabinose são liberados quando condições mais brandas são empregadas. Os experimentos n° 5 foram responsáveis pela produção de 0,4 g L<sup>-1</sup> (HCl) e 0,2 g L<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A degradação de tal açúcar ocorreu nos experimentos n° 6, 7, 8 e 14 (HCl) e 6, 7, 8, 10, 12 e 14 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Dentre os tratamentos empregando-se hidrólises com HCl, o experimento n° 5 foi o que gerou mais açúcares fermentáveis (glicose e xilose), totalizando 18,8 g L<sup>-1</sup> (112,9 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA), seguido pelo n° 1 (18,3 g L<sup>-1</sup>), n° 3 (17,7 g L<sup>-1</sup>), n° 13 (17,1 g L<sup>-1</sup>) e pontos centrais (16,1 g L<sup>-1</sup>). Em relação àqueles empregando hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o experimento n° 5 também foi o maior produtor de glicose e xilose, totalizando 14,6 g L<sup>-1</sup> (87,9 mg açúcares g<sup>-1</sup> CA), seguido pelo ponto central (13,9 g L<sup>-1</sup>), n° 9 (13,3 g L<sup>-1</sup>), n° 1 (12,9 g L<sup>-1</sup>), n° 3 (11,9 g L<sup>-1</sup>) e n° 4 (11,9 g L<sup>-1</sup>). Novamente, os tratamentos visando a máxima produção de açúcares fermentáveis, via hidrólise ácida a pressão, revelaram-se mais eficientes nos processos empregando HCl, como discutido anteriormente.

Nas reações químicas envolvidas no processo hidrolítico, o teor de prótons tem uma importante função. Ainda que a tecnologia não envolva a adição de ácido no processo, o emprego de temperaturas elevadas favorece o aumento da acidez do meio, mediante a liberação de ácidos orgânicos endógenos, principalmente acético e fórmico, bem como pela protonação decorrente da dissociação da água (MOSIER *et al.*, 2005; LYND, 1996).

A produção de ácido acético, inibidor da etapa fermentativa e procedente da hidrólise dos radicais acetila da hemicelulose, apresentou pequenas variações entre os tratamentos: de 1,2-2,07 g L<sup>-1</sup> (experimentos do ponto central com mínima produção e experimento n° 1 com máxima produção) em hidrólises com HCl e de 1,3-1,7 g L<sup>-1</sup> (experimento n° 5 com mínima produção e experimento n° 3 com máxima produção) em hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para hidrólises com HCl, o experimento n° 5 foi responsável pela produção de 1,4 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, sendo que para a maioria dos micro-organismos 3 g L<sup>-1</sup> é considerado tóxico (HELLE *et al.*, 2003).

Já para o 5-HMF, outro inibidor fermentativo, houve variações de 0,8-4,9 g L<sup>-1</sup> em hidrólises com HCl e 0,6-2,6 g L<sup>-1</sup> em hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo que as produções mínimas ocorreram nos experimentos n° 8, enquanto as máximas nos experimentos n° 5. Os experimento em que a produção de 5-HMF foi inferior (n° 8, 14 e 6), com concentrações de ácido superiores a 4,0% (v v<sup>-1</sup>) e temperaturas acima de 175 °C, são os mesmos em que houve degradação de glicose, xilose e arabinose. Tal fato indica a prévia degradação do próprio 5-HMF a ácidos fórmico e levulínico. Após os experimentos n° 5, as maiores produções de 5-HMF foram atingidas nos experimentos n° 11 (3,9 g L<sup>-1</sup>) e n° 4 (3,9 g L<sup>-1</sup>) para hidrolisados com HCl e n° 11 (2,8 g L<sup>-1</sup>), n° 9 (2,4 g L<sup>-1</sup>), n° 2 (2,4 g L<sup>-1</sup>) e n° 3 (2,3 g L<sup>-1</sup>) para hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em consequência das mais elevadas temperaturas empregadas, os sacarídeos oriundos da hidrólise ácida, principalmente da hemicelulose, se degradam, originando compostos derivados do furano: o furfural, formado a partir da degradação das pentoses e o 5-HMF, formado a partir da degradação das hexoses. Por sua vez, estes dois compostos são capazes de se degradarem a outros produtos: o furfural pode originar ácido fórmico ou, então, se polimerizar, já o 5-HMF origina quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico (ANTUNES *et al.*, 2010).

Com o propósito de aumentar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos após a hidrólise ácida, é necessário reduzir a concentração, ou eliminar totalmente do meio, os compostos tóxicos formados durante esta etapa. Para tanto, utilizou-se carvão ativo visando reduzir e/ou eliminar compostos derivativos do furano e, com isto, a concentração de 5-HMF reduziu-se à metade. Portanto, o experimento n° 5 com HCl passou de 4,9 g L<sup>-1</sup> para 2,6; enquanto o experimento n° 5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> passou de 2,6 g L<sup>-1</sup> para 1,3 g L<sup>-1</sup>. Deste modo, o emprego da adsorção através de carvão ativo ou carvão vegetal demonstra ser um processo eficiente na destoxificação dos hidrolisados. Mediante a aplicação desta técnica, tem-se conseguido um aumento da fermentabilidade dos hidrolisados em decorrência da eliminação seletiva de compostos tóxicos como o 5-HMF, furfural e derivados fenólicos sem comprometer a concentração dos açúcares fermentáveis (MIYAFUJI *et al.*, 2003).

Hidrólise ácida diluída com 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v v<sup>-1</sup>) envolvendo CA na razão de 1:10 (m v<sup>-1</sup>) foi feita por Cunha-Pereira *et al.* (2011) em autoclave a 121 °C durante 60 min. O hidrolisado resultante foi concentrado a vácuo (2,8 vezes) a 70 °C até a

obtenção de 35 g L<sup>-1</sup> de glicose, 13 g L<sup>-1</sup> de xilose e 4 g L<sup>-1</sup> de arabinose. As concentrações dos componentes tóxicos gerados foram 0,07 g L<sup>-1</sup> de HMF, 0,01 g L<sup>-1</sup> de furfural e 1,6 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, não sendo necessário a destoxificação e suplementação do meio.

MA *et al.* (2011) investigaram uma série de pré-tratamentos da CA com ácido diluído seguido de hidrólise ácida concentrada, ambos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As concentrações empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído foram de 2, 4, 5, 6 e 8% (*m m*<sup>-1</sup>), com razão sólido:líquido 1:10 (*m v*<sup>-1</sup>). O processo de hidrólise ácida envolveu distintas concentrações (67, 72, 77 e 82% *m m*<sup>-1</sup>), temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C), tempos (2, 5, 10 e 15 min) e razões sólido:líquido (1:5, 1:10, 1:15 e 1:20). A condição otimizada do processo hidrolítico foi a seguinte: concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 72% (*m m*<sup>-1</sup>), temperatura de 50 °C, tempo de 5 min e razão da massa de CA (g) pelo volume da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL) 1:10, fornecendo um rendimento de glicose de 45,6% (*m m*<sup>-1</sup>). Todavia, apesar do resultado de conversão satisfatório, a condição ácida empregada é considerada severa quando objetiva-se realizar, subsequentemente, um processo fermentativo. Adicionalmente, as concentrações dos subprodutos formados não foram divulgadas.

De fato, o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é um reagente extensivamente empregado industrialmente e, talvez por este motivo, conforme os exemplos acima, a maior parte dos pré-tratamentos hidrolíticos que visam a produção de sacarídeos fermentáveis façam uso de tal ácido, uma vez que resultados convenientes do produto de interesse são obtidos mesmo sem a hidrólise enzimática subsequente.

Em comparação à hidrólise ácida, um pré-tratamento da CA envolvendo Ca(OH)<sub>2</sub>, em trabalho conduzido por Saha & Cotta (2008), rendimentos máximos de açúcares (93 mg de glicose g<sup>-1</sup> CA, 27 mg de xilose g<sup>-1</sup> CA e 6,0 mg de arabinose g<sup>-1</sup> CA) foram atingidos após 1 h de reação em autoclave a 121 °C, empregando 100 mg Ca(OH)<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> CA.

#### 4.1.5 Análise da composição dos hidrolisados por LC-MS/TOF

O entrosamento entre a biomassa lignocelulósica e o seu posterior pré-tratamento é uma questão altamente complexa e pouco compreensível a nível

molecular. Conforme Klinke, Thomsen & Ahring (2004), além dos sacarídeos fermentáveis, uma variedade de outros produtos de degradação, potencialmente inibidores, é produzida durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, furanos e fenóis), sendo que muitos destes compostos podem ser cruciais às etapas subsequentes envolvendo enzimas e/ou micro-organismos.

Várias pesquisas têm demonstrado a capacidade de identificar e quantificar os produtos de degradação dos açúcares e lignina resultantes do pré-tratamento químico das biomassas lignocelulósicas (LUO, BRINK & BLANCH, 2002). Ademais, Du *et al.* (2010) estudaram o efeito da variação de sete pré-tratamentos químicos (0,7% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,07% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, água quente líquida, solução tampão neutra, amônia aquosa, Ca(OH)<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub> com pressurização de O<sub>2</sub> e oxidação úmida) empregando três biomassas lignocelulósicas (palha de milho, álamo e pinho), com a finalidade de analisar as combinações de formação e acumulação dos produtos de degradação potencialmente inibidores nos hidrolisados, identificando e quantificando quarenta compostos no total. Os analitos mais relevantes encontrados compreenderam os ácidos alifáticos (ácidos acético, fórmico, levulínico, fumárico, gálico, etc.), ácidos aromáticos (ácidos ferúlico, 2-furóico, vanílico, siríngico, salicílico, benzóico, etc.) e aldeídos/cetonas (furfural, 5-HMF, vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, etc.).

Logo, neste trabalho, os hidrolisados da CA com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que resultaram em maiores concentrações de glicose via planejamento experimental (experimentos n° 5), foram analisados por LC-MS/TOF com o intuito de obter-se um *screening* e, assim, explicar as principais substâncias presentes em sua composição. Os cromatogramas de íons totais obtidos para os hidrolisados com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em modo positivo, estão dispostos nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

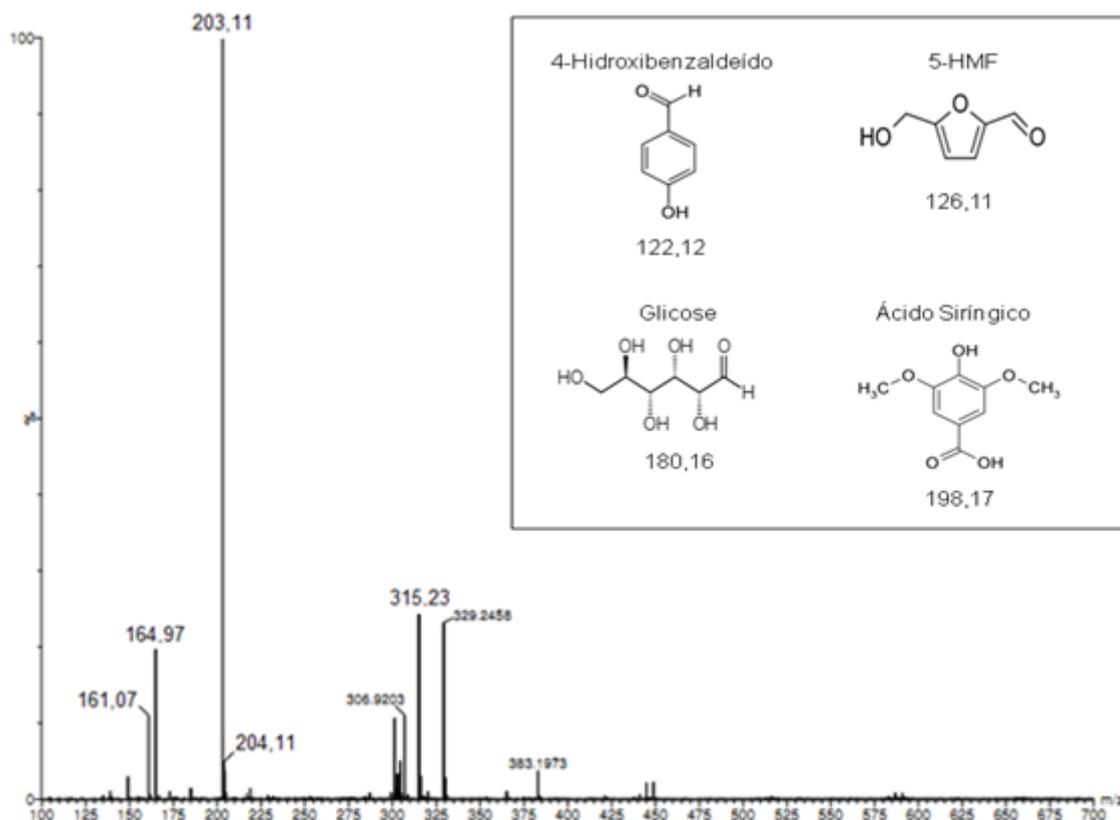


Figura 18 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: 4-hidroxi-benzaldeído [M+K]<sup>+</sup>, m/z 161,07; 5-HMF [M+K]<sup>+</sup>, m/z 164,97; glicose [M+Na]<sup>+</sup>, m/z 203,11 e [M+Na+H]<sup>+</sup>, m/z 204,11 e ácido siríngico [M+3K]<sup>+</sup>, m/z 315,23.

De modo geral, para ambos os hidrolisados, os possíveis compostos produzidos durante a hidrólise ácida foram 4-hidroxi-benzaldeído (ANTOLOVICH *et al.*, 2004) adicionado de um aduto de potássio (m/z 161); 5-HMF (ZHENG *et al.*, 2011) acrescido de um aduto de potássio para o hidrolisado com HCl (m/z 165) e de um aduto de sódio para o hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m/z 149); glicose (BUNGERT *et al.*, 2004) contendo um aduto de sódio (m/z 203) e um aduto de sódio mais hidrogênio (m/z 204) e ácido siríngico (CAPPIELLO *et al.*, 2003) adicionado de três adutos de potássio (m/z 315). De fato, o ácido 4-hidroxi-benzaldeído é um derivado fenólico muito abundante nos hidrolisados, originado na ruptura das ligações éster que unem os grupos hidroxilas dos álcoois cinâmicos da lignina. Outros derivados fenólicos abundantes nos hidrolisados são o siringaldeído e o ácido siríngico, procedentes da degradação das unidades siringilpropano da lignina.

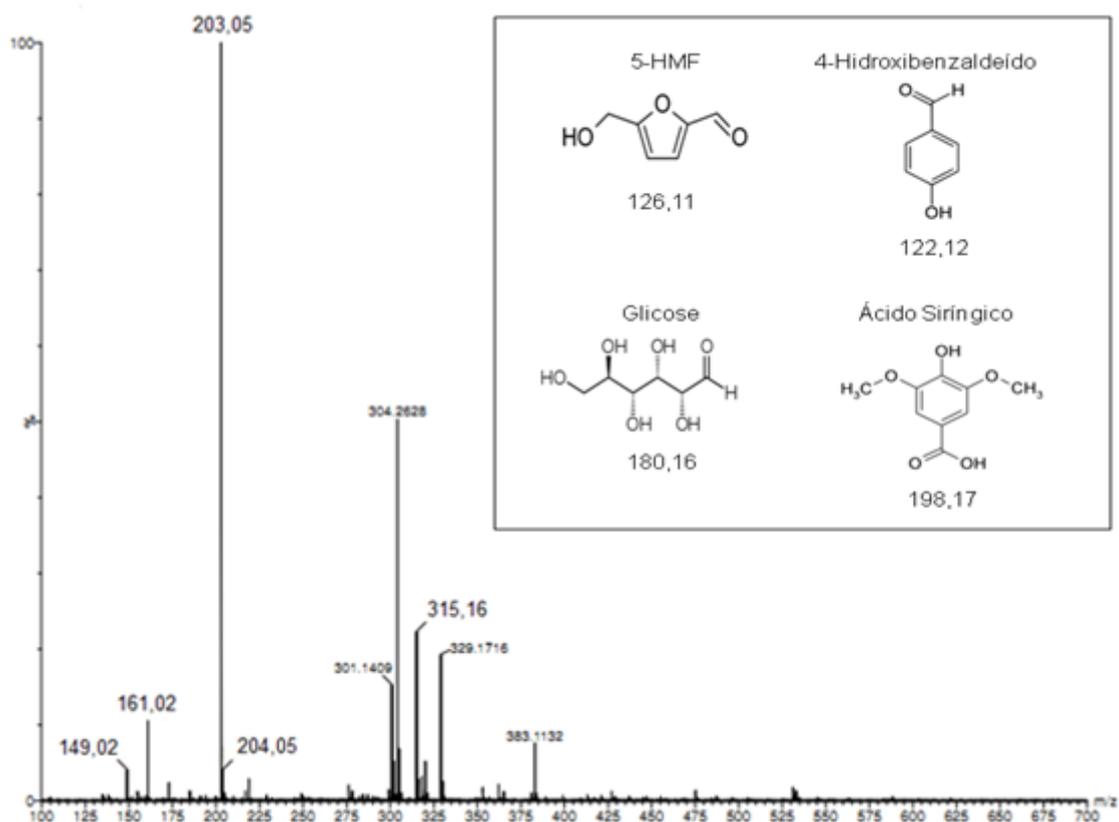


Figura 19 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: 5-HMF  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  149,02; 4-hidroxibenaldeído  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ,  $m/z$  161,02; glicose  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  203,05 e  $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  204,05 e ácido siríngico  $[\text{M}+3\text{K}]^+$ ,  $m/z$  315,16.

Para fins comparativos de sensibilidade, os cromatogramas de íons totais obtidos para os hidrolisados com HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , em modo negativo, estão dispostos nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

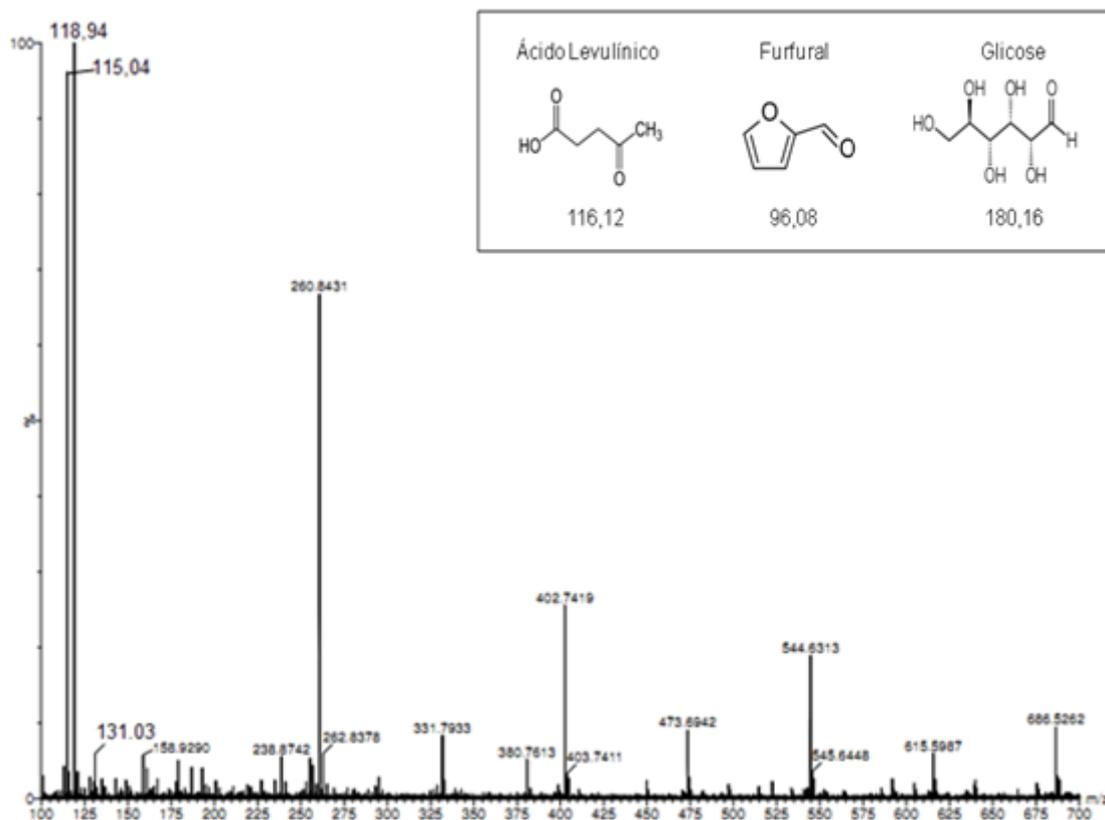


Figura 20 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI-) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: ácido levulínico [M-H]<sup>+</sup>, *m/z* 115,04; furfural [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 118,94 e glicose [M-2Na-3H]<sup>+</sup>, *m/z* 131,03.

Tanto para o hidrolisado com HCl quanto para o hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os possíveis compostos produzidos durante o processo hidrolítico foram ácido levulínico (ZHENG *et al.*, 2011) subtraído de um hidrogênio (*m/z* 115) e glicose (BUNGERT *et al.*, 2004) com perda de dois adutos de sódio e três hidrogênios (*m/z* 131). Para o caso do HCl, observou-se também a presença de furfural (ZHENG *et al.*, 2011) acrescido de um aduto de sódio (*m/z* 119).

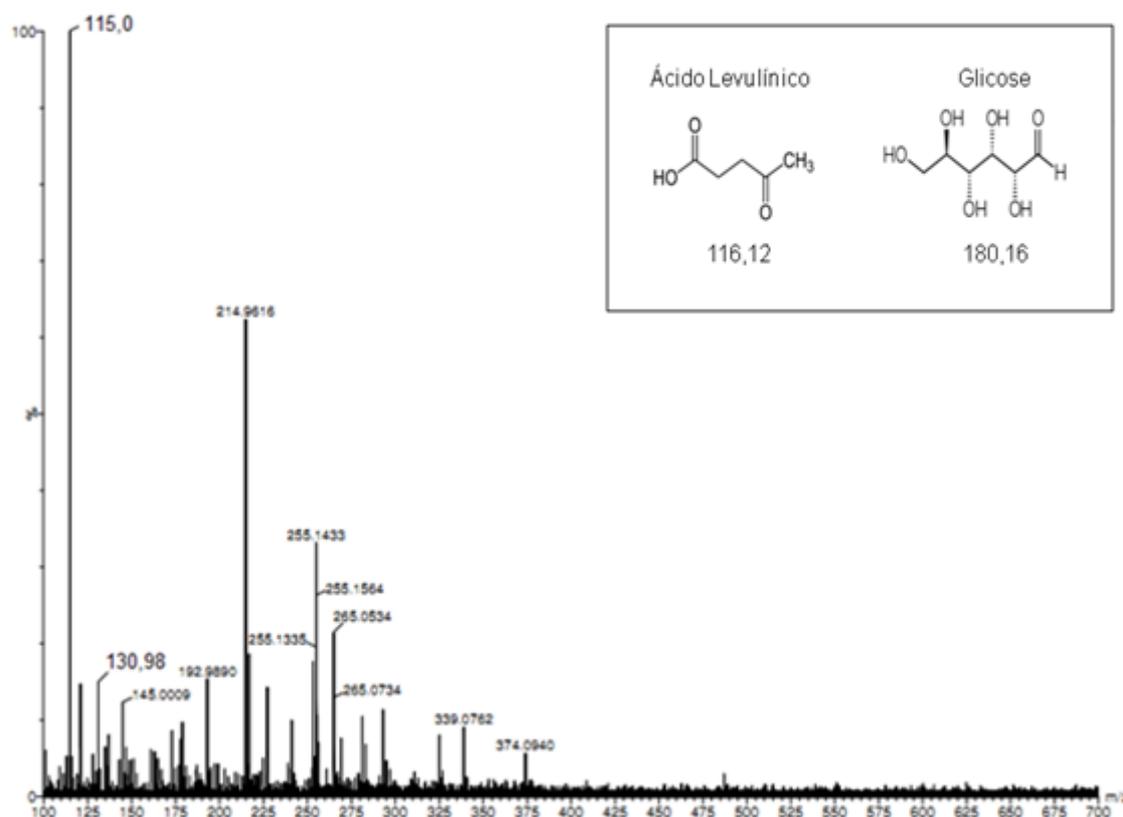


Figura 21 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI-) adquirido pela infusão direta da amostra do hidrolisado da casca de arroz com  $H_2SO_4$  (experimento n° 5: 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo os possíveis fragmentos: ácido levulínico  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  115 e glicose  $[M-2Na-3H]^+$ ,  $m/z$  130,98.

Via de regra, os espectros evidenciados acima confirmam a presença dos principais produtos e subprodutos formados a partir do fracionamento da estrutura lignocelulósica da CA, a partir da hidrólise ácida. Todavia, não foi possível identificar com exatidão todos os fragmentos gerados, pois uma determinada massa molar poderia pertencer a mais de um composto. Por exemplo, na Figura 21 o fragmento  $m/z$  145 englobaria o 4-hidroxibenzaldeído acrescido de um aduto de sódio, o ácido ferúlico com perda de dois adutos de sódio e três hidrogênios ou, então, o ácido vanílico subtraído de um aduto de sódio. Dentre os distintos subprodutos encontrados no hidrolisado da CA, além dos previamente descritos, sugerem-se: 3,4-dihidroxibenzaldeído, cinamaldeído, siringaldeído, vanilina, ácidos 2-furóico, benzóico, caféico, elágico, ferúlico, fumárico, galacturônico, gálico, glucurônico, etc.). Deve-se salientar que alguns ácidos orgânicos de massa molar inferior, como ácidos

acético e fórmico, não foram detectados devido à alta sensibilidade do equipamento empregado.

Os compostos e a concentração dos inibidores existentes no hidrolisado dependem da biomassa em questão e da condição do pré-tratamento, uma vez que o efeito inibitório varia conforme a concentração e o micro-organismo utilizado na produção do insumo de interesse (MARTÍN & JÖNSSON, 2003). No entanto, Du *et al.* (2010) concluíram que os compostos que exibem maior hidrofobicidade tendem a ser mais inibitórios e que o pH em que a fermentação é conduzida tem um efeito significativo sobre as ações inibitórias de muitos dos subprodutos. Adicionalmente, os autores repararam que, de maneira geral, as classes e concentrações dos produtos de degradação dependeram mais da biomassa utilizada do que o pré-tratamento químico em si. Em alguns casos, a formação e acumulação dos compostos selecionados foram dependentes da biomassa e do pré-tratamento químico, enquanto que em outros não houve tendências óbvias.

Mesmo que o processo hidrolítico ácido seja eficiente e relativamente econômico, distintos subprodutos inibidores à etapa fermentativa são gerados. Em vista disso, a sacarificação enzimática tem atraído a atenção da maior parte das pesquisas – tal processo oferece potencial de redução dos custos a longo prazo, pois é possível atingir-se rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e severidade química, contribuindo para a aplicação dos princípios da química verde. Porém, na fase de desenvolvimento atual, o processo ainda é economicamente inviável – o custo elevado está relacionado, principalmente, às enzimas utilizadas na hidrólise e, também, aos pré-tratamentos envolvidos – o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo.

Por esta razão, existe uma necessidade contínua de desenvolvimento da compreensão do efeito do pré-tratamento químico na formação e acumulação de produtos de degradação lignocelulósicos. Tal entendimento é relevante no para reduzir a produção de determinados compostos (inibidores, por exemplo) e, também, na maximização da produção dos produtos de interesse (DU *et al.*, 2010). Uma maior compreensão no que diz respeito à composição química de uma dada estrutura lignocelulósica específica, bem como os mecanismos físico-químicos envolvidos em um determinado pré-tratamento são requisitos primordiais nas estratégias de elaboração de modelos preditos de pré-tratamento, que permitirão a

seleção, o delineamento e a otimização dos processos apropriados correspondentes a uma biomassa em particular (MOSIER *et al.*, 2005).

## 4.2 Fermentação láctica do hidrolisado da casca de arroz

### 4.2.1 Determinação do ácido láctico por HPLC-DAD

As condições cromatográficas para a detecção e quantificação do ALac foram otimizadas com base nos parâmetros previamente descritos na seção 4.1.1. O método de determinação do ácido orgânico por HPLC-DAD foi desenvolvido com o auxílio da solução-padrão de ALac (seção 3.5.3). As figuras-de-mérito obtidas estão expostas na Tabela 10. O  $r^2$  referente à curva de calibração na faixa linear de trabalho evidencia linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação do analito pelo método do padrão externo.

Tabela 10 – Figuras-de-mérito para a determinação do ácido láctico.

Analito	Faixa linear (g L <sup>-1</sup> )	Equação da reta	$r^2$	LD (g L <sup>-1</sup> )	LQ (g L <sup>-1</sup> )
Ácido Láctico	0,2-2,0	$y = 1558,1x - 11363$	0,993177	0,05	0,167

A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido para a análise da solução padrão de ALac (1 g L<sup>-1</sup>), enquanto a Figura 23 retrata o cromatograma referente a injeção de uma amostra do fermentado empregando como substrato a CA, sendo que ambas as figuras demonstram perfis cromatográficos muito semelhantes entre o padrão do ALac e a amostra. Pode-se observar, também, a eficiente separação cromatográfica do analito em relação aos demais compostos presentes no fermentado.

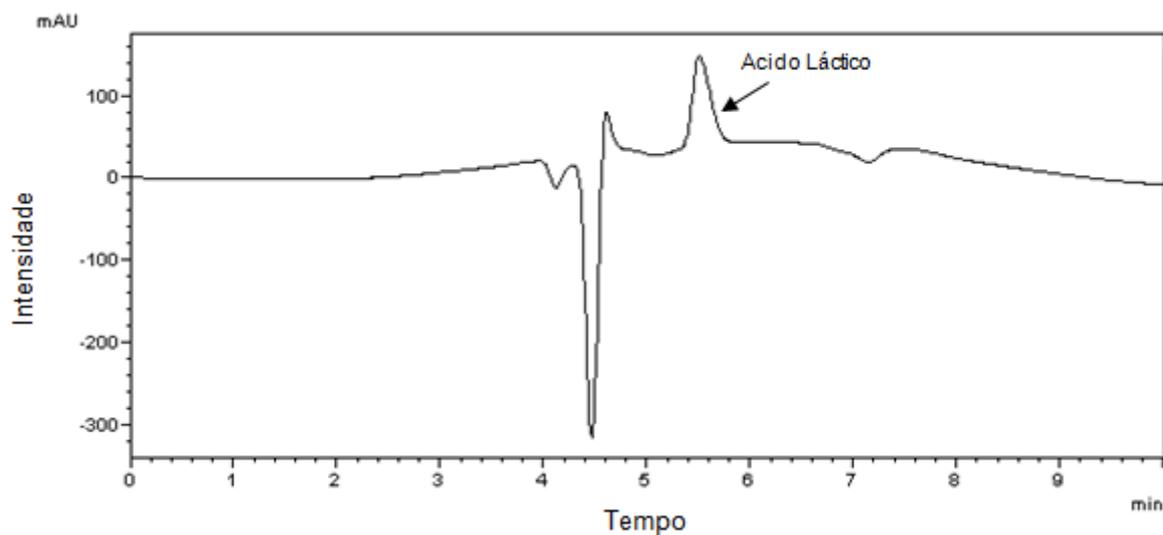


Figura 22 – Cromatograma obtido a partir da injeção de solução-padrão de ácido láctico e uso de coluna Mediterranea Sea 18 (150 mm x 40 mm), eluída em fase aquosa (98%  $v v^{-1}$ ) constituída por 0,1% de ácido fórmico e fase orgânica (2%  $v v^{-1}$ ) constituída por metanol e 1% de ácido fórmico, com vazão de 0,4 mL  $min^{-1}$ .

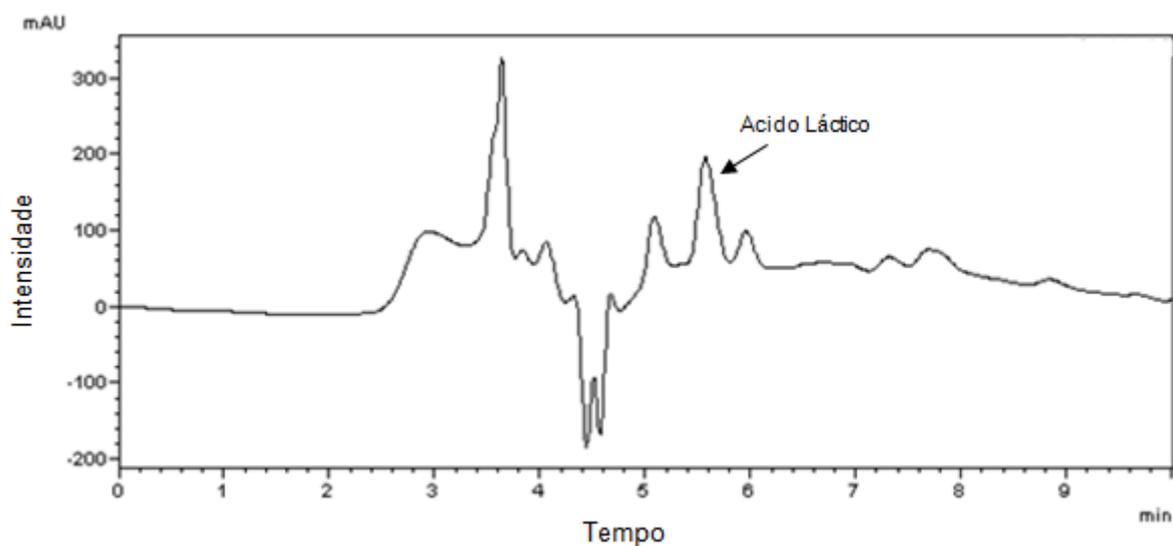


Figura 23 – Cromatograma de uma amostra de fermentado da casca de arroz (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de HCl, 175 °C, 46 min), diluída 10 vezes em água e eluída em condições cromatográficas idênticas àquelas da Figura 22.

#### 4.2.2 Detecção do ácido láctico por LC-MS/TOF

Os cromatogramas de íons totais obtidos para os fermentados com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em modo positivo, com foco nos picos de ALac, estão dispostos nas Figura 24 e 25, respectivamente. Para ambos os espectros, o sinal do ALac acrescido de dois adutos de sódio e quatro hidrogênios foi detectado em *m/z* 140. Adicionalmente, uma gama de compostos foi detectada na matriz do fermentado, muitos dos quais previamente detalhados na seção 4.1.5.

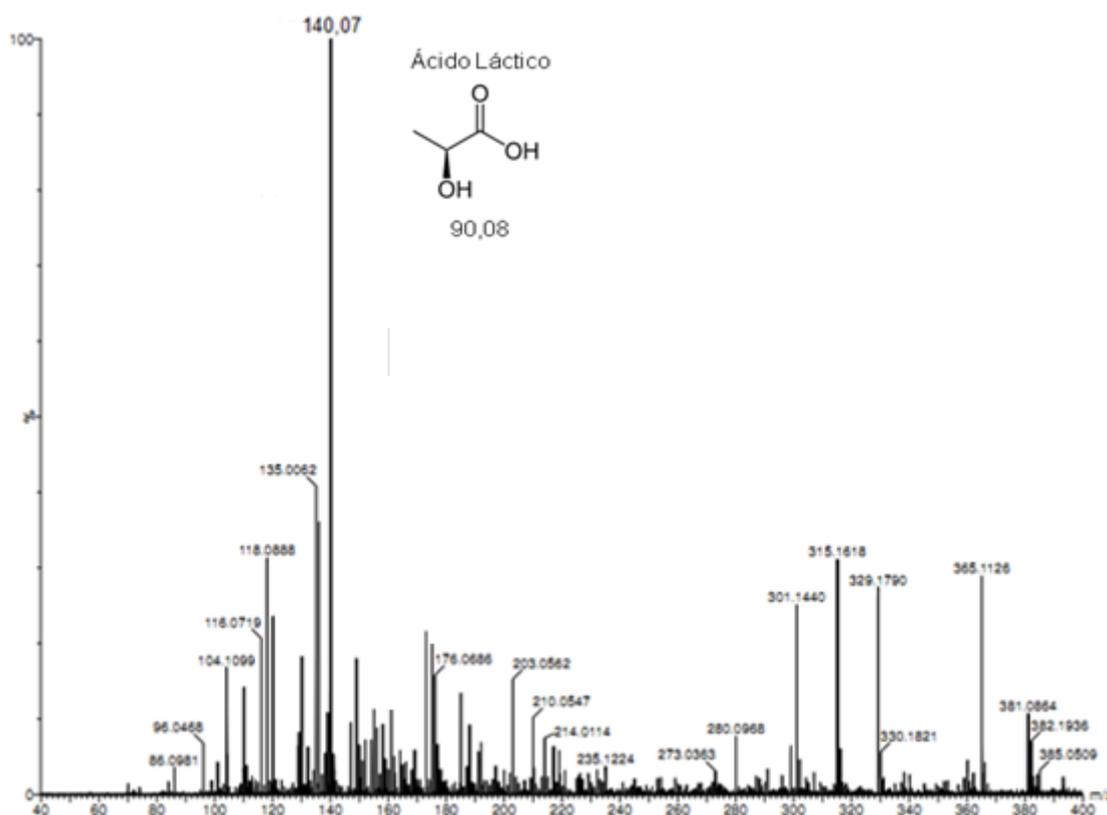


Figura 24 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do fermentado da casca de arroz com HCl (experimento n° 5: 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo o fragmento ácido láctico [M+2Na+4H]<sup>+</sup>, *m/z* 140,06.

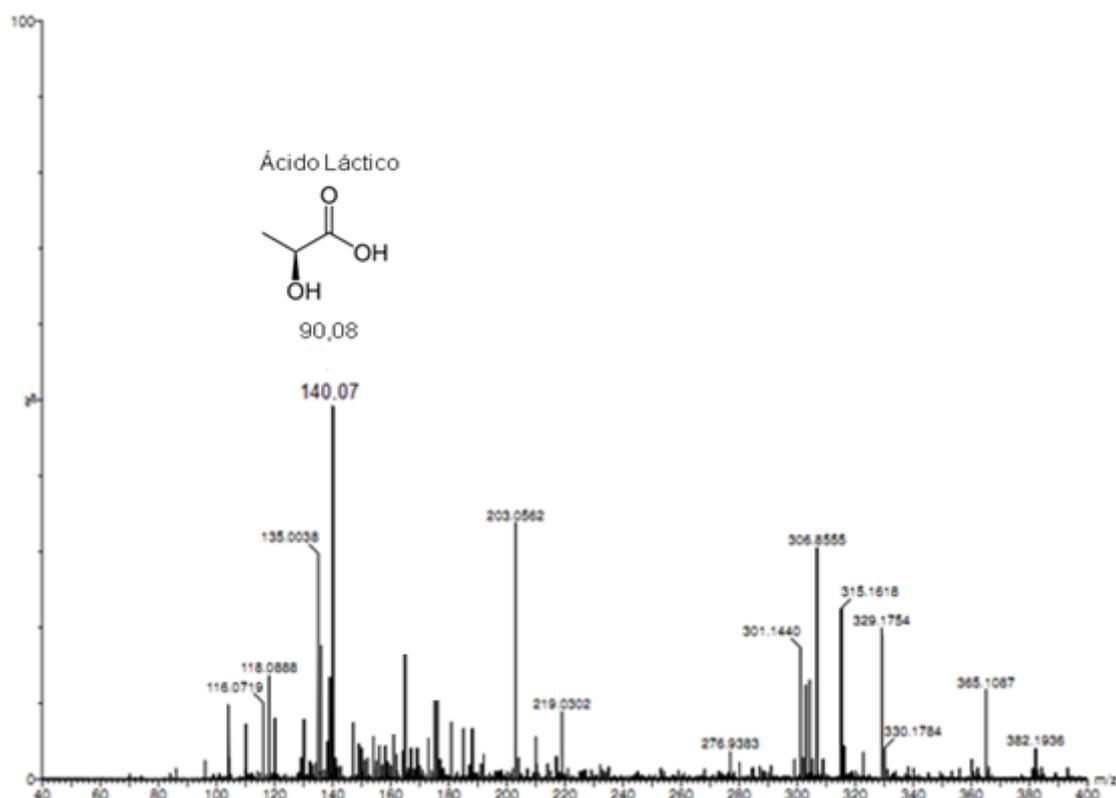


Figura 25 – Cromatograma de íons totais via LC-MS/TOF (ESI+) adquirido pela infusão direta da amostra do fermentado da casca de arroz com  $H_2SO_4$  (experimento n° 5: 2,2% ( $v v^{-1}$ ) de ácido, 175 °C, 46 min) contendo o fragmento ácido láctico  $[M+2Na+4H]^+$ ,  $m/z$  140,06.

#### 4.2.3 Otimização da produção de ácido láctico

Uma vez que os requisitos nutricionais das LABs são extremamente complexos, critérios envolvendo a suplementação do substrato formulado com hidrolisado da CA são essenciais (ver Apêndice A). A estagnação do crescimento das LABs, por exemplo, é atribuído exclusivamente à deficiência em fontes peptídicas no meio de cultivo. Com o intuito de otimizar a produtividade a um custo reduzido, distintas fontes alternativas de peptídeos têm sido investigadas (licor de milho, extrato de malte, caseína hidrolisada, etc.). No entanto, o extrato de levedura continua sendo o nutriente peptídico mais conveniente para as LABs (AMRANE & PRIGENT, 1998). Já o polissorbato 80 (Tween 80) e demais surfactantes correlacionados possuem a capacidade de promover a migração de compostos

nutritivos no interior das células bacterianas (QI *et al.*, 2009). Adicionalmente, conforme Corcoran *et al.* (2007), quando as LABs são cultivadas em um meio suplementado com polissorbato 80, que consiste em mais de 90% de ácido oléico, este ácido é incorporado nas membranas, e, por isso, o polissorbato 80 é rotineiramente incluído em meios sintéticos para o cultivo de *Lactobacillus*, incrementando as taxas de crescimento, secreção da glicosiltransferase e acumulação de glicina betaína nas LABs, além de estar associado com a resistência às condições ácidas impostas pela fermentação láctica.

Para tanto, fez-se uso de um delineamento experimental para analisar duas variáveis independentes importantes no processo de fermentação láctica a partir de *L. rhamnosus*: extrato de levedura (2,5-17,5 g L<sup>-1</sup>) e polissorbato 80 (0,1-1,9 g L<sup>-1</sup>), de acordo com o que foi descrito na sessão 3.4.1, tendo como variável dependente a concentração de ALac. Os ensaios fermentativos foram conduzidos tanto com hidrolisados da CA com HCl quanto com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de modo a avaliar a performance de ambos na obtenção de ALac, a 37 °C por um período de 168 h. Na Tabela 11 encontram-se os valores codificados dos ensaios experimentais para HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ressaltando que no caso do HCl o tempo de fermentação necessário para a maior produtividade do ALac foi de 60 h, enquanto que para o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 24 h.

Conforme a Tabela 11, as concentrações de ALac variaram de 5,31-18,67 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 282,2-992,4 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcar (ou 28,22-99,24%) e produtividade de 0,09-0,31 g ALac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o HCl; e de 5,84-14,98 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 398,8-1.000,0 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcar (ou 39,88-100%) e produtividade de 0,24-0,62 g Alac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conforme as circunstâncias do DCCR, demonstrando a influência das variáveis independentes na resposta final.

Através do planejamento experimental, percebe-se que fermentações contendo 15,3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1,6 g L<sup>-1</sup> de polissorbato 80 (experimentos n° 4) apresentaram as mais altas concentrações de ALac, similares aos experimentos n° 6, mas com quantidades inferiores de nutrientes. Assim, 18,29 g ALac L<sup>-1</sup>, indicando um rendimento de 972,6 mg Alac g<sup>-1</sup> açúcar (ou 97,26% *m m*<sup>-1</sup>) e produtividade de 0,3 g Alac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> foram obtidas em experimentos a partir de hidrolisados da CA com HCl; e 14,64 g Alac L<sup>-1</sup>, indicando um rendimento de 999,8 g Alac g<sup>-1</sup> açúcar (ou 99,98% *m m*<sup>-1</sup>) e produtividade de 0,61 g Alac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> foram obtidas em experimentos a partir de hidrolisados da CA com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabela 11 – Resultados do delineamento composto central rotacional para produção de ácido láctico, após 60 h de fermentação com *L. rhamnosus*, empregando como substrato hidrolisado da casca de arroz com HCl e após 24 h de fermentação com *L. rhamnosus*, empregando como substrato hidrolisado da casca de arroz com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Experimentos	Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	Polissorbato 80 (g L <sup>-1</sup> )	ALac 60 h (HCA <sup>7</sup> com HCl)			
			C <sub>ALac</sub> <sup>8</sup> (g L <sup>-1</sup> )	R <sub>ALac</sub> <sup>9</sup> (mg g <sup>-1</sup> açúcar)	P <sub>ALac</sub> <sup>10</sup> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
HCl	1	-1	-1	6,37	338,50	0,11
	2	1	-1	12,80	680,30	0,21
	3	-1	1	7,90	420,20	0,13
	4	1	1	18,29	972,60	0,30
	5	-1,41	0	5,31	282,20	0,09
	6	1,41	0	18,67	992,40	0,31
	7	0	-1,41	9,99	531,00	0,17
	8	0	1,41	11,70	622,30	0,19
	9	0	0	10,29	547,10	0,17
	10	0	0	11,69	621,50	0,19
	11	0	0	10,69	568,10	0,18
Experimentos	Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	Polissorbato 80 (g L <sup>-1</sup> )	ALac 24 h (HCA <sup>7</sup> com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )			
			C <sub>ALac</sub> <sup>8</sup> (g L <sup>-1</sup> )	R <sub>ALac</sub> <sup>9</sup> (mg g <sup>-1</sup> açúcar)	P <sub>ALac</sub> <sup>10</sup> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	-1	-1	6,81	464,90	0,28
	2	1	-1	11,04	754,20	0,46
	3	-1	1	7,06	482,20	0,29
	4	1	1	14,64	999,80	0,61
	5	-1,41	0	5,84	398,80	0,24
	6	1,41	0	14,98	1.023,20	0,62
	7	0	-1,41	9,65	659,00	0,40
	8	0	1,41	10,58	722,30	0,40
	9	0	0	10,34	705,80	0,43
	10	0	0	10,29	702,90	0,43
	11	0	0	10,36	707,60	0,43

<sup>7</sup> Hidrolisado da casca de arroz (HCA); <sup>8</sup> Concentração de ALac (C<sub>ALac</sub>); <sup>9</sup> Rendimento de ALac (R<sub>ALac</sub>) (% m m<sup>-1</sup>: mg ALac g<sup>-1</sup> açúcar); <sup>10</sup> Produtividade de ALac (P<sub>ALac</sub>) (g ALac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

A projeção da matriz contida na Tabela 11 no *software* Statistica 7.0 revelou dados estatísticos com um intervalo de confiança de 95% (p<0,05), previamente estabelecido. O modelo completo ajustado fica caracterizado pelas equações 10 e 11 e representa os ensaios fermentativos com hidrolisados da CA contendo HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente, que descrevem as concentrações de ALac previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes (*EL* correspondendo ao extrato de levedura e *P* à produtividade), englobando somente os coeficientes de regressão estatisticamente significativos. O resultado da ANOVA para o comportamento dos hidrolisados ácidos, avaliados no decorrer da fermentação láctica, está disposto na Tabela 12.

$$ALac (g L^{-1}) = 10,891 + 4,47 EL + 1,185 P \quad (10)$$

$$ALac (g L^{-1}) = 10,332 + 3,096 EL + 0,646 P + 0,836 EL * P \quad (11)$$

Tabela 12 – Análise de variância para o parâmetro ácido láctico.

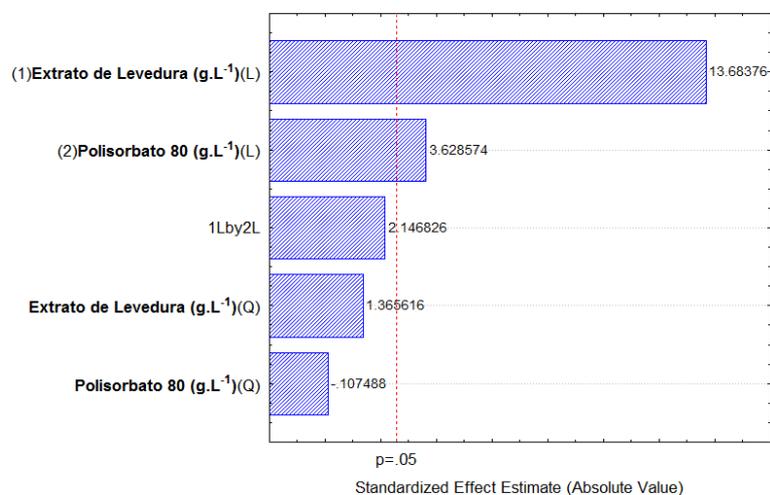
Tratamento	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F <sub>calculado</sub>
HCA HCl <sup>11</sup>	Regressão	176,36	2	88,18	166,37
	Resíduos	4,26	8	0,53	
	Total	180,61	10		
HCA H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>12</sup>	Regressão	82,82	3	27,61	153,39
	Resíduos	1,25	7	0,18	
	Total	84,07	10		

<sup>11</sup>  $r^2 = 97,6\%$  e  $F_{2, 8; 0,05} = 4,46$ ; <sup>12</sup>  $r^2 = 98,5\%$  e  $F_{3, 7; 0,05} = 4,35$ .

Através da ANOVA da Tabela 12 percebe-se que, como os valores dos  $F_{calculados}$  para as regressões (166,37 e 153,39 para fermentados com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente) são significativos ( $p < 0,05$ ) e as porcentagens de variações explicadas ( $r^2$ ) pelos modelos foram satisfatórias, 97,6% para HCl e 98,5% para H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conclui-se que os perfis dos modelos se ajustam apropriadamente aos dados experimentais.

Os diagramas de Pareto para os fermentados com HCl e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 26), apresentam os valores do teste  $t$  para cada uma das variáveis independentes – extrato de levedura ( $g L^{-1}$ ) e polissorbato 80 ( $g L^{-1}$ ) – bem como as suas interações. Para o caso do fermentado com HCl, o extrato de levedura e o polissorbato 80, ambos lineares, possuem efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) e positivos na fermentação láctica (Figura 26, a). Já para o fermentado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, além do extrato de levedura e do polissorbato 80 (lineares), a interação entre estes dois fatores mostrou-se significativa também (Figura 26, b). Resumidamente, para os dois fermentados em questão, há um acréscimo no rendimento do ALac quando tais variáveis migram do nível -1,41 ao nível 1,41.

(a)



(b)

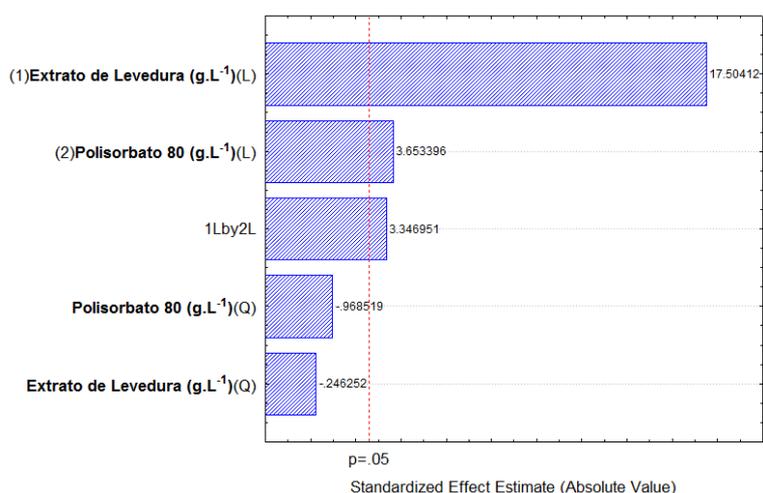


Figura 26 – Diagramas de Pareto obtidos a partir do delineamento composto central rotacional envolvendo ensaios fermentativos com *L. rhamnosus*, empregando hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl (a) e com 2,2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b), tendo como variável resposta a produção de ácido láctico.

As representações gráficas das respostas, dispostas nas Figuras 27 e 28, relativas às investigações da produção de ALac a partir de fermentados contendo hidrolisados com 2,2% de HCl e com 2,2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente, auxiliam na interpretação dos resultados.

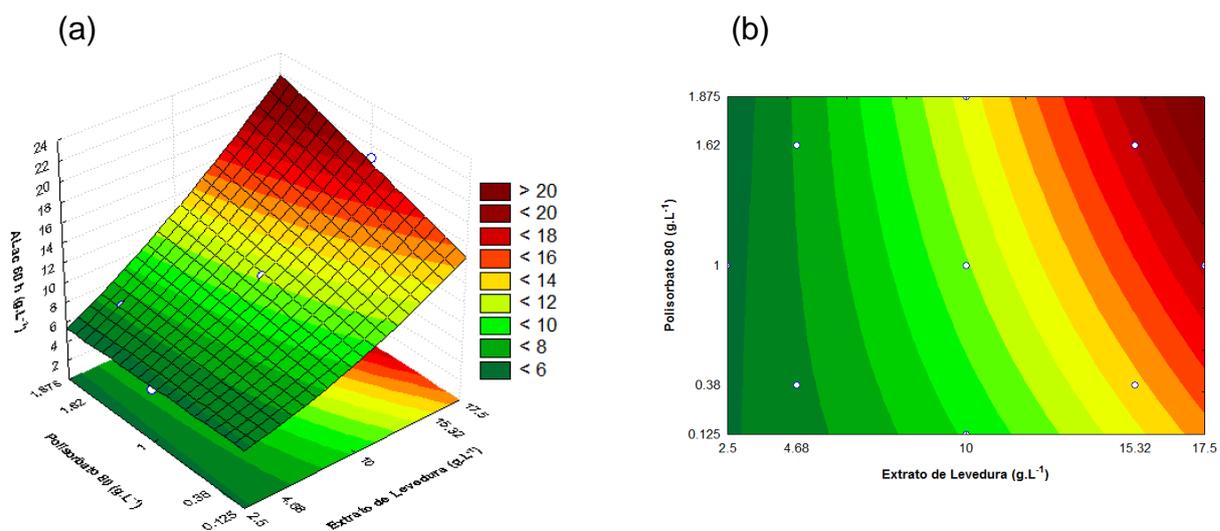


Figura 27 – Superfície de resposta (esq.) e curva de contorno (dir.) para a concentração de ácido láctico 60 h ( $\text{g L}^{-1}$ ) envolvendo fermentações com *L. rhamnosus* a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl, em função das concentrações de extrato de levedura x polissorbato 80 (a) e (b).

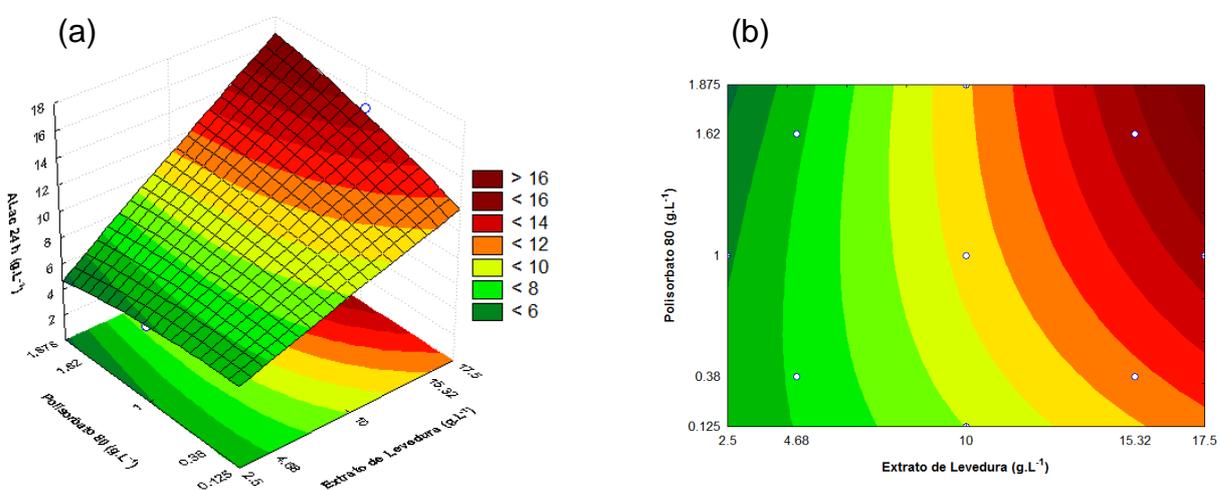


Figura 28 – Superfície de resposta (esq.) e curva de contorno (dir.) para a concentração de ácido láctico 24 h ( $\text{g L}^{-1}$ ) envolvendo fermentações com *L. rhamnosus* a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , em função das concentrações de extrato de levedura x polissorbato 80 (a) e (b).

Segundo Qi *et al.* (2009), a complementação do meio de cultivo com polissorbato 80 desencadeia um efeito significativo para a produção de ALac

empregando-se *L. casei*. Tal surfactante, a uma concentração de  $0,7 \text{ g L}^{-1}$ , exibiu um desempenho ligeiramente superior em comparação àquele com  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . O estudo revelou, também, que a quantidade de extrato de levedura pode ser reduzida de  $10,0 \text{ g L}^{-1}$  para  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  quando  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  de polissorbato 80 é adicionado, mantendo-se a mesma conversão dos açúcares e a produção de ALac.

Em vista do que foi exposto acima, optou-se em avaliar a interação entre as concentrações de extrato de levedura e de polissorbato 80 durante a atuação de *L. rhamnosus* na produção de ALac. No entanto, para este trabalho, as Figuras 13 e 14 (a) e (b) revelam que quanto maiores as concentrações de ambas as variáveis, maiores serão os rendimentos de ALac obtidos com *L. rhamnosus*.

A partir dos resultados provenientes do delineamento experimental do fermentado, selecionou-se o experimento n° 4 e tal fermentação foi refeita a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 h. O acompanhamento do crescimento celular em meio comercial MRS e em hidrolisados da CA contendo HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  está disposto na Figura 29. Conforme previsto, o crescimento da cepa foi superior nos hidrolisado com HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uma vez que estes substratos foram suplementados com extrato de levedura e possuíam quantidades elevadas de açúcares em comparação ao meio MRS.

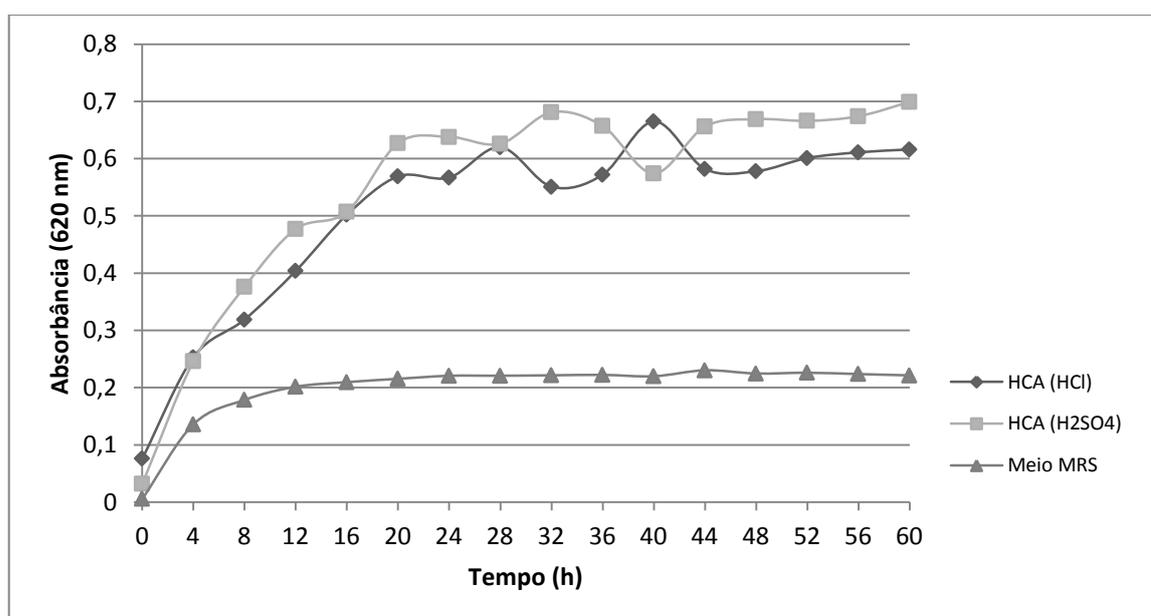


Figura 29 – Perfis do crescimento de *L. rhamnosus* em meio MRS e em hidrolisados da casca de arroz com 2,2% de HCl e com 2,2% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (diluição 1:10), durante 60 h.

A cinética de produção de ALac e consumo de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante a fermentação de *L. rhamnosus* ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a partir de hidrolisado da CA com HCl (a) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b) suplementado com nutrientes (experimento n° 4:  $15,3\text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,6\text{ g L}^{-1}$  de polissorbato 80) está evidenciada na Figura 30.

A Figura 30 indica que a concentração de ALac aumenta com o tempo de fermentação. Para o hidrolisado com HCl (a), a máxima produção de ALac,  $18,8\text{ g L}^{-1}$  ( $\bar{u} = 2, \sigma = 0,6$ ), com rendimento de  $997,1\text{ mg ALac g}^{-1}$  açúcar, ocorreu após 52 h; enquanto que para o hidrolisado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b), a máxima produção de ALac,  $14,6\text{ g L}^{-1}$  ( $\bar{u} = 2, \sigma = 0,45$ ), com rendimento de  $999,8\text{ mg ALac g}^{-1}$  açúcar, ocorreu após 24 h. De certa maneira, o meio hidrolisado da CA com HCl apresenta, além do próprio Cl, toxinas que retardam a produção do ALac – diferentemente do meio hidrolisado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , que apesar de também conter substâncias inibidoras, possui sulfato em sua composição, sendo benéfico ao crescimento microbiano.

Como a biomassa lignocelulósica contém uma variedade de outros açúcares, além de glicose e xilose, é altamente vantajoso, do ponto de vista econômico, que todos estes açúcares sejam catabolizados pelo micro-organismo. Nos ensaios fermentativos, o tempo requerido para a fermentação completa, ou total utilização do substrato, geralmente aumenta com o aumento da concentração de açúcares presentes no meio. Este é um indício de que determinados componentes no hidrolisado são potencialmente inibidores do processo fermentativo láctico.

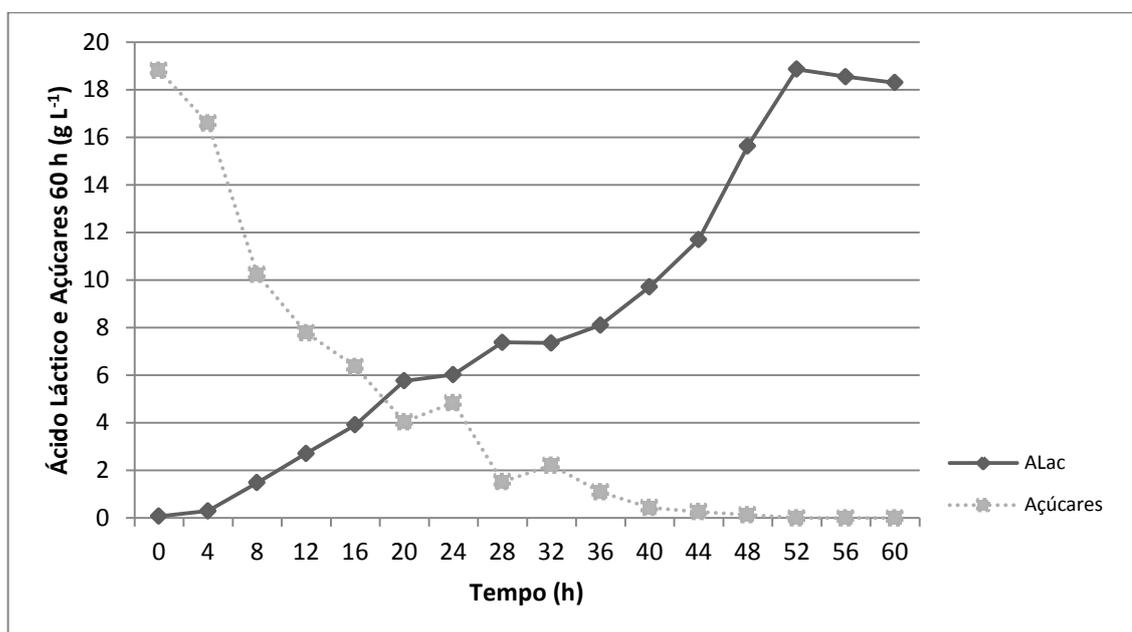
Iyer, Thomas & Lee (2000) produziram ALac a partir de hidrolisados (com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído) de madeira macia empregando *L. rhamnosus* ATCC 10863, via fermentação em batelada por 144 h, a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tendo o pH controlado a 5,7 com  $\text{CaCO}_3$ . O micro-organismo em questão consome primeiramente glicose e, após, manose, seguido da utilização quase que simultânea de xilose e galactose, sendo que a arabinose é inutilizada. A fermentação desta cepa caracteriza-se por uma fase lag de adaptação com duração de 24-72 h, previamente ao consumo da xilose. O ácido acético é o subproduto principal formado, correspondendo a cerca de 10% da produção do ALac. Os autores verificaram, ainda, que este micro-organismo exibe uma elevada tolerância às toxinas, sendo capaz de fermentar os distintos açúcares presentes no hidrolisado de madeira macia, tratada com ácido, resultando em rendimentos similares àqueles com açúcares puros, porém, a um ritmo mais lento de consumo. Entretanto, a fermentação foi inibida pela produção do ALac mesmo havendo controle do pH. Em alguns casos, além dos açúcares presentes no próprio

hidrolisado, os autores adicionaram, no decorrer da fermentação, glicose, xilose, manose, galactose e arabinose, totalizando 29 g L<sup>-1</sup>. Em outros, houve a adição inicial de extrato de levedura (30 g L<sup>-1</sup>). A concentração final de ALac foi de 70 g L<sup>-1</sup>.

Em condições otimizadas de fermentação láctica em batelada, por 60 h, a 42 °C, 150 rpm, pH 6,0, empregando *L. rhamnosus* ATCC 10863, Kwon *et al.* (2000) substituíram com êxito 15 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura por 19,3 g L<sup>-1</sup> de hidrolisado de farelo de soja suplementado com vitaminas do complexo B (biotina, ácido nicotínico, ácido para-aminobenzóico (PABA), ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina e tiamina), resultando na produção de 125 g L<sup>-1</sup> de ALac a partir de 150 g L<sup>-1</sup> de glicose. Neste trabalho, os autores reportaram uma nova fonte de nitrogênio promissora, capaz de substituir completamente o extrato de levedura – o farelo de soja contém baixos teores de vitaminas em relação ao extrato de levedura, entretanto, o custo inferior deste substrato torna-o atrativamente econômico para a produção de ALac caso o custo total referente a suplementação de vitaminas do complexo B seja insignificante.

No melhor do nosso conhecimento, nenhum trabalho na literatura fez uso da CA para a produção de ALac, via *L. rhamnosus* ATCC 10863. Ademais, pouquíssimas pesquisas foram conduzidas com esta mesma LAB empregando biomassas em geral. Este estudo não teve a intenção de produzir ALac em grande quantidade, mas somente demonstrar a possibilidade de produção de um bioproduto com projeção de crescimento expressivo a partir de fontes renováveis e subutilizadas, em semi-micro escala em laboratório não-microbiológico. Também não houve preocupação em comparar-se os dados aqui apresentados com os da literatura, uma vez que as condições operacionais são complexas e distintas: biomassas utilizadas, pré-tratamentos, hidrólises (ácida/alcalina e/ou enzimática) envolvidas, adição ou não de nutrientes para a fermentação láctica, adição de açúcares no decorrer da fermentação, micro-organismo(s) empregado(s), modos de fermentação, etc.

(a)



(b)

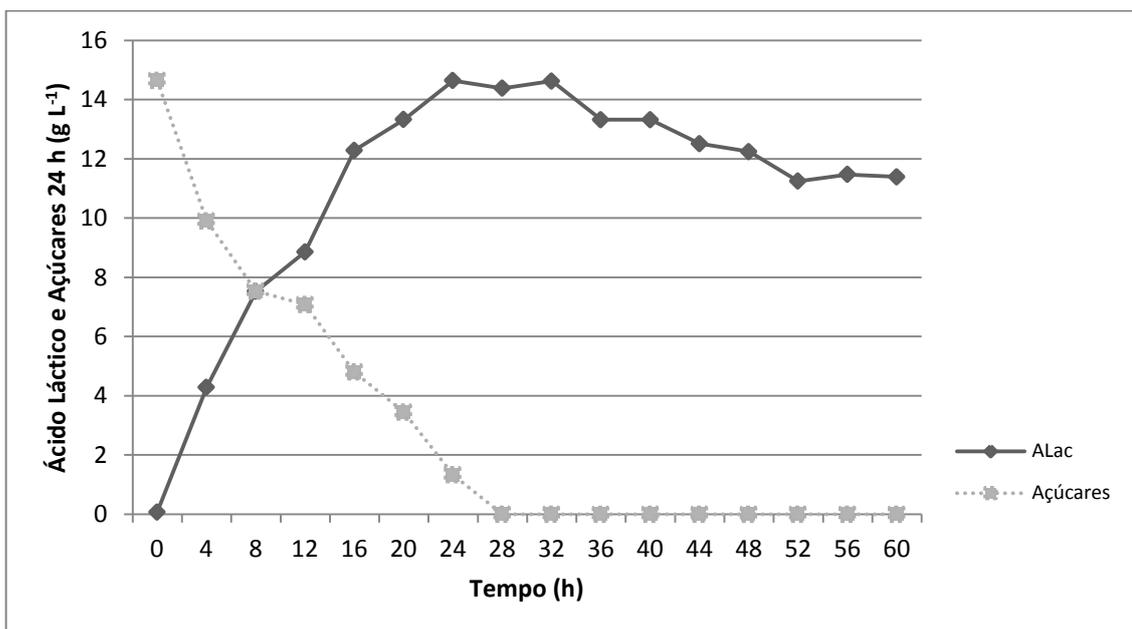


Figura 30 – Cinética da produção de ácido láctico e consumo de açúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante a fermentação láctica de *L. rhamnosus* ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a partir de hidrolisado da casca de arroz com 2,2% de HCl (a) e com 2,2% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (b) suplementado com nutrientes (experimento n<sup>o</sup> 4:  $15,3\text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $1,6\text{ g L}^{-1}$  de polissorbato 80).

### 4.3 Avaliação econômica preliminar da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz

Após o beneficiamento do arroz, cerca de 1,55 milhões t da casca foram produzidas no RS em meados da safra 2011/12. No entanto, a utilização adequada deste subproduto agroindustrial poderá contribuir para a sua valorização.

Com a finalidade de estabelecer um balanço econômico aproximado da produção de ALac a partir da CA foram estudados os investimentos necessários e os rendimentos brutos de tal processo, sem grande preocupação com a aderência à realidade industrial – variável e dependente de inúmeros fatores. Neste trabalho, a fermentação empregando hidrolisado com HCl diluído, mesmo sem a adição de nutrientes (ver experimento nº 1, Apêndice A), produziu de 5,6 g L<sup>-1</sup> de ALac, com um rendimento de 33,8 mg ALac g<sup>-1</sup> CA, correspondendo a 33,8 kg ALac t<sup>-1</sup> CA e produtividade de 58,7 mg ALac L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Deste modo, pode-se obter um máximo total de R\$ 7.436,00 t<sup>-1</sup> de ALac advindo da CA, uma vez que o valor comercial do ALac a 85% de pureza é de R\$ 220,00 kg<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich). Descontando-se as despesas com reagentes e desconsiderando-se o consumo energético, restam R\$ 1.136,00 t<sup>-1</sup> de CA processada (a matéria-prima CA ainda não tem valor no mercado atual). Todas estas informações estão inseridas na Tabela 13, a seguir.

Tabela 13 – Avaliação econômica da produção de ácido láctico a partir da casca de arroz.

Parâmetros	Saída			Entrada
	CA	HCl	Açúcares	ALac
Concentração	-	2,21% (v v <sup>-1</sup> )	15,8 g L <sup>-1</sup>	5,6 g L <sup>-1</sup>
Quantidade a ser processada	1 t	221 L	95,1 kg	33,8 kg
Valor (R\$)	-	6.300,00	Hidrolisado	7.436,00
<b>Saldo Total (Output-Input): R\$ 1.136,00</b>				

Assim, verifica-se que a produção de ALac proveniente da CA apresenta saldo positivo, demonstrando a viabilidade econômica do procedimento, ainda que o cálculo tenha sido feito de maneira aproximada, com os dados disponíveis.

Adicionalmente, uma série de outros produtos e subprodutos, advindos das etapas hidrolíticas e fermentativas, também são produzidos concomitantemente ao ALac, fazendo da CA uma matéria-prima com potencial valor agregado. Tal fato sugere que a utilização da CA precisa integrar uma visão multiproduto, explorando diversas correntes e processos, semelhantemente às refinarias de petróleo. Até porque, tem-se consolidada a ideia de que as biorrefinarias, produzindo bioprodutos, biocombustíveis e bioeletricidade, contribuiriam para viabilizar economicamente a exploração da biomassa e melhorar os resultados ambientais (balanço energético e redução da emissão dos gases do efeito estufa).

Torna-se necessário comentar, também, que os processos de separação e purificação do ALac, após a fermentação, são os maiores responsáveis pela elevação dos custos finais (GAO, MA & XU, 2011). Dentre tais processos, incluem-se: precipitação, destilação, extração por solvente, eletrodialise, osmose reversa e membranas líquidas surfactantes. Para corroborar esta afirmação, observa-se que a pureza máxima do ALac obtida é de 85%. Portanto, pesquisas envolvendo técnicas alternativas de recuperação visando reduzir custos são altamente desejáveis.

#### **4.4 Gerenciamento de resíduos**

No processo de produção do ALac a partir da CA, os resíduos provenientes da etapa hidrolítica ácida são armazenados para aproveitamento em trabalhos futuros, enquanto os resíduos biológicos da etapa fermentativa são previamente esterilizados antes do seu descarte. Os resíduos químicos oriundos das análises cromatográficas, caracterizados pelos reagentes em geral e solventes orgânicos, são, primeiramente, segregados e, após, encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da UFSM, responsável pela destinação final via empresa nacional, autorizada.

## 5 CONCLUSÕES

Uma vez que a biotecnologia oferece inovadoras possibilidades para a produção de insumos químicos a partir de processos mais limpos, os resultados apresentados aqui evidenciam, de fato, que a CA, biomassa residual do beneficiamento do arroz e sem valor agregado no mercado atual, possui apreciável potencial para ser empregada como matéria-prima alternativa na produção de bioprodutos, em particular, aqui, ALac. Além de contribuir para a mitigação do sério problema ambiental no RS, o presente trabalho buscou desenvolver uma alternativa econômica-industrial para o estado, de maneira inovadora (semi-micro escala), inserida no conceito de biorrefinaria.

A otimização da hidrólise da CA em sistema Berghof à pressão, com HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluídos, revelou que, experimentos conduzidos a 175 °C, por 46 min, com concentração de 2,2% (v v<sup>-1</sup>) de ácido, produziram os teores máximos de glicose. Para hidrólises envolvendo HCl, teor de 17,8 g de glicose L<sup>-1</sup>, com rendimento de 106,6 mg de glicose g<sup>-1</sup> CA; para hidrólises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, teor de 14,1 g de glicose L<sup>-1</sup>, com rendimento de 84,5 mg de glicose g<sup>-1</sup> CA. Todavia, os dados deste trabalho indicam claramente que a produção de compostos inibidores durante o tratamento hidrolítico da biomassa lignocelulósica é complexo, requerendo estudos prévios e uma consideração cuidadosa ao selecionar tratamento efetivo. A xilose, por exemplo, produzida nas condições acima, foi praticamente degradada em sua totalidade, com possível formação de furfural e, este, na formação de ácido fórmico. De modo geral, processos hidrolíticos a partir da CA empregando HCl resultaram em concentrações mais altas de glicose em relação àqueles empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Em relação à comparação dos resultados da quantificação de glicose via HPLC-RID e método enzimático, verificou-se que este último é vantajoso, caracterizando-se pela praticidade, por ser relativamente estável e pouco dispendioso, além da grande especificidade analítica.

Ensaio fermentativos prévios selecionaram micro-organismos resilientes e eficientes para a produção de ALac, e, também, avaliaram a necessidade de suplementação do hidrolisado da CA com nutrientes específicos (Apêndice A). *L. rhamnosus*, neste trabalho, foi a bactéria mais apropriada à fermentação láctica,

dentre os *Lactobacillus* testados, sendo capaz de produzir 5,6 g ALac L<sup>-1</sup>, com rendimento de 33,8 mg ALac g<sup>-1</sup> CA (hidrolisado com HCl, sem adição de nutrientes, 96 h de fermentação). A hidrólise ácida, neste caso específico, foi feita a 160 °C, por 70 min, com 4,0% HCl v v<sup>-1</sup>, gerando 14,7 g L<sup>-1</sup> de glicose.

De maneira a atender aos princípios da química verde, a fermentação láctica otimizada foi conduzida em vials de 4 mL, em batelada, a 37 °C, em pH inicial de 6,0, empregando-se *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 10863, cepa especializada em catabolização de hexoses e pentoses (exceto arabinose). Experimentos com hidrolisados da CA contendo 15,3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1,6 g L<sup>-1</sup> de polissorbato 80 produziram até 18,8 g ALac L<sup>-1</sup> (rendimento máximo de 997,1 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcares) em substrato hidrolisado com HCl, após 52 h de fermentação; e 14,6 g ALac L<sup>-1</sup> (rendimento máximo de 999,8 mg ALac g<sup>-1</sup> açúcares) em substrato hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, após 24 h de fermentação. Em geral, processos fermentativos a partir da CA empregando hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> requereram tempos mais curtos em relação àqueles empregando HCl.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que a conversão da CA para a produção de ALac demonstrou viabilidade técnica e econômica. A biotransformação deste resíduo agroindustrial foi conduzida em experimentos simples, envolvendo poucas etapas de processamento e empregando o mínimo possível de reagentes, a um custo bastante reduzido.

## 6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- i) Otimização do processo hidrolítico ácido da CA visando obter concentrações elevadas tanto de hexoses quanto de pentoses, uma vez que esta última é de extrema importância para processos fermentativos posteriores, empregando cepas microbianas capazes de catabolizar ambos os sacarídeos;
- ii) Concomitantemente à otimização dos açúcares fermentáveis provenientes da etapa acima, procurar produzir o mínimo de subprodutos possíveis, uma vez que estes contribuem para a inibição da fermentação, sendo necessário uma destoxificação do hidrolisado – estratégia que acarreta na elevação dos custos finais do processo;
- iii) Realização de uma hidrólise enzimática subsequente à ácida com o intuito de elevar ainda mais os teores de açúcares;
- iv) Todavia, o ideal seria a realização da sacarificação e fermentação simultâneas, diminuindo reagentes, tempo de execução, custos operacionais, etc., e colaborando ainda mais com os princípios da química verde;
- v) Testes para aperfeiçoar a fermentação láctica através da suplementação do hidrolisado da CA com vitaminas;
- vi) Recuperação do ALac a partir da sua separação e purificação;
- vii) De acordo com o conceito de biorrefinaria, utilizar integralmente os demais produtos/subprodutos provenientes da hidrólise ácida da CA, bem como a lignina remanescente na parte residual de tal processo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIROC, Y. & SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 286-301, 2011.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.

AMRANE, A. & PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 529-534, 1998.

ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M.; LEE, M. G. Elucidation of the effect of ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

ANTOLOVICH, M.; BEDGOOD JR., D. R.; BISHOP, A. G.; JARDINE, D.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. LC-MS Investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 962-971, 2004.

ANTUNES, A. M. de S. *et al.* **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. 434 p.

ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3. p. 1-11, 2010.

ARMESTO, L.; BAHILLO, A.; VEIJONEN, K.; CABANILLAS, A.; OTERO, J. Combustion behaviour of rice husk in a bubbling fluidised bed. **Biomass Bioenergy**, v. 23, p. 171-179, 2002.

BERTELLI, D.; PAPOTTI, G.; LOLLI, M.; SABATINI, A. G.; PLESSI, M. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in *Citrus* honeys. **Food Chemistry**, v. 108, p. 297-303, 2008.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

BOZELL, J. J. & PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – The US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, p. 539-554, 2010.

BUNGERT, D.; BASTIAN, S.; HECKMANN-POHL, D. M.; GIFFHORN, F.; HEINZLE, E.; THOLEY, A. Screening of sugar converting enzymes using quantitative MALDI-ToF mass spectrometry. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1025-1030, 2004.

BUSTOS, G.; DE LA TORRE, N.; MOLDES, A. B.; CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates trough continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 405-412, 2007.

CAPPIELLO, A.; SIMONI, E. de; FIORUCCI, C.; MANGANI, F.; PALMA, P.; TRUFELLI, H.; DECESARI, S.; FACCHINI, M. C.; FUZZI, S.. Molecular Characterization of the Water-Soluble Organic Compounds in Fogwater by ESIMS/MS. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 1229-1240, 2003.

CARLOS, R. M. & KHANG, D. B. Characterization of biomass energy projects in Southeast Asia. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 525-532, 2008.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 22 set. 2012.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. **Microbiology**, v. 153, p. 291-299, 2007.

CUI, F.; LI, Y. & WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1831-1836, 2011.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218-4225, 2011.

DAMARTZIS, T. & ZABANIOTOU, A. Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 366-378, 2011.

DATTA, R. & HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – A review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1119-29, 2006.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, v. 88, p. 17-28, 2011.

DERRINGER, G. & SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DIZHBITE, T.; TELYSHEVA, G.; DOBELE, G.; ARSHANITSA, A.; BIKOVENS, O.; ANDERSONE, A.; KAMPARS, V. Py-GC/MS for characterization of non-hydrolyzed residues from bioethanol production from softwood. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 90, p. 126-132, 2011.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P. & FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 259-276, 2011.

DU, B.; SHARMA, L. N.; BECKER, C.; CHEN, S.; MOWERY, R. A.; VAN WALSUM, G. P.; CHAMBLISS, C. K. Effect of varying feedstock–pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 430-440, 2010.

ECONOMOU, C. N.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D. V. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9737-9742, 2011.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 22 set. 2012.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65-76, 2010.

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR., U. L.; JAHN, S. L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 210-217, 2009.

GAO, T; WONG, Y; NG, C; HO, K. L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 105-110, 2012.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 930-939, 2011.

GIVRY, S.; PREVOT, V. & DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus biferrmentans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 745-752, 2008.

GULLÓN, P.; MOURA, P.; ESTEVES, M. P.; GIRIO, F. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7482-7487, 2008.

HALLAC, B. B. & RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, p. 215-225, 2011.

HATTI-KAUL, R.; TÖRNVALL, U.; GUSTAFSSON, L.; BÖRJEJESSON, P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – A cradle-to-grave perspective. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 119-124, 2007.

HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentations by a genetically engineered strains of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 786-792, 2003.

HOFVENDAHL, K. & HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, p. 87-107, 2000.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R. & TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v. 10, p. 315-319, 1980.

HUANG, Y.; WEI, Z.; QIU, Z.; YIN, X.; WU, C. Study on structure and pyrolysis behavior of lignin derived from corncob acid hydrolysis residue. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 93, p. 153-159, 2012.

ILMÉN, M.; KOIVURANTA, K.; RUOHONEN, L.; SUOMINEN, P.; PENTTILÄ, M. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 117-123, 2007.

INMETRO. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2010.

IYER, P. V.; THOMAS, S. & LEE, Y. Y. High-yield fermentation of pentoses into lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 665-677, 2000.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273-397.

JEON, Y. J.; XUN, Z. & ROGERS, P. L. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 518-524, 2010.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 145-153, 2009.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M. & PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 524-34, 2007.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J. L.;

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1765-1772, 2011.

KESHWANI, D. R. & CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1515-1523, 2009.

KIM, H. O.; WEE, Y. J.; KIM, J. N.; YUN, J. S.; RYU, H. W. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 694-704, 2006.

KIM, J.; BLOCK, D. E.; SHOEMAKER, S. P.; MILLS, D. A. Conversion of rice straw to bio-based chemicals: an integrated process using *Lactobacillus brevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p.1375-1385, 2010.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. & AHRING, B. K. 2004. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10-26, 2004.

KNAUF, M & MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, p. 147-150, 2004.

KONG, L.; LI, G.; WANG, H.; HE, W; LING, F. Hydrothermal catalytic conversion of biomass for lactic acid production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 383-388, 2008.

KURAKAKE, M.; IDE, N. & KOMAKI, T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. **Current Microbiology**, v. 54, p. 424-428, 2007.

KWON, S.; YOO, I. K.; LEE, W. G.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, p. 25-34, 2001.

KWON, S.; LEE, P. C.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v 26, p. 209-215, 2000.

LIAN, J.; CHEN, S.; ZHOU, S.; WANG, Z.; O'FALLON, J.; LI, C.; GARCIA-PEREZ, M. Separation, hydrolysis and fermentation of pyrolytic sugars to produce ethanol and lipids. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9688-9699, 2010.

LIM, J. S.; MANAN, Z. A.; ALWI, S. R. W.; HASHIM, H. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable Energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084-3094, 2012.

LITCHFIELD J. H. Microbiological production of lactic acid. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 45-95, 1996.

LUO, C.; BRINK, D. L. & BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolysate to ethanol. **Biomass Bioenergy**, v. 22, p. 125-138, 2002.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465. 1996.

MA, Y.; ZHAO, X.; ZHANG, H; WANG, Z. Comprehensive utilization of the hydrolyzed productions from rice hull. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 403-408, 2011.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 21 dez. 2010.

MARTÍN, C. & JÖNSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosacccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 386-395, 2003.

MARTINS, A. F.; DINIZ, J.; CARDOSO, A. L.; STAHL, J. A. Low temperature conversion of rice husks, eucalyptus sawdust and peach stones for the production of carbon-like adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1095-1100, 2007.

Mc MILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E., BAKER, J. O. & OVEREND, R. P. (eds). **Enzymatic conversion of biomass for fuel production**. Washington, DC: ACS, 1994. p. 292-324.

MEGAWATI; SEDIAWAN, W. B.; SULISTYO, H.; HIDAYAT, M. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2062-2067, 2010.

MENON, V. & RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MIN-TIAN, G.; KOIDE, M.; GOTOU, R.; TAKANASHI, H.; HIRATA, M.; HANO, T. Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1033-1036, 2005.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 396-400, 2003.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATTO, S. I. & ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K. & SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 167-179, 2004.

NJIE, D. Energy generation from rice residues - a review of technological options, opportunities and challenges. **International Rice Commission Newsletter**, v. 56, p. 33-43, 2007.

OCTAVE, S. & THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, p. 659-664, 2009.

OH, H.; WEE, Y.; YUN, J.; HAN, S. H.; JUNG, S.; RYU, H. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1492-1498, 2005.

OLIVEIRA, G. T.; HACK, C.; ALMERÃO, M.; BOND-BUCKUP, G.; DUTRA, B. K. Tissue composition and haemolymphatic metabolites during gonadal development in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda) maintained in experimental culture. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, p. 64-71, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid state fermentation in biotechnology: Fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001. 221 p.

PLESSAS, S.; BOSNEA, L.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5951-5955, 2008.

QI, B.; YAO, R.; LAI, M.; DENG, S. Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*. **Songklanakar Journal of Science and Technology**, v. 31, p. 85-89, 2009.

QIN, J.; WANG, X.; ZHENG, Z.; MA, C.; TANG, H.; XU, P. Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7570-7576, 2010.

QUIRÓS, A. R. de; LAGE-YUSTY, M. A. & LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. **Talanta**, v. 78, p. 643-646, 2009.

RAMBO, M. D. **Aproveitamento da casca de arroz para produção de xilitol e sílica xerogel**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

REDDY, G.; ALTAF, Md; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22–34, 2008.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

ROMANI, A.; YÁÑEZ, R.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4247–4254, 2008.

SAHA, B. C. & COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7500-7506, 2011.

SCHNEIDER, I. & HÖRNER, M. Aproveitamento da casca de arroz para a obtenção de álcool. **Ciência Rural**, v. 9, p. 319-327, 1979.

SIJBESMA, F. **White biotechnology: Gateway to a more sustainable future**. Brussels: EuropaBio, 2003.

SÖDERGÅRD, A., STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1123-1163, 2002.

SUXIA, R.; HAIYAN, X.; JINLING, Z.; SHUNQING, L.; XIAOFENG, H.; TINGZHOU, L. Furfural production from rice husk using sulfuric acid and a solid acid catalyst through a two-stage process. **Carbohydrate Research**, v. 359, p. 1-6, 2012.

TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TEJAYADI, S. & CHERYAN, M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 242-248, 1995.

THONGCHUL, N.; NAVANKASATTUSAS, S. & YANG, S. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 407-416, 2010.

TSAI, W. T.; LEE, M. K. & CHANG, Y. M. Fast pyrolysis of rice husk: Product yields and compositions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 22-28, 2007.

VARADARAJAN, S. & MILLER, D. J. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 845-854, 1999.

WANG, L.; ZHAO, B.; LIU, B.; YU, B.; MA, C.; SU, F.; HUA, D.; LI, Q.; MA, Y.; XU, P. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7908-7915, 2010.

WEE, Y. & RYU, H. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4262-4270, 2009.

WEE, Y. J.; KIM, J. N. & RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 163-172, 2006.

WEE, Y. J.; YUN, J. S.; KIM, D.; RYU, H. W. Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 431-435, 2006.

WEE, Y. J.; YUN, J. S.; PARK, D. H.; RYU, H. W. Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 71-74, 2004.

WEI, G.; GAO, W.; JIN, I.; YOO, S.; LEE, J.; CHUNG, C.; LEE, J. Pretreatment and saccharification of rice hulls for the production of fermentable sugars. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, 828–834, 2009.

XU, G. Q.; CHU, J.; WANG, Y. H.; ZHUANG, Y. P.; ZHANG, S. L.; PENG, H. Q. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2458-2463, 2006.

ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 367–375, 2008.

ZHENG, R.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; LEI, M.; HUANG, H. Direct and simultaneous determination of representative byproducts in a lignocellulosic hydrolysate of corn stover via gas chromatography – mass spectrometry with a Deans switch. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5319- 5327, 2011.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y. & ELANDER, R. T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 721-738, 2007.

## Apêndice

### Apêndice A – Experimentos prévios envolvendo a produção de ácido láctico a partir da casca de arroz

Previamente aos ensaios fermentativos descritos na seção 3.4, uma série de experimentos foi executada empregando distintas cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. sporoge*), bem como um co-cultivo envolvendo todas elas, com o intuito de avaliar a performance destas LABs na produção de ALac a partir do hidrolisado da CA com HCl, tratado com carvão ativo e com pH ajustado para 6,0, proveniente do ensaio hidrolítico no ponto central (4,0%  $v v^{-1}$  de HCl e incubação a 160 °C por 70 min). O tratamento dos hidrolisados ocorreu de maneira idêntica àqueles da seção 3.2.2 e os inóculos foram cultivados tal como na seção 3.3. As provas foram conduzidas em hidrolisados da CA puros e também suplementados com 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose, 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS e 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose mais 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS a 37 °C. Os resultados estão evidenciados na Figura 1.

Uma vez que *L. rhamnosus* foi responsável pelas maiores produções de ALac (5,1 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA puro, 11,8 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA suplementado com glicose, 13,1 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA adicionado de meio MRS e 15,7 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA suplementado com glicose e meio MRS), tal cepa foi selecionada para os experimentos futuros de fermentação. Para a análise dos efeitos das variáveis lineares, um delineamento fracionado 2<sup>4-1</sup> (8 experimentos) com a adição de 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, foi projetado visando a maior produção de ALac a partir de *L. rhamnosus* empregando hidrolisados da CA com HCl, decorrentes do experimento hidrolítico n° 4. Dentre as variáveis estudadas estão: temperatura (32-42 °C), pH (5,5-6,5), glicose (0-4,0%  $m v^{-1}$ ) e meio MRS (0-30,0%  $m v^{-1}$ ). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 1.

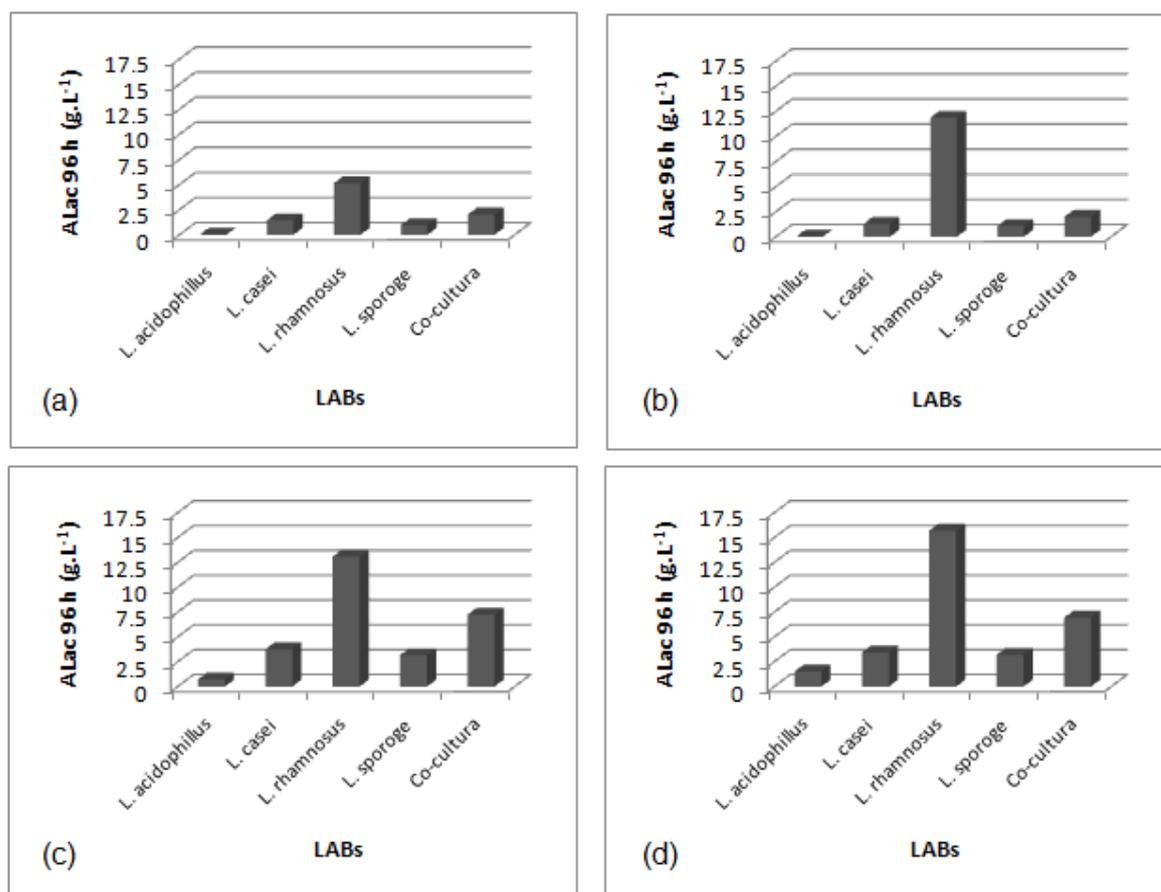


Figura 1 – Desempenho de distintas bactérias produtoras de ácido láctico na fermentação láctica conduzida em hidrolisados da casca de arroz com HCl (a) e também suplementados com 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose (b), 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS (c) e 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose mais 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS (d) a 37 °C.

Tabela 1 – Valores utilizados no delineamento fracionado para a determinação da produção de ácido láctico.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	32	37	42
pH	5,5	6,0	6,5
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	2,0	4,0
Meio MRS	0	15	30

O estudo da matriz contida na Tabela 2 revelou informações estatísticas significativas a um intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ). O modelo ajustado está disposto na equação abaixo, representando os ensaios fermentativos com

hidrolisados da CA contendo HCl que descrevem as concentrações de ALac previstas pelo modelos matemáticos em função das variáveis independentes já citadas, abrangendo apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos.

$$ALac (g L^{-1}) = 10,257 + 3,169 Curvatura + 2,650 Glicose + 2,955 MRS$$

Tabela 2 – Resultados do delineamento fracionado para produção de ácido láctico, após 96 h de fermentação com *L. rhamnosus*, empregando hidrolisado da casca de arroz com HCl.

Experimentos	Temperatura (°C)	pH	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Meio MRS (%)	C <sub>Alac</sub> 96 h (g L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	-1	5,6
2	1	-1	-1	1	11,3
3	-1	1	-1	1	10,2
4	1	1	-1	-1	3,25
5	-1	-1	1	1	15,2
6	1	-1	1	-1	9,5
7	-1	1	1	-1	10,8
8	1	1	1	1	16,15
9	0	0	0	0	13,8
10	0	0	0	0	13,4
11	0	0	0	0	13,1

Concentração de Alac (C<sub>Alac</sub>).

O resultado da ANOVA para o comportamento dos hidrolisados com HCl, avaliados durante a fermentação láctica, está disposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise de variância para o parâmetro ácido láctico.

Tratamento	Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F <sub>calculado</sub>
HCl *	Regressão	148,45	3	49,48	70,7
	Resíduos	4,9	7	0,7	
	Total	153,35	10		

\*  $r^2 = 96,8\%$  e  $F_{3,7;0,1} = 3,07$ .

Através da ANOVA percebe-se que, como o valor do  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão (70,7) é significativo ( $p < 0,1$ ) e a porcentagem de variação explicada ( $r^2$ ) pelo modelo matemático foi satisfatória, 96,8%, conclui-se que o modelo se ajusta adequadamente aos dados experimentais.

A Figura 2 apresenta o diagrama de Pareto para os fermentados com HCl, contendo os valores do teste  $t$  para cada uma das variáveis independentes. As concentrações do meio MRS e de glicose, bem como o estudo da curvatura possuem efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ) e positivos na fermentação láctica. Percebe-se que há um acréscimo no rendimento do ALac quando tais variáveis migram do nível -1 ao nível 1. A significância da curvatura indica a necessidade da adição dos pontos axiais no planejamento em questão.

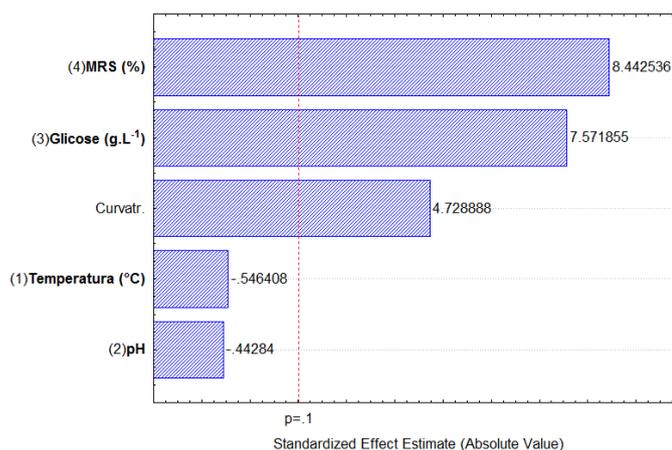


Figura 2 – Diagrama de Pareto obtido a partir do delineamento fracionado envolvendo ensaios fermentativos com *L. rhamnosus* e empregando hidrolisado da casca de arroz com HCl, tendo como variável resposta a produção de ácido láctico.

Os perfis de crescimento de *L. rhamnosus* em meio MRS e em hidrolisados da CA com HCl puro, referente ao experimento n° 1, durante 60 h, estão evidenciados na Figura 3. Conforme esperado, o crescimento da cepa foi inferior no hidrolisado com HCl, uma vez que este substrato não foi suplementado com nutrientes e possuía quantidade inferior de glicose em relação ao meio MRS.

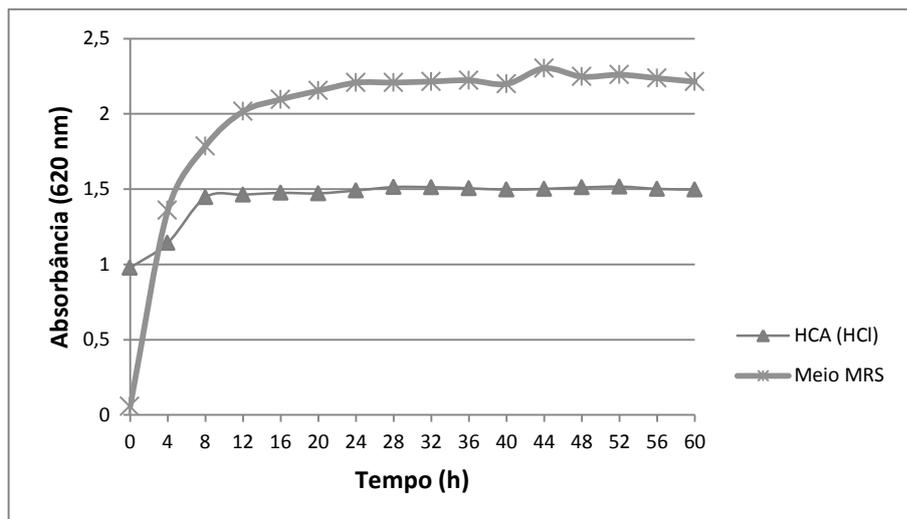


Figura 3 – Perfis do crescimento de *L. rhamnosus* em meio MRS e em hidrolisado da casca de arroz com HCl puro, durante 60 h.