UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

GUILHERME SOARES CAVALCANTE

Avaliação da Produção de Ácido Lático a Partir de Manipueira e Microrganismos Autóctones em Sistemas Anaeróbios

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2021

GUILHERME SOARES CAVALCANTE

avaliação da produção de ácido lático a partir de manipueira e microrganismos autóctones em sistemas anaeróbios

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

C376a

Cavalcante, Guilherme Soares
Avaliação da produção de ácido lático a partir de manipueira e microrganismos autóctones em sistemas anaeróbios / Guilherme Soares Cavalcante; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2021.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

1. Ácido lático. 2. Manipueira. 3. Reatores anaeróbios. 4. RALFE. 5. BAL. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **GUILHERME SOARES CAVALCANTE.**

Título da tese: "Avaliação da produção de ácido lático a partir de manipueira e microrganismos autóctones em sistemas anaeróbios".

Data da defesa: 22/10/2021.

Comissão Julgadora	**Resultado**
Prof. Titular **Marcelo Zaiat** **(Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)	Aprovado
Profa. Associada **Giovana Tommaso** (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)	Aprovado
Prof. Dr. **Márcio Gomes Barboza** (Universidade Federal de Alagoas/UFAL)	Aprovado
Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes** (Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)	Aprovado
Prof. Dr. **Dagoberto Yukio Okada** (universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Elizabete, meu maior exemplo de determinação, pelo amor e apoio incondicionais.

À minha irmã, Evellyn, minha referência nos estudos e incentivadora. À Vaneza, Elisa, Cleuda, Selma e Gabriel.

Ao professor Marcelo Zaiat, por confiar a mim este trabalho. Obrigado por orientar com paciência e bastante compreensão. Após esses 7 anos de conversas sobre manipueira, ácido lático e a vida, considero-o um amigo e conselheiro.

À Mirian e Natália pela amizade e por fazerem o trabalho diário no laboratório ser mais leve.

À minha amada galera do Sanca Badalada: Alejandra, Juliane, Ju Argente, Ju Silva, Ju Pessin, Carol Granatto, Ulisses, Raíssa, Wesley, Rodrigo, Moara, Sayuri, Carolina, Giz, Inaê, Tainá, Cebola, Mayara, Alana. Obrigado por serem minha família em São Carlos.

Aos professores Marcio Barboza, Ivete Vasconcelos e Eduardo Lucena, meus incentivadores iniciais à pesquisa na graduação. Obrigado pelo apoio, incentivo e, principalmente, por cederem o laboratório para eu continuar a pesquisa em Maceió.

Ao corpo técnico do Laboratório de Processos Biológicos, Carol Sabatini, Janja Adorno, Isabel Sakamoto e Eloisa Pozzi. Muito obrigado pelo auxílio e disposição em ajudar!

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, pelo auxílio e prestação de informações sempre que solicitado.

Aos funcionários da Indústria de Farinha Plaza e à Indústria do sr. João, em Taquarana, pela disponibilidade em fornecer a manipueira necessária ao trabalho.

À Companhia Brasileira de Trens Urbanos, por apoiar a finalização deste trabalho, flexibilizando minha carga horária, para finalizar os experimentos, sempre que solicitado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2016/03470-6) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo nº 130929/2015-8) pelo auxílio financeiro.

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

À Escola de Engenharia de São Carlos e à Universidade de São Paulo por proporcionarem um ambiente tão propício para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos e todas que contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

CAVALCANTE, G. S. 2021. **Avaliação da produção de ácido lático a partir de manipueira e microrganismos autóctones em sistemas anaeróbios**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ácido lático é utilizado nas mais variadas aplicações, sendo uma das principais a fabricação do ácido polilático (PLA), um polímero termoplástico, com boas características mecânicas, biocompatível e biodegradável, potencial substituto dos polímeros derivados de indústrias petroquímicas. Elevado preço de produção, caracterizada pela fermentação de carboidratos refinados por microrganismos específicos em meios esterilizados, é o limitante para tornar o PLA competitivo no mercado de polímeros. A manipueira, resíduo líquido gerado na fabricação de derivados da mandioca, é um potencial substrato para produção de ácido lático, por possuir alto teor de carboidratos simples solúveis e contar com uma cultura autóctone de bactérias produtoras de ácido lático. Nesse sentido, o objetivo geral da pesquisa foi avaliar a possibilidade de produção de ácido lático em reatores anaeróbios utilizando manipueira e sua cultura mista autóctone. Para isso, esse trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, foi realizada uma avaliação preliminar da fermentação da manipueira bruta em ensaios em batelada. O principal objetivo foi identificar os produtos gerados na fermentação da manipueira utilizando sua composição natural. A influência da temperatura no processo também foi avaliada. A segunda etapa objetivou a identificação das condições de pH inicial e temperatura mais favoráveis para produção de ácido lático, utilizando a metodologia de superfície de resposta. Também foi realizada modelagem da cinética do processo na condição mais favorável, a fim dimensionar racionalmente o reator contínuo utilizado na etapa subsequente. Na etapa 3, um reator anaeróbio de leito fixo estruturado (RALFE) foi operado para avaliar a possibilidade de produção contínua de ácido lático utilizando manipueira bruta apenas com o ajuste do pH de alimentação. A influência da aplicação de três diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH) no processo também foi avaliada. Os resultados obtidos na primeira etapa demostraram que apenas produtos associados à fermentação lática são produzidos, sendo identificados apenas ácido lático, etanol e ácido acético. A variação da temperatura influenciou o processo, com seletividades do ácido lático (S_{AL}) diferentes para cada condição testada. A análise da superfície de resposta obtida na etapa 2 permitiu observar que a interação do pH inicial e temperatura de fermentação possui efeito negativo nas variáveis S_{AL} e rendimento de ácido lático (Y_{AL}), ou seja: em temperaturas maiores, o aumento do pH inicial não favoreceu essas variáveis, enquanto em temperaturas mais baixas S_{AL} e Y_{AL} foram favorecidas com o aumento do pH inicial. Comparando os valores de Y_{AL}, a condição mais favorável de temperatura e pH inicial foi pH de 4,5 e temperatura de 35º C, com concentração máxima de ácido lático de 200 mmol AL.L^{-1} no 15º dia de fermentação, S_{AL} de 0,9 e Y_{AL} de 0,9 g DQO_{AL}.g^{-1} DQO_{Ch}. Houve produção contínua de ácido lático durante toda a operação do RALFE. Cargas de carboidratos aplicada (CCh_a) superior a 4 g Ch.L^{-1}.dia^{-1} não influenciaram na vazão mássica de ácido lático produzido, com valor da assíntota aproximado de 60 g AL.dia^{-1}. Redução do TDH para 8 h, com CCh_a entre 4 e 7 g Ch. L^{-1}.dia^{-1}, resultou na produção de ácido propiônico, que influenciou negativamente na S_{AL} e Y_{AL}. Com os resultados obtidos, foi estimado que para cada tonelada de mandioca processada há o potencial de produção de 6 kg de AL. Os resultados obtidos mostram que há grande potencial de produção

de ácido lático em reatores anaeróbios, utilizando apenas manipueira e sua cultura autóctone microbiana.

Palavras-chave: Ácido lático. Manipueira. Reatores anaeróbios. RALFE. BAL.

ABSTRACT

CAVALCANTE, G. S. 2021. **Assessment of lactic acid production using cassava wastewater and autochthonous microrganisms in anaerobic systems.** Thesis (PhD in Hydraulics and Sanitation) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Lactic acid has a wide range of applications, one of such is the production of polylactic acid (PLA). PLA is a thermoplastic, biocompatible and biodegradable polymer with good mechanical properties, with potential to compete with other polymer made of petrochemical sources. Utilization of refined sugars by pure microorganisms in sterile media are the most important drawbacks in lactic acid production. Cassava wastewater has the potential to be a suitable substrate for lactic acid production, due to its high carbohydrates content and presence of lactic acid bacteria (LAB). The objective of this study was to assess the feasibility of lactic acid production using cassava wastewater and autochthonous microorganisms in anaerobic reactors. Three experimental phases were performed. In the first phase, a preliminary batch test was conduct to identify the products generated during the fermentation of raw cassava wastewater. Influence of temperature was also investigated. In the second phase, response surface methodology (RSM) was utilized to obtain the best temperature and initial pH conditions for lactic acid production. The kinetics of the process was modelled to assist with the sizing of the continuous reactor. On the third phase, a Anaerobic Bioreactor with Fixed-Structured Bed (ABFSB) was operated to assess the continuous production of lactic acid using raw cassava wastewater in three different hydraulic retention time (HRT) conditions. Results show that the fermentation of cassava wastewater mainly results in lactic acid, ethanol and acetic acid. Lactic acid Selectivity (S_{AL}) was influenced by the different temperatures in phase 1. Results from the RSM indicate that 35º C and initial pH of 4.5 was the best condition for lactic acid yield (Y_{AL}), resulting in values of 200 mmol.L^{-1}, 0.9 and 0.9 for maximum lactic acid concentration, S_{AL} and Y_{AL}, respectively. Continuous lactic acid production was maintained during all ABFSB operation. CCh_a values above 4 g Ch.L^{-1}.day^{-1} did not result in significant change in the Q_{AL}, with value of 60 g AL.day^{-1}. TDH drop to 8 h, with CCh_a values between 4 and 7 g Ch.L^{-1}.day^{-1}, resulted in the production of propionic acid, which reduced S_{AL} and Y_{AL}. It was estimated that each ton of processed cassava roots has the potential do produce 6 kg of LA. These results show that cassava wastewater has a great potential of lactic acid production using autochthonous microorganisms.

Keywords: Lactic acid. Cassava wastewater. Anaerobic reators. ABFSB. LAB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 - Crescimento da produção mundial das principais culturas alimentares.32

Figura 3-2 - Produção e área produtora de mandioca nas regiões do Brasil em 2019 33

Figura 3-3 - Principais usos da árvore de mandioca, de acordo com cada parte da planta 34

Figura 3-4 - Estrutura dos isômeros do ácido lático 38

Figura 3-5 - Rotas metabólicas na produção de ácido lático. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação ácida mista (C). F = fosfato, BF = bifosfato, LDH = lactato desidrogenase, PFL = piruvato formiato liase e PDH = piruvato desidrogenase.....44

Figura 4-1 - Representação gráfica da variação da concentração de substrato com o tempo para reação irreversível de primeira ordem.....60

Figura 4-2- Desenho esquemático do RALFE.....63

Figura 4-3 – Sistema de controle de temperatura utilizado na Etapa 3.....64

Figura 4-4 – Cilindros de polietileno de alta densidade (MOD940, Ambio Eng. LTDA) como suporte para imobilização da biomassa na Etapa 3 65

Figura 5-1 – Etapa 1: Produtos da fermentação de manipueira a diferentes temperaturas. A: 25° C, B: 30° C e C: 36° C. AL (■), EtOH (▲) e AA (●) 73

Figura 5-2 – Etapa 1: Seletividade do ácido lático com relação aos outros produtos. 25° C (■), 30° C (▲) e 36° C (●) 74

Figura 5-3- Etapa 2: Variação da C_{AL} ao longo do tempo de fermentação em função de diferentes temperaturas valores de pH. Gráficos **A**, **B** e **C** mostram a variação do pH (● 4,5; ■ 5,5; e ▲ 6,5) nas temperaturas **A**: 25° C, **B**: 30° C e **C**: 35° C. Gráficos **D, E** e **F** mostram a variação da temperatura (● 25° C; ■ 30° C; e ▲ 35° C) nos diferentes valores de pH **D**: 4,5, **E**: 5,5 e **F**: 6,5.....76

Figura 5-4 – Etapa 2: Variação do pH ao longo da fermentação. A: 25° C, B: 30° C e C: 35° C. ● pH inicial 4,5; ■ pH inicial 5,5; e ▲ pH inicial 6,5.....79

Figura 5-5- Etapa 2: Produtos de fermentação ao longo do tempo. A (25°C, pH 4,5), B (25°C, pH 5,5), C (25°C, pH 6,5), D (30°C, pH 4,5), E (30°C, pH 5,5), F (30°C, pH 6,5), G (35°C, pH 4,5), H (35°C, pH 5,5) e I (35°C, pH 6,5). ●AL, ■ EtOH e ▲ AA 82

Figura 5-6 – Seletividade do AL com relação aos produtos de fermentação (AL, AA e EtOH) após 10 dias de fermentação. ■ 25° C, ■30° C ■ 35° C 83

Figura 5-7 – Etapa 2: Balanço de DQO para as diferentes condições de temperatura (**A**: 25° C, **B**: 30° C e **C**: 35° C) e pH. ■ carboidratos solúveis, ■ proteína, ■ ácido lático, ■ etanol, ■ ácido acético, ■ outros 84

Figura 5-8 – Etapa 2: Fatores e interações significativas apresentados pelos diagramas de Pareto dos efeitos normalizados para A): SAL; e B) YAL 87

Figura 5-9 – Etapa 2: Superfície de resposta e gráfico de contorno para PFC criado usando o modelo quadrático. Variável dependente: rendimento de ácido lático (YAl, g $DQO_{AL}.g^{-1}$ DQO). R^2=0,87. Coeficientes que não foram estatisticamente significativos (p-valor > 0,05) foram removidos antes da plotagem da superfície 89

Figura 5-10 – Etapa 2: Representação gráfica da variação da concentração substrato com o tempo a partir dos dados medidos de carboidratos solúveis (○) e o modelo linear ajustado (−) da condição com temperatura 35º C e pH de 4,5 90

Figura 5-11- Etapa 2: Relação entre TDH e Xs obtida a partir da Eq. 16, com valor de Cx de 20,6 g $SSV.L^{-1}$ 91

Figura 5-12 – Etapa 2: Estrutura da comunidade microbiana na amostra de manipueira bruta (inóculo) em A) nível de gênero; e B) nível de unidades taxonômicas operacionais (OTU). A abundância relativa foi calculada pela divisão do número de sequências de cada gênero ou OTU pelo total de sequências de bactéria 93

Figura 5-13 – Etapa 2: Teste Gram (esquerda) e microscopia de contraste de fases (direita) das amostras na condição 25°C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5 94

Figura 5-14 – Etapa 2: Teste Gram (esquerda) e microscopia (direita) das amostras na condição 30° C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5..... 95

Figura 5-15 – Teste Gram (esquerda) e microscopia (direita) das amostras na condição 35°C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5 da Etapa 2 97

Figura 5-16 – Etapa 3: Série de dados de Q_{AL} nas três condições de TDH testadas98

Figura 5-17 – Etapa 3: Série de dados de $CCha$ (■) e CAL (○) ao longo do tempo de operação do RALFE 99

Figura 5-18 – Etapa 3: Variação de QAL com a $CCha$ 100

Figura 5-19 - Etapa 3: Dados experimentais (●) e dados modelados (-) da variação de QAL com $CCha$ 101

Figura 5-20 – Etapa 3: Variação da conversão de carboidratos (Xs) com a carga de carboidratos aplicada (Cha) 103

Figura 5-21 – Etapa 3: Influência da carga de carboidratos aplicada ($CCha$) no rendimento de ácido lático (YAL) 104

Figura 5-22 – Etapa 3: Boxplots de rendimento de ácido lático em diferentes faixas de carga de carboidratos aplicada 105

Figura 5-23 – Etapa 3: Produtos de fermentação na operação do RALFE. Ácido lático (○), etanol (■), ácido acético (▲) e ácido propiônico (◊) 106

Figura 5-24 – Etapa 3: Variação de SAL com relação a $CCha$ 107

Figura 5-25 – Etapa 3: Relação entre os isômeros de ácido lático da manipueira: nas coletas realizadas, afluente ao RALFE e da manipueira fermentada efluente ao RALFE. “Coletas” representa amostras de manipueira bruta; “Afluente” refere-se a amostras de manipueira alimentadas ao reator após o descongelamento; e “Efluente” refere-se a amostras de manipueira efluentes ao reator 109

Figura 5-26 – Etapa 3: Abundância relativa das principais *taxa* observadas nas amostras de biomassa suspensa e de biomassa aderida ao material suporte (cilindros MOD940). As amostras foram coletadas do RALFE ao final da operação 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1 - Maiores produtores de mandioca em 2018 32

Tabela 3-2 - Características de manipueiras provenientes da fabricação de farinha de mandioca em diferentes estudos 36

Tabela 3-3 – Características físico-químicas do ácido lático 39

Tabela 4-1 - Condições operacionais aplicadas ao RALFE durante a Etapa 3 64

Tabela 4-2 - Equivalente DQO para os compostos de interesse 67

Tabela 5-1 – Caracterização da manipueira coletada em Santa Maria da Serra, utilizada nas Etapas 1 e 2 do trabalho 71

Tabela 5-2 – Etapa 2: Rendimento de ácido lático com relação a carboidratos solúveis nas condições de temperatura e pH testadas 85

Tabela 5-3 – Etapa 2: Relação entre os isômeros do ácido lático nas condições de temperatura e pH testadas 85

Tabela 5-4 – Etapa 2: Resultado da ANOVA com nível de significância de 5% para o ajuste do modelo quadrático para os resultados de SAL 88

Tabela 5-5 – Etapa 2: Resultado da ANOVA com nível de significância de 5% para o ajuste do modelo quadrático para os resultados de YAL da Etapa 2 88

Tabela 5-6 - Características da manipueira utilizada na etapa 3 em diferentes coletas 98

Tabela 5-7 – Etapa 3: Variação da relação entre os isômeros D e L-ácido lático nos TDH testados 107

Tabela 5-8 – Etapa 3: Sumário dos índices de diversidade do sequenciamento da biomassa suspensa e aderida do RALFE 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acético
AL	Ácido Lático
BAL	Bactérias produtoras de Ácido Lático
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
PAD	Polietileno de Alta Densidade
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PDLA	*Poly-d-Lactic Acid*
PDLLA	*Poly-d,l-Lactic Acid*
PET	Polietileno tereftalato
PFC	Planejamento Fatorial Completo
PLA	*Polylactic Acid*
PLLA	*Poly-l-Lactic Acid*
RALFE	Reator Anaeróbio de Leito Fixo Estruturado
RSM	*Response Surface Methodology*
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	*Up-flow Anaerobic Sludge Reactor*
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

C_{AA}	Concentração de ácido acético
C_{AL}	Concentração de ácido lático
C_{AL}^{f}	Concentração final de ácido lático
C_{AL}^{i}	Concentração inicial de ácido lático
C_{AL}^{e}	Concentração de ácido lático efluente
C_{AL}^{a}	Concentração de ácido lático afluente
C_{Ch}	Concentração de carboidratos
C_{ch}^{a}	Concentração de carboidrato afluente
C_{ch}^{e}	Concentração de carboidrato efluente
C_{ch}^{f}	Concentração de carboidrato final
C_{ch}^{i}	Concentração de carboidrato inicial
CCh_a	*Carga de carboidratos aplicada ao reator*
C_{EtOH}	Concentração de etanol
C_s	Concentração de substrato
C_s^0	Concentração inicial de substrato
C_s^{entra}	Concentração de substrato que entra no volume de controle
C_s^{sai}	Concentração de substrato que sai do volume de controle
C_x	Concentração de microrganismos
$\overline{C_x}$	Concentração média de microrganismos
k_1'	constante de velocidade específica
Q_{AL}	Vazão mássica de ácido lático
Q	Vazão
r_s	Velocidade de consumo de substrato
r_s'	Velocidade específica de consumo de substrato
S_{AL}	Seletividade de ácido lático
t	Tempo
t_0	Tempo inicial
V	Volume
X_s	Conversão de substrato
Y_{AL}	Rendimento de ácido lático

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25
1.1 Hipóteses de trabalho 26
1.2 Justificativa 27
2. OBJETIVOS 29
2.1 Objetivo geral 29
2.2 Objetivos específicos 29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 31
3.1 Mandioca – a cultura do século XXI 31
3.2 Manipueira – matéria-prima potencial 35
3.3 Ácido Lático 38
3.3.1 Produção de ácido lático 40
3.3.2 Bactérias produtoras de ácido lático 45
3.3.3 Fatores que afetam a produção biotecnológica de ácido lático 46
3.3.4 Produção de ácido lático a partir de manipueira 51
3.4 Considerações finais da revisão bibliográfica 53
4. Materiais e métodos 55
4.1 Etapas do trabalho 55
4.1.1 Etapa 1: estudos preliminares em reatores em batelada 55
4.1.2 Etapa 2: estudos de otimização e cinéticos 56
4.1.3 Etapa 3: operação do reator contínuo 61
4.2 Métodos analíticos 65
4.2.1 Avaliação do desempenho dos reatores 66
4.2.2 Análise da comunidade microbiana 68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 71

5.1 Etapa 1: estudos preliminares em reatores em batelada 71
5.1.1 Produtos da fermentação da manipueira 71
5.1.2 Concentração produzida de ácido lático 73
5.1.3 Seletividade do ácido lático 74
5.1.4 Tipo de fermentação 75
5.2 Etapa 2: estudos de otimização e cinéticos 76
5.2.1 Concentração produzida de ácido lático 76
5.2.2 Tipo de fermentação e seletividade 80
5.2.3 Balanço de DQO 84
5.2.4 Variação dos isômeros 85
5.2.5 Modelo empírico e análise de superfície de resposta 86
5.2.6 Análise cinética 89
5.2.7 Caracterização da comunidade microbiana 91
5.3 Etapa 3: operação do RALFE 98
5.3.1 Influência do TDH na produção de AL em RALFE 98
5.3.2 Produção de ácido lático durante a operação do RALFE 100
5.3.3 Conversão de carboidratos e rendimento de ácido lático 102
5.3.4 Produtos da fermentação da manipueira e seletividade 105
5.3.5 Variação dos isômeros de AL na operação do RALFE 107
5.3.6 Quantificação da biomassa aderida de biomassa suspensa 109
5.3.7 Caracterização filogenética da comunidade microbiana do RALFE 110
5.3.8 Potencial de produção de ácido lático em indústrias de farinha 113
6. CONCLUSÕES 116
7. SUGESTÕES 118
8. REFERÊNCIAS 120

1. INTRODUÇÃO

A manipueira é o líquido liberado da prensa da mandioca ralada para produção de derivados, como farinha de mandioca, e é caracterizada por apresentar alta concentração de matéria orgânica, principalmente carboidratos, e sólidos suspensos. Essas características tornam a manipueira uma ameaça ao meio ambiente, quando descartada de forma incorreta, principalmente se lançada diretamente em corpos de água. Ao mesmo tempo, contudo, a manipueira, assim como outros resíduos provenientes do processamento da mandioca, é considerada uma fonte renovável, de baixo custo e prontamente disponível para a produção de compostos de interesse comercial, a partir do conceito de biorrefinaria, como é o caso do ácido lático (AL) (ZHANG et al., 2016).

A relevância na produção de ácido lático está relacionada à sua grande versatilidade, com aplicação em diversas indústrias. Seu interesse tem aumentado por ser matéria-prima para a produção de ácido polilático (PLA, do inglês *poly-lactic acid*). O PLA, por sua vez, é um polímero biodegradável que pode ser utilizado em diversas aplicações na medicina e é matéria-prima para produção de plástico biodegradável (WANG et al., 2010).

Um dos principais obstáculos na produção de ácido lático é o custo da matéria-prima, que compreende, em sua maioria, açúcares puros, como glicose. Por se tratar de um produto de baixo valor, a utilização de açúcares refinados aumenta o custo de produção e, por isso, resíduos de processos industriais são estudados como possíveis substitutos. Redução da necessidade de uso de terra para culturas dedicadas e consequente diminuição da contribuição para insegurança alimentar são outros benefícios da utilização de resíduos como substratos para a produção de ácido lático (EITEMAN; RAMALINGAM, 2015; MUSSATTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2018).

Em geral, bactérias produtoras de ácido lático (BAL) são os principais organismos associados à fermentação espontânea da mandioca. Análise da comunidade microbiana presente na manipueira proveniente da produção de amido fermentado mostrou prevalência de BAL, especialmente do gênero *Lactobacillus*, as quais conseguem se desenvolver nas condições ácidas não suportadas por outros tipos de bactérias. Utilizar a comunidade microbiana autóctone é vantajoso para o

processo, pois, considerando efeitos sinergéticos, uma comunidade adaptada aumenta a estabilidade do processo, promove a degradação de partículas mais complexas e aumenta a tolerância ao ácido lático, além de não requerer suplementação nutricional (AMPE; SIRVENT; ZAKHIA, 2001; AVANCINI et al., 2007; DRESCHKE et al., 2015; LACERDA et al., 2005).

Temperatura e pH estão entre os parâmetros que mais influenciam a produção de ácido lático (HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000). Com isso, pesquisar como esses parâmetros influenciam no processo são pontos principais quando se trabalha com culturas mistas em meios complexos.

Nesse sentido, esta pesquisa se propôs a avaliar a produção de ácido lático utilizando manipueira como substrato e sua cultura microbiana autóctone. A manipueira já foi utilizada para produção de ácido lático com utilização de cultura pura de microrganismos e suplementação nutricional (COELHO et al., 2010; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010). Porém, a atual pesquisa é a única, pelo conhecimento do autor, em que a manipueira foi utilizada com sua composição original e com utilização de sua cultura autóctone.

1.1 HIPÓTESES DE TRABALHO

A idealização desta pesquisa surgiu a partir do trabalho realizado por Gomes et al. (2015), no qual a produção da hidrogênio a partir de manipueira em reator anaeróbio acidogênico foi inibida pela presença de bacteriocinas associadas a BAL. Tais bacteriocinas, identificadas no trabalho de Gomes et al. (2015) como Nisina A e Nisina Z, e seus produtos de degradação foram identificadas mesmo após tratamentos térmico da manipueira utilizada no estudo. Com isso, devido à importância do ácido lático no mercado, à limitação de estudos sobre esse tema na literatura e ao potencial de adequação da manipueira como substrato de baixo custo para a produção de ácido lático, este projeto foi elaborado.

Dessa forma, a hipótese geral do trabalho é que é possível produzir ácido lático a partir da manipueira sem inoculação, apenas com atuação dos microrganismos autóctones.

Essa hipótese foi dividida em duas sub-hipóteses:

a) A produção de ácido lático a partir de manipueira e biomassa autóctone é influenciada pelos parâmetros pH e temperatura;
b) É possível manter a produção contínua de ácido lático a partir de manipueira e microrganismos autóctones em reator anaeróbio contínuo, contendo microrganismos imobilizados.

1.2 JUSTIFICATIVA

As principais justificativas para realização deste trabalho são:

a) Possibilidade de agregar valor a um resíduo agroindustrial altamente poluidor, tornando-o matéria prima para produção de um composto de alto interesse comercial;
b) Aplicação de um resíduo na fase líquida, composto principalmente por carboidratos prontamente disponíveis, eliminando custos com pré-tratamentos (tratamento térmico e enzimático), que são utilizados em resíduos agroindustriais sólidos lignocelulósicos e amiláceos;
c) Utilização de microrganismos autóctones, já adaptados ao substrato, pode diminuir significativamente os custos operacionais e o esforço tecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar a possibilidade de produção de ácido lático em reatores anaeróbios utilizando manipueira e cultura mista autóctone.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos dessa pesquisa foram:

i) Avaliar a influência da temperatura e do pH na produção de ácido lático em reatores em batelada;

ii) Avaliar a produção de ácido lático em reator contínuo e estudar como a variação do Tempo de Detenção Hidráulica influencia o processo;

iii) Avaliar a comunidade microbiana autóctone da manipueira responsável pela produção de ácido lático.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MANDIOCA – A CULTURA DO SÉCULO XXI

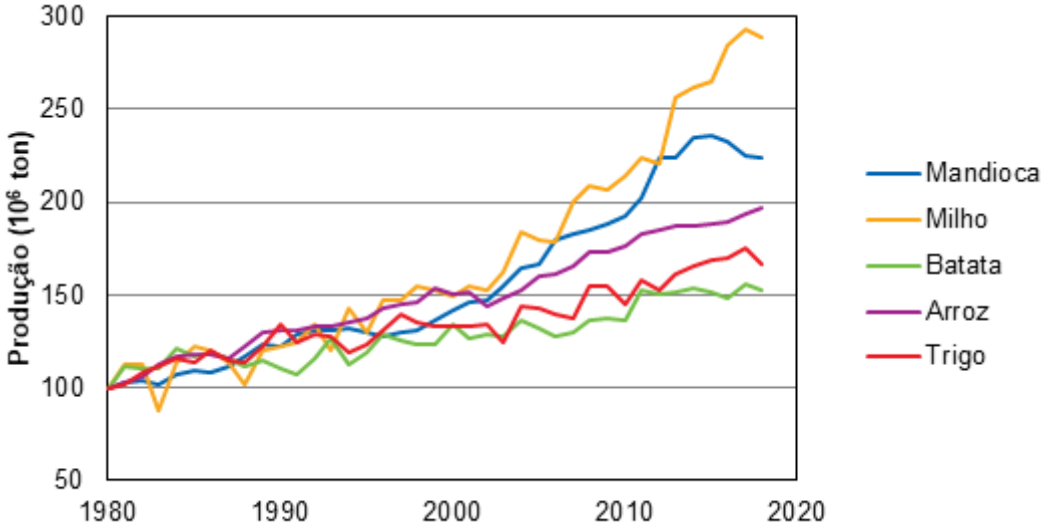
Conhecida como “alimento dos pobres”, em 2013, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) elegeu a mandioca como a “cultura do século 21”, devido à sua versatilidade, com capacidade de atender às demandas básicas de países em desenvolvimento, às tendências do mercado mundial e às possíveis dificuldades provenientes das mudanças climáticas (FAO, 2013).

Macaxeira, mandioca, aipim, castelinha, uaipi ou *Manihot esculenta Crantz* é uma árvore arbustiva, considerada uma das culturas mais antigas cultivadas do mundo. Evidências apontam que sua domesticação data dos anos 5000-7000 antes de Cristo, pelos povos indígenas instalados na periferia sudoeste da região Amazônica, onde hoje estão localizados os estados de Mato Grosso, Rondônia e Acre (ALLEM, 2002; OLSEN; SCHAAL, 1999).

A mandioca é caracterizada pela sua facilidade de manejo e por resistir em condições extremas não suportadas por outras culturas. A planta é muito tolerante à escassez de água e condições ácidas de solo (pH de 4,5) e obtém seus nutrientes por meio da relação de simbiose com fungos presentes no solo, o que reduz ou elimina a necessidade de aplicação de insumos. Novas árvores de mandioca podem ser obtidas por meio do plantio de partes do caule da planta e suas folhas produzem glicosídios cianogênicos que atuam como repelente natural contra ataques de pragas (FAO, 2013). Adicionalmente, a mandioca (folhas e raízes) é constituída de 80 a 90% (massa seca) de carboidratos, dentre os quais 80% são amido, o que a posiciona entre uma das fontes mais acessíveis de calorias (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

Considerando o mercado global de culturas amiláceas, a mandioca possui a quinta maior produção anual, com 278 milhões de toneladas produzidas em 2018, abaixo do milho, arroz, trigo e batata. Contudo, houve aceleração do crescimento da produção da mandioca (Figura 3-1), que gerou um aumento de 70% de produção nos últimos 20 anos (1998-2018), perdendo apenas para o milho (86,6%) (“FAOSTAT”, 2019).

Figura 3-1 - Crescimento da produção mundial das principais culturas alimentares



Fonte: Baseado em FAO (2013, p.6) com dados retirados de (“FAOSTAT”, 2019).

Tradicionalmente cultivada por pequenos agricultores e por agricultura familiar, em regiões de clima tropical e subtropical, a maior parte da produção de mandioca é proveniente de países da América Latina (9,81%), Ásia (29,03%) e África (61,08%). O Brasil já foi o maior produtor de mandioca, representando 30% da produção mundial. A partir da década de 1990, países da África e Ásia expandiram sua produção, com destaque para Nigéria, que há 30 anos é a maior produtora de mandioca do mundo, com 21% da produção total em 2018, mesmo possuindo um rendimento baixo. O Brasil ocupava a quinta posição no ranking de maior produtor de mandioca no mundo em 2018 (Tabela 3-1), com 17,6 milhões de toneladas produzidas, após quatro anos seguidos de queda na produção (“FAOSTAT”, 2019).

Tabela 3-1 - Maiores produtores de mandioca em 2018

País	**Produção (ton)**	**Área colhida (ha)**	**Rendimento (ton.ha^{-1})**
Nigéria	59.475.202	6.852.857	8,68
Tailândia	31.678.017	1.385.817	22,86
República Democrática do Congo	29.952.479	3.677.998	8,14
Gana	20.845.960	1.032.990	20,18
Brasil	17.644.733	1.205.413	14,64

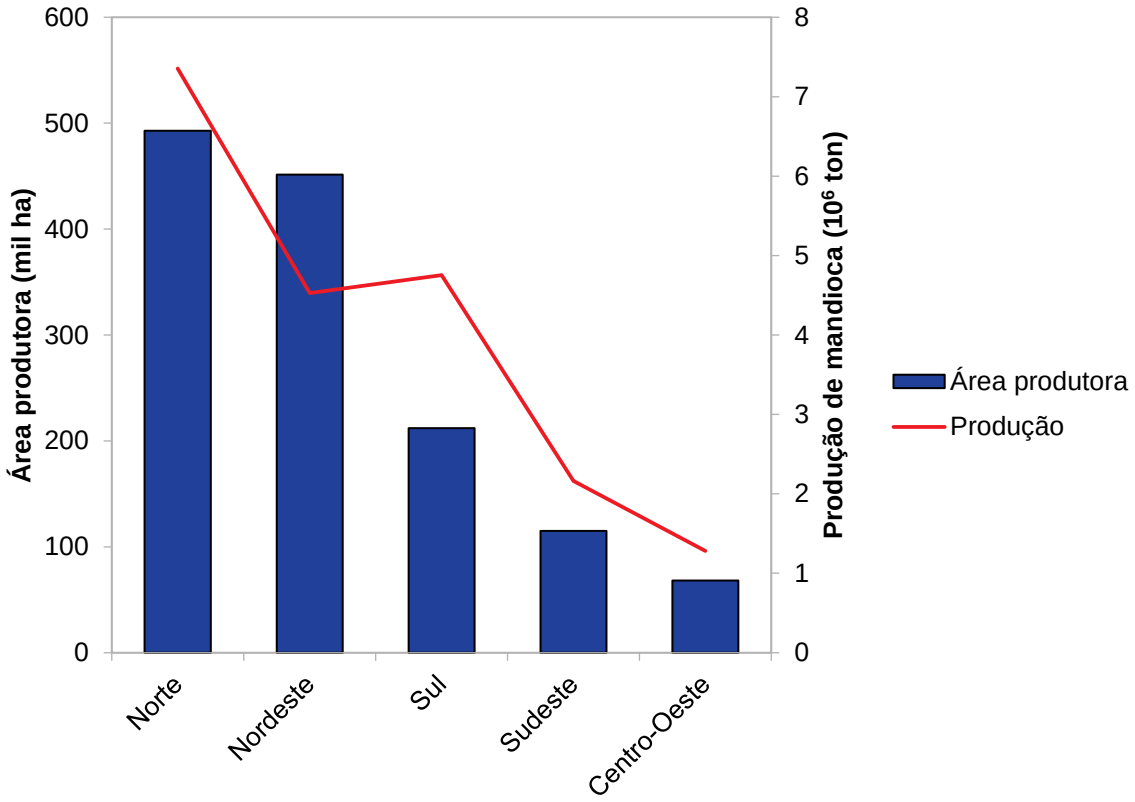
Fonte: (“FAOSTAT”, 2019).

No Brasil, o segmento de agricultura familiar representa 84% de toda a mandioca produzida (DERAL - DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL, 2020) e as terras produtoras estão concentradas nas regiões Norte e Nordeste, com 70,5% da

produção nacional (Figura 3-2). A região Norte também possui a maior produção de mandioca, principalmente devido à contribuição do estado do Pará, que sozinho representa 19,7% de toda a mandioca do Brasil.

Embora a região Sul possua apenas 15,8% de toda área produtora de mandioca, sua produção é a segunda maior do país, com 23,7%, valor um pouco acima da produção da região Nordeste, que possui o dobro de área produtora (IBGE, 2020). Essa discrepância, de acordo com Reinhardt (2013), se explica pelo fato de na região Nordeste, a produção de mandioca ser realizada de forma mais rústica, em pequenas propriedades e em sistemas de agricultura familiar, para atendimento do mercado local, principalmente por demanda de farinha de mandioca. Já na região Sul, a produção é em maior escala, com utilização de mão de obra terceirizada, mais tecnologia e aplicação de insumos, com foco na produção industrial de farinha e amido para atendimento a mercados diversos.

Figura 3-2 - Produção e área produtora de mandioca nas regiões do Brasil em 2019

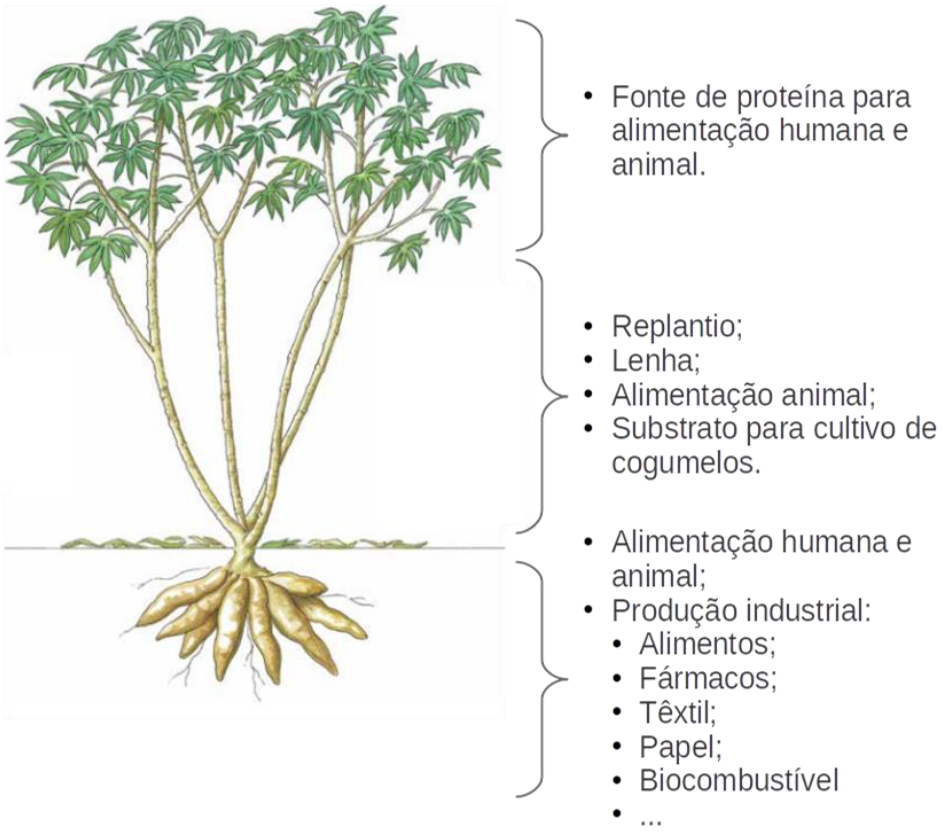


Fonte: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (IBGE, 2020).

Todas as partes da árvore de mandioca podem ser aproveitadas (Figura 3-3). As folhas são usadas para alimentação humana e animal, pelo seu alto teor de

proteína, que pode chegar a 25% da massa seca. O caule pode ser usado para o plantio de novas árvores, como lenha, substrato para crescimento de cogumelos e para alimentação animal. No entanto, as raízes, ricas em amido, são o principal produto da mandioca, as quais são fonte de matéria-prima para diversos usos e responsáveis pela versatilidade atribuída à planta. Além do seu uso para alimentação humana e animal, as raízes da mandioca são usadas em processos industriais na produção de alimentos, fármacos, papel, adesivos, na indústria têxtil, na produção de biocombustível, entre outros usos (FAO, 2013).

Figura 3-3 - Principais usos da árvore de mandioca, de acordo com cada parte da planta



Fonte: FAO (2013)

Mais da metade de toda mandioca colhida no mundo é utilizada para alimentação humana, consumida em forma de farinha ou outros produtos fermentados (ZHANG et al., 2016). No Brasil, em 2017, a produção de farinha e fécula de mandioca foi de 225.750 e 422.322 toneladas, respectivamente (DERAL - DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL, 2020; IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017).

3.2 MANIPUEIRA – MATÉRIA-PRIMA POTENCIAL

A produção de derivados da mandioca gera grandes quantidades de resíduos, tanto sólidos quanto líquidos. Por serem ricos em matéria orgânica, ao mesmo tempo em que esses resíduos representam um risco ao meio ambiente, quando destinados de forma inadequada, eles podem ser reaproveitados e utilizados como matéria-prima para produção de compostos de valor agregado, utilizando a abordagem de biorrefinaria (ZHANG et al., 2016).

Um dos principais resíduos gerados na indústria de derivados da mandioca é a manipueira, que compreende o líquido liberado na etapa de prensagem da mandioca ralada no processo de fabricação de farinha. É estimado que entre 150 e 400 L de manipueira sejam gerados no processamento de uma tonelada de raiz de mandioca (CEREDA, 2000). Considerando que são gerados aproximadamente 200 kg de farinha por tonelada de raiz de mandioca, estima-se que em 2017 foram gerados entre 160 e 450 mil m^3 de manipueira derivada da produção de farinha de mandioca no Brasil.

A composição da manipueira é bastante variável, pois depende da espécie da mandioca cultivada, que está relacionado às características edafoclimáticas da localização do plantio da raiz. Além disso, os procedimentos adotados na indústria com relação à separação das águas é outro fator que influencia na sua composição (CEREDA, 2000).

Na Tabela 3-2 são apresentadas características de manipueiras frescas de indústrias de farinha de mandioca utilizadas em outros estudos. Observa-se que a maior parte da matéria orgânica, medida em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), é composta por carboidratos, dentre os quais há uma parcela significativa de açúcares prontamente disponíveis, o que facilita a rápida fermentação da manipueira com consequente produção de ácidos orgânicos nas primeiras horas após sua geração (BARANA, 2000).

As manipueiras utilizadas por Damasceno et al. (2003) e Barana (2000) foram provenientes da mesma indústria de farinha de mandioca. Porém, observa-se que há discrepância na comparação da composição das duas, o que ilustra a já mencionada variabilidade da manipueira, que incide até em manipueiras de mesma origem industrial.

Tabela 3-2 - Características de manipueiras provenientes da fabricação de farinha de mandioca em diferentes estudos

Parâmetro	**Amorim (2018)**	**Souza et al. (2015)**	**Damasceno et al. (2003)**	**Barana (2000)**
Localização da casa de farinha	Taquarana/AL	Coité do Nóia/AL	Santa Maria da Serra/SP	Santa Maria da Serra/SP
Processamento mensal de mandioca (ton)	-	75	720	-
Geração de manipueira ($L.ton^{-1}$)[1]	-	400	360	-
pH	5,5	-	5,5	-
DQO_{total} ($g.L^{-1}$)	91,30	-	60	62,4±19,3
Sólidos totais ($g\ ST.L^{-1}$)	103,28	-	62	55,4±13,1
Sólidos voláteis totais ($g\ SV.L^{-1}$)	72,82	-	-	48,6±13,5
Carboidratos totais ($g.L^{-1}$)	87,08	-	58,2	-
Glicose ($g.L^{-1}$)	-	-	22,3	6,01±4,72
Frutose ($g.L^{-1}$)	-	-	14,9	10,22±7,70
Ácido Lático ($g.L^{-1}$)	-	-	-	1,76±1,43
Ácido Acético ($g.L^{-1}$)	-	-	-	2,64±2,35
Ácido Propiônico ($g.L^{-1}$)	-	-	-	2,26±2,02
Cianeto total ($mg.L^{-1}$)	-	-	-	112,19±28,94
Nitrogênio total ($g.L^{-1}$)	-	-	1,6	1,38±0,30
P ($mg.L^{-1}$)	-	390±0,07	83,3	361±473
K^+ ($mg.L^{-1}$)	-	779,12±0,22	895,0	2191±1177
Ca^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	245±0,08	184,0	931±396
Mg^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	222±0,04	173,0	362±112
S ($mg.L^{-1}$)	-		38,0	68±37
Fe^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	21,42±0,04	8,0	14±13
Cu^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	0,74±0,02	0,8	3±4

Zn^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	5,21±0,02	-	36±45
Mn^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	2,28±0,01	-	3±1
Cd^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	0,045±0,01	-	-
Ni^{2+} ($mg.L^{-1}$)	-	0,98±0,02	-	-
Na^{+} ($mg.L^{-1}$)	-	199,5±0,11	-	-

[1] Equivale à quantidade de manipueira gerada por tonelada de mandioca processada.

Outro ponto a ser destacado na Tabela 3-2 é a presença de nutrientes na composição da manipueira, principalmente N, P, K, Ca^{2+} e Mg^{2+}. Essa característica rendeu à manipueira título de adubo orgânico, com estudos comprovando sua eficácia em substituição a adubos comerciais, principalmente para a agricultura familiar, por ser uma alternativa de baixo custo (BOTELHO; MARLI COSTA POLTRONIERI; RODRIGUES, 2009). Outros usos mais tradicionais e diretos da manipueira são a utilização como complemento alimentar na criação de animais e na produção de tucupi, alimento típico na região norte do Brasil (BEZERRA, 2011).

Para seus usos diretos, é necessário que a manipueira passe por um processo de fermentação natural ou aquecimento, para volatilização do cianeto, composto tóxico, presente em sua composição. Envenenamento pela ingestão de manipueira foi citado como causa de morte de animais por aproximadamente 40% de pecuaristas em um levantamento realizado entre 2011 e 2013 no Brasil (PEDROSO et al., 2018).

Além dos usos já citados, as características da manipueira, rica em carboidratos e nutrientes, também a tornam adequada para ser utilizada em processos fermentativos para produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos. A utilização de resíduos para produção de compostos com valor agregado promove a destinação ambientalmente adequada dos resíduos, reduz custos com matéria-prima e evita a competição com a indústria alimentícia pelo mesmo substrato, minimizando problemas relacionados à segurança alimentar (ZHANG et al., 2016).

Várias alternativas para aproveitamento da manipueira utilizando o conceito de biorrefinaria foram estudadas, como a produção de biohidrogênio e biometano (MARI et al., 2020), biosurfactantes (CAVALCANTE FAI et al., 2015), ácidos graxos voláteis (HASAN et al., 2015), ácido lático (LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010), entre outros. Em especial, a utilização da manipueira para produção biotecnológica de ácido lático

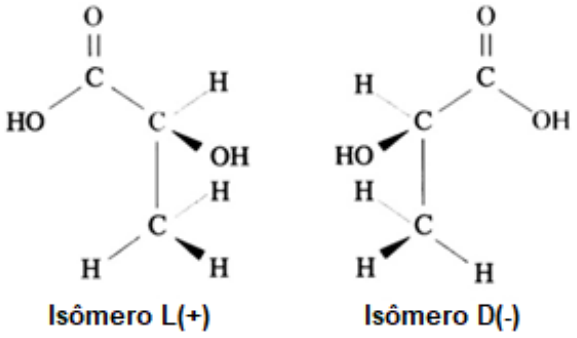
mostra-se atrativa, pois a fermentação natural da manipueira espontaneamente produz ácido lático, visto que BAL fazem parte da cultura microbiana autóctone da manipueira.

3.3 ÁCIDO LÁTICO

O ácido lático (ácido 2-hidroxi propanoico), CH_3 – CHOHCOOH, é um ácido orgânico de ocorrência natural, isolado primeiramente em 1780 pelo químico sueco CW Scheele. Inicialmente considerado constituinte da composição do leite, foi apenas em 1870 que Pasteur identificou que o ácido lático era um metabólito formado na fermentação do leite por certos microrganismos. Em 1881, Femi produziu o ácido por meio da fermentação, resultando no início de sua produção industrial (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; WEE; KIM; RYU, 2006).

O ácido lático é o ácido hidroxicarboxílico mais simples a possuir um átomo de carbono assimétrico, quiral, e, com isso, pode ocorrer naturalmente como um dos enantiômeros: L(+)-ácido lático e D(-)-ácido lático (Figura 3-4), ou como uma mistura dos dois isômeros (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013).

Figura 3-4 - Estrutura dos isômeros do ácido lático



Em sua forma pura, o ácido lático se apresenta como cristais sólidos de cor branca. Porém, geralmente é encontrado como uma solução aquosa, devido à dificuldade em ser obtido em sua forma pura (DATTA, 2004).

O interesse na produção de ácido lático está associado à sua versatilidade de aplicação, sendo um componente importante em diversas indústrias como (ABEDI; HASHEMI, 2020; GAO; MA; XU, 2011; KOMESU et al., 2017; WEE; KIM; RYU, 2006):

- Indústria alimentícia: usado como acidulante, conservante, intensificador de sabor, regulador de pH, inibidor de bactéria residual no processamento de alimentos e é usado como ingrediente essencial na confecção de alimentos fermentados;
- Indústria de fabricação de couro e na indústria têxtil: atua no processo de curtimento e no tingimento de tecidos, respectivamente;
- Indústria de cosméticos: como hidratante, agente para clareamento e rejuvenescimento da pele, agente contra acne, umidificante e em produtos de higiene bucal como agente contra tártaro;
- Indústria médica e farmacêutica: usado em implantes, próteses, comprimidos, na solução ácida no processo de diálise, em suturas cirúrgicas e no sistema de liberação controlada de drogas no organismo;
- Indústria química: pode ser convertido em etanol, propileno glicol, polímeros acrílicos, óxido de propileno, acetaldeído, ácido acrílico, ácido propanoico, pentano-2,3-diona, lactato de etila, ésteres e PLA. Na forma de sais ésteres e derivativos, o ácido lático pode ser usado na produção de solventes, emulsificantes e plastificante;

Embora compartilhem das mesmas propriedades físico-químicas (Tabela 3-3), um dos isômeros do ácido lático pode ser preferível para determinadas aplicações. Nas indústrias alimentícia e farmacêutica utiliza-se a forma enantiomérica L-ácido lático, pois ocorre naturalmente em humanos, enquanto há relatos de que o D-ácido lático pode ser tóxico em altas concentrações (OLIVEIRA et al., 2018; POHANKA, 2020).

Tabela 3-3 – Características físico-químicas do ácido lático

Propriedade	Valor	Unidade
Peso molecular	90,08	$g.mol^{-1}$
Densidade[1]	1,2006	g/mL^{-1}
Ponto de fusão		
Mistura racêmica (anidra)	18 - 33	
Isômero puro	52,7 - 52,8	° C
Ponto de ebulição[2]	125 - 140	
Constante de dissociação[3]	$1,38x10^{-4}$	
pKa	3,86	
pH[4]	1,75	

Fonte: Chahal; Starr (2000).

[1]solução aquosa 88,06% a 25°C; [2]pressão à 27 kPa; [3]25°C; e [4]solução aquosa 10%.

PLA é considerado um dos produtos mais promissores produzidos a partir do ácido lático. É um polímero semicristalino, termoplástico, biodegradável e biocompatível[1]. Suas propriedades mecânicas são equiparáveis a de outros plásticos derivados de petróleo, como o PET, com a vantagem de serem produzidos a partir de fontes renováveis (MURARIU; DUBOIS, 2016).

Dependendo da configuração do L ou D do ácido lático, o PLA pode existir em várias formas com propriedades distintas, como ácido poli-l-lático (PLLA, do inglês *poly-L-lactic acid*) e ácido poli-D-lático (PDLA, do inglês *poly-D-lactic acid*). Há também a possibilidade de produção de PLA com proporções variáveis dos isômeros D e L, resultando em diferentes formulações de ácido poli-D,L-lático (PDLLA, *poly-D,L-lactic acid*), cujas características biomecânicas, térmicas, reológicas e biológicas podem ser moduladas de acordo com a aplicação do produto (ANNUNZIATA et al., 2017).

Devido a suas características, o PLA é componente importante na área médica em aplicações em engenharia regenerativa de tecidos, usos em ortopedia, cardiologia, na administração de drogas e ortodontia. Além disso, suas propriedades inerentes o tornam um material adequado para impressão em 3D, que permite a fabricação rápida de equipamentos de uso médico, como equipamentos de proteção individual (EPI), tecnologia de extrema utilidade em situações de emergência, como a recente escassez de produtos médicos e EPI na atual pandemia de COVID-19 (DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020).

3.3.1 Produção de ácido lático

A produção de ácido lático pode ser realizada por meio de síntese química ou por produção biotecnológica. A produção por síntese química sempre resulta em uma mistura racêmica dos dois isômeros do ácido lático, D,L-ácido lático. Já a produção biotecnológica pode produzir apenas um dos dois isômeros opticamente puros ou uma mistura dos dois isômeros, a depender da cultura de microrganismos utilizada (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013).

[1] Biocompatibilidade, na medicina, refere-se à habilidade de um material desempenhar a função para a qual foi projetado, em contato com tecidos vivos sem causar efeitos adversos no longo prazo.

3.3.1.1 Produção de ácido lático por síntese química

O método mais comumente utilizado para a produção comercial de ácido lático via síntese química é baseada na hidrólise de lactonitrila e o produto final é a mistura racêmica, D,L-ácido lático. No processo, cianeto de hidrogênio é (1) adicionado a acetaldeído em meio líquido na presença de uma base a altas pressões para a formação da lactonitrila, a qual é recuperada e purificada por destilação. Para produzir o ácido lático, a lactonitrila é (2) hidrolisada por H_2SO_4 ou HCl concentrados. O ácido lático posteriormente é (3) esterificado com metanol gerando metil lactato, o qual é isolado e purificado por destilação e, por fim, é (4) hidrolisado por água utilizando um catalisador ácido para produzir ácido lático e metanol, que é reciclado no processo (DATTA et al., 1995). As reações são apresentadas a seguir:

(1) Adição do cianeto de hidrogênio:

$$CH_3CHO + HCN \xrightarrow{catalizador} CH_3CHOHCN$$

(2) Hidrólise da lactonitrila

$$CH_3CHOHCN + H_2O + \frac{1}{2}H_2SO_4 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + \frac{1}{2}(NH_4)_2SO_4$$

(3) Esterificação do ácido lático

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \rightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$$

(4) Hidrólise com água

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

3.3.1.2 Produção biotecnológica do ácido lático

Alternativamente à síntese química, o ácido lático pode ser produzido por meio de fermentação, que é um processo relativamente rápido, gera altos rendimentos (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Em geral, a produção de ácido lático via fermentação requer baixa temperatura de produção e baixos requerimentos de energia. Com isso, aproximadamente 90% do ácido lático é produzido por meio de fermentação (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015). Uma importante vantagem da produção biotecnológica do ácido lático comparada com a síntese química é a possibilidade de manipulação das características finais do produto, baseado na seletividade do isômero produzido. Em algumas aplicações, a pureza óptica deve ser

priorizada, o que só pode ser obtido por meio de microrganismos (EITEMAN; RAMALINGAM, 2015).

De acordo com o produto final da fermentação, a produção de ácido lático pode ser homolática, heterolática ou fermentação ácida mista. Na fermentação homolática, ácido lático é produzido pela rota metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), ou glicólise, na qual piruvato é produzido pela degradação da glicose (Figura 3-5A). Em condições anaeróbias, o piruvato é utilizado como aceptor terminal de elétrons pelas bactérias do ácido lático (BAL), sendo reduzido a lactato para a oxidação de NADH em NAD^+ para o balanço redox. Essa reação é catalisada por uma das enzimas L-lactato desidrogenase ou D-lactato desidrogenase, que produzirão, respectivamente, L-ácido lático e D-ácido lático (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005).

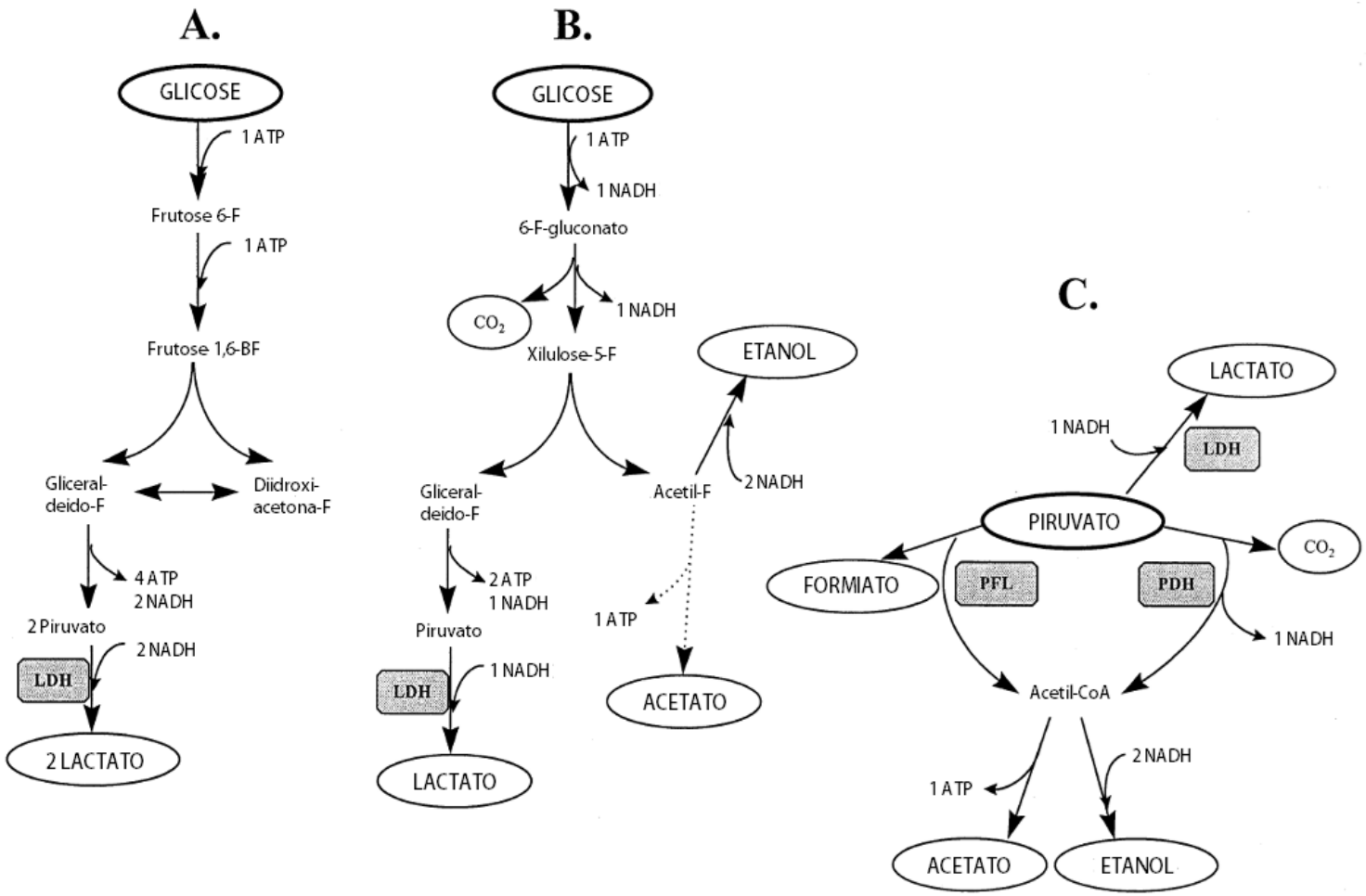
O rendimento teórico de ácido lático produzido por fermentação da glicose via glicólise é de 1,0 g $AL.g^{-1}$ glicose (2 mols $AL.mol^{-1}$glicose). No entanto, o rendimento observado experimentalmente é menor, em torno de 0,74 – 0,99 g $AL.g^{-1}$ glicose, visto que uma parte do carbono é utilizada para crescimento celular, em torno de 0,07 – 0,22 g $AL.g^{-1}$ glicose (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

A fermentação heterolática ocorre pela rota pentose-monofosfato (Figura 3-5B), na qual as hexoses são quebradas em pentoses e gás carbônico. Posteriormente, a pentose formada é clivada em quantidades equimolares de gliceraldeído-6-fosfato e acetil fosfato pela enzima fosfoquetolase. O gliceraldeído-6-fosfato entra na glicólise para formação de ácido lático, enquanto o acetil fosfato é reduzido a etanol via os intermediários acetilcoenzima A e acetaldeído ou é convertido a acetato via acetato quinase. A proporção entre etanol e acetato formados é dependente do potencial redox nas células (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015). Com a formação de outros produtos na fermentação heterolática, 0,5 g $AL.g^{-1}$ glicose (1 mol $AL.mol^{-1}$ glicose) é o rendimento teórico de ácido lático (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

A fermentação ácida mista ocorre na fermentação homolática quando há limitação de glicose, durante crescimento utilizando outros açúcares, como maltose, lactose e galactose, ou quando há aumento de pH e diminuição da temperatura. Nesse caso, etanol, acetato e formato são formados adicionalmente a ácido lático. A rota da

fermentação homolática é utilizada, porém a diferença ocorre no metabolismo do piruvato, o qual é metabolizado em formiato acetil-CoA, catalisado pela piruvato formiato liase (Figura 3-5C) (HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

Figura 3-5 - Rotas metabólicas na produção de ácido lático. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação ácida mista (C). F = fosfato, BF = bifosfato, LDH = lactato desidrogenase, PFL = piruvato formiato liase e PDH = piruvato desidrogenase



Fonte: Hofvendahl; Hahn–Hägerdal (2000).

3.3.2 Bactérias produtoras de ácido lático

A produção de ácido lático pode ser realizada por diferentes microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras, cianobactérias e algas. Contudo, bactérias do ácido lático (BAL) são os organismos utilizados em cerca de 90% dos estudos presentes na literatura, pois produzem ácido lático com altos rendimentos e produtividade (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

BAL compreendem um grupo de bactérias fermentativas Gram-positivas, geralmente não esporulantes, catalase negativas, não aeróbias, mas aerotolerantes, e imóveis, que produzem ácido lático como produto da fermentação de açúcares. As BAL podem ser cocos e bacilos pertencentes aos gêneros *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* e *Weissella* (HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

BAL são organismos robustos adaptados a condições de estresse, uma vez que conseguem se desenvolver em amplas faixas de temperatura (5 – 55°C) e pH (3,5 – 10,0), dependendo do gênero (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; KIM et al., 2012). Por possuírem capacidade de se desenvolverem em ambientes com condições extremas e por apresentarem tolerância a oxigênio, as BAL possuem vantagem na competição com outras bactérias (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

Além disso, algumas BAL produzem bacteriocinas, peptídeos bacterianos sintetizados nos ribossomos, que as conferem vantagem na colonização e competição, devido ao potencial de inativação que exercem sobre outras bactérias, mesmo em concentrações bem pequenas (SABO et al., 2014).

A produção convencional de ácido lático se dá a partir da utilização de culturas puras de BAL. No entanto, uma única cultura de microrganismo possui uma estreita faixa ótima de substratos e condições operacionais que podem ser utilizados. Adicionalmente, culturas puras requerem esterilização do meio, ajuste rígido de pH e temperatura e adição de nutrientes, o que pode encarecer o processo. Por outro lado, culturas mistas têm a vantagem de suportar condições complexas, com maior capacidade evolutiva e adaptação (LIANG; MCDONALD; COATS, 2014).

3.3.3 Fatores que afetam a produção biotecnológica de ácido lático

A manutenção das condições ambientais, que, simultaneamente, sejam de baixo custo, favoráveis para desenvolvimento dos microrganismos, gerem altos valores de rendimento e produtividade e que resultem em baixa contaminação do produto final, é o principal desafio na produção de ácido lático. Com isso, algumas das principais condições ambientais bastante estudadas para produção de ácido lático são: fonte de carbono, suplementação nutricional, esterilização do meio, pH e temperatura.

3.3.3.1 Fonte de carbono

As principais fontes de carbono para a produção industrial de ácido lático são carboidratos como glicose, lactose, amido, maltose e sacarose, que compreendem produtos processados, cujas fontes são disputadas com aplicações alimentícias (OLIVEIRA et al., 2018).

O custo da fonte de carbono é relatado como o principal desafio na produção de ácido lático. Por isso, substratos alternativos são investigados, com o objetivo de reduzir os custos, sem alterar significativamente o rendimento do processo. Convenientemente, as BAL possuem a capacidade de sintetizar uma variedade de carboidratos, tanto mono, como dissacarídeos e, por isso, estão entre os grupos de microrganismos mais promissores para serem usados em biorrefinarias (MAZZOLI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

Materiais amiláceos, biomassa lignocelulósica, microalgas, sobras de alimentos e glicerol são alternativas de baixo custo estudadas como fonte de carbono na produção de ácido lático (OLIVEIRA et al., 2018).

Biomassa lignocelulósica é considerada a mais promissora, por serem abundantes em todo o mundo, baixo custo, apresentarem alto teor de carboidratos e não competirem com a indústria alimentícia por matéria prima. A desvantagem está na necessidade de pré-tratamentos (tratamentos térmico, ácido e enzimático) para liberação de carboidratos na forma passível de ser assimilada pelos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2018).

3.3.3.2 Suplementação nutricional e esterilização do meio

Culturas puras de *Lactobacillus* são os principais organismos utilizados na produção industrial de ácido lático. São organismos que possuem alta tolerância a ambientes ácidos e podem ser facilmente modificados geneticamente, com o intuito de selecionar o isômero do ácido lático desejado. Além disso, são organismos seguros para produção industrial de AL, por não apresentarem efeitos adversos no seu processo produtivo nem ao consumidor final (OLIVEIRA et al., 2018).

Lactobacillus possuem requerimentos nutritivos complexos, incluindo fontes de nitrogênio, minerais e vitaminas, que devem estar prontamente disponíveis para seu crescimento, pois são incapazes de sintetizar a maioria dessas substâncias necessárias para a manutenção do crescimento celular e a produção do ácido lático. Dessa forma, com a utilização de açúcares simples como fonte de carbono, é necessária a suplementação nutricional do meio, que pode ser por meio da adição de peptona, extrato de levedura, ureia, sulfato de amônio ou, o mais utilizado, extrato de carne (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; WU et al., 2015a).

Além disso, a utilização de culturas puras requer esterilização do meio, para evitar contaminação e produção de subprodutos indesejados ao processo. Esterilização do meio é a segunda maior barreira na produção de ácido lático, visto que é um processo dispendioso e operacionalmente desvantajoso (OLIVEIRA et al., 2018).

3.3.3.3 pH e temperatura

Por se tratar de parâmetros que definem o sucesso do processo de produção biotecnológica de ácido lático, pH e temperatura são objetos de estudos em diversos trabalhos. Com a utilização de substratos mais complexos e culturas mistas, é essencial conhecer como esses sistemas se comportam em função desses parâmetros para poder trabalhar nas melhores condições e atingir melhores rendimentos e produtividades.

As informações sobre a influência desses parâmetros na produção de ácido lático utilizando substratos alternativos são bastante variáveis. Essa variabilidade decorre principalmente pelo desenvolvimento de diferentes comunidades bacterianas também influenciadas pelos substratos complexos utilizados. Além disso, as BAL são

organismos extremamente adaptáveis e conseguem se desenvolver em uma ampla faixa de condições ambientais.

Em geral, pH entre 5 e 7 é considerada uma faixa ótima para crescimento de BAL, sendo relatado que pH muito baixo (menor que 4) possui efeito inibitório para a produção de AL. Além disso, a maioria das BAL não consegue crescer em pH menor que 4, além de pH menor que 5,7 ser considerado ótimo apenas para organismos do gênero *Lactobacillus* (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

A redução do pH do meio é prejudicial para a célula, pois o ácido lático (assim como outros ácidos fracos) é protonado assim que é liberado pela célula. Por estar sem carga, o AL é difundido para o interior da bactéria e se dissocia, devido ao pH intracelular elevado. Com isso, a energia que a célula usaria para crescimento é utilizada para bombear os prótons para o exterior. Por isso, o controle do pH é recomendado na literatura. Uma outra solução para evitar a redução do pH é a extração contínua do ácido lático do meio reacional (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 1997). Dreschke et al. (2015) observaram melhores produção e produtividade quando houve extração de AL por eletrodiálise, enquanto o ajuste do pH não apresentou melhoras significativas.

A influência da temperatura na produção de AL está relacionada aos parâmetros cinéticos de crescimento das BAL, o que influencia a produção de AL e o consumo de substrato. A maioria dos estudos é realizada em temperaturas entre 30 e 45°C (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

Zhang et al. (2017) observaram o efeito da variação da temperatura e do pH na fermentação de resíduo de alimento usando lodo de processo de lodos ativados em reatores em batelada. Foram testadas duas temperaturas: uma na faixa mesofílica, 35°C, e outra na faixa termofílica, a 50°C. Os pH testados foram 7, 8, 9, 10 e 11, os quais eram corrigidos a cada 6 horas. Para a condição mesofílica, a maior concentração de AL foi obtida com pH 9 no 3° dia (25,51 g $DQO_{AL}.L^{-1}$ e rendimento de 0,667 g $DQO_{AL}.g^{-1}$ DQO_{total}), enquanto para a condição termofílica, a máxima concentração de AL foi obtida com pH de 7 (21,01 g $DQO_{AL}.L^{-1}$ com rendimento de 0,549 g $DQO_{AL}.g^{-1}$ DQO) também no 3° dia. A partir de otimização feita por

metodologia de superfície de resposta, a melhor condição para produção de ácido lático foi temperatura 38,12°C e o pH de 8,53. Os autores concluíram que o pH ótimo para produção de ácido lático decresceu com o aumento da temperatura. Adicionalmente, quando o pH não foi ajustado sendo o inicial de 4, não houve produção significativa de ácido lático

Tang et al. (2017) avaliaram o efeito do pH utilizando resíduo de alimento e diferentes tipos de inóculo: lodo metanogênico, lodo anaeróbio e resíduo de alimento fresco em ensaios em batelada com temperatura de 37°C. Os valores de pH analisados foram 4, 5, 6 (ajustados a cada 4 horas) e um sem controle de pH. Dos valores de pH testados, o que obteve melhor resultado foi pH de 5 para todos os inóculos, com valores máximos de concentração e rendimento de ácido lático de 28,4 $g.L^{-1}$ e 0,46 g $AL.g^{-1}$ ST, respectivamente, com inóculo de resíduo de alimento fresco. Nos ensaios com pH não controlado (pH < 4), houve menor produção de ácido lático em decorrência da baixa concentração de BAL. Além disso, em todos os ensaios com pH de 6, houve rápido consumo de ácido lático após 48 h (de um total de 168 horas) de fermentação para produção de ácidos orgânicos voláteis, com o que os autores concluíram que pH de 6 não é adequado para produção de AL.

Jawad et al. (2013) aplicaram experimento fatorial para avaliar o efeito do pH, da temperatura e do tempo de fermentação utilizando resíduo composto por casca de manga. Dos dois níveis de pH e temperatura testados, o melhor resultado foi obtido com pH de 10 e temperatura de 35°C, em comparação com pH de 4 e 15°C. Os autores atribuíram a menor produção de AL em pH menor, à rápida diminuição do pH, até uma condição inibitória para os organismos, o que não aconteceu com pH de 10, que causou um efeito tampão mesmo com a produção de ácidos no meio.

Akao et al. (2007) estudaram o efeito da temperatura e pH na produção de L-lactato utilizando resíduo preparado em laboratório sem esterilização do meio. Inicialmente, foram testados valores de pH de 5,5, 5,0 e 6,5 mantendo a temperatura fixada em 55°C. Nesse experimento, a melhor condição para produção de L-lactato foi pH de 5,5, na qual houve maior pureza do isômero L durante toda a fermentação. Além disso, nos maiores valores de pH testados, houve redução da concentração de AL e produção de butirato e etanol. A concentração máxima obtida de ácido lático foi de 29,5 g $AL.L^{-1}$ com rendimento de 0,49 g $AL.g^{-1}$ CH e pureza ótica de 98,9%. Outro

teste foi realizado com pH fixo em 5,5 e variando temperatura em 35, 45 e 55°C. Embora maiores concentrações de AL tenham sido obtidas a 35 e 45°C, a maior pureza ótica de L-lactato se manteve na temperatura de 55°C. Com isso, os autores concluíram que a melhor condição para produzir L-lactato seria com pH de 5,5 e 55°C.

Tang et al. (2016) também avaliaram o efeito da temperatura e do pH na fermentação de resíduo de alimento utilizando microbiota autóctone. Inicialmente, quatro condições de pH (inicial 4,5 e sem controle e valores de pH de 6, 8 e 10 com controle) foram testadas com temperatura 25°C. Nesse ensaio, o pior resultado (6,3 g $AL.L^{-1}$ em 144 h) foi obtido nos reatores que não tiveram ajuste de pH, o qual atingiu valores de 3,5 e 3,0 após 36 e 144 h, respectivamente. Com isso, os autores concluíram que o baixo pH inibiu o crescimento dos microrganismos. O melhor resultado nessa temperatura foi com pH de 6, no qual 30 $g.L^{-1}$ de AL foram produzidos em 240 h. Utilizando pH de 6 e novamente avaliando o efeito do controle de pH, a influência da temperatura foi avaliada considerando 37°C e 55°C. Os reatores na condição termofílica obtiveram piores resultados, principalmente na condição sem controle de pH, que atingiu apenas 5 g $AL.L^{-1}$. Já com temperatura de 37°C, o melhor resultado foi na condição com ajuste de pH (32,8 g $AL.L^{-1}$ em 120 h), enquanto sem ajuste de pH a concentração de AL foi 13,98 $g.L^{-1}$. O rendimento atingido na condição 37°C e pH de 6 foi 0,47 g $AL.g^{-1}$ ST.

Da revisão realizada, observou-se que, o pH é um parâmetro muito importante para a produção de ácido lático. Em geral, com valores muito baixos de pH não há crescimento de organismos e, por isso, a maioria dos trabalhos utilizam controle de pH, já que a produção de ácido lático reduz drasticamente o pH logo no início da fermentação. Ao mesmo tempo que pH baixo pode inibir o crescimento de bactérias do ácido lático, pH muito alto pode causar consumo desse ácido para produção de ácidos orgânicos voláteis (TANG et al., 2017).

Com relação à temperatura, a maioria dos estudos são realizados na faixa mesofílica. Condições de temperatura muito extremas, entre 50 e 55°C, apenas são aplicadas para selecionar organismos (KIM et al., 2012) ou o isômero a ser produzido (TASHIRO et al., 2010).

3.3.4 Produção de ácido lático a partir de manipueira

Há referências limitadas na literatura de estudos que utilizaram intencionalmente a manipueira como substrato para produção de ácido lático. Trabalhos desenvolvidos por Lima; Coelho; Contiero (2010), Coelho et al. (2010) e Tosungnoen; Chookietwattana; Dararat (2014) foram os únicos encontrados na pesquisa realizada pelo autor da tese, com última atualização em 15 de junho de 2021.

Coelho et al. (2010) avaliaram o efeito da adição de fontes minerais e de nitrogênio na produção de ácido lático por *Lactobacillus rhamnosus* B 103 utilizando manipueira proveniente da produção de farinha de mandioca. Os pesquisadores concluíram que a produção de ácido lático utilizando manipueira é possível e com considerável produção de biomassa e ácido lático. A maior produtividade obtida no estudo foi de 1,59 g $AL.L^{-1}.h^{-1}$, após 12 h de fermentação, e a maior concentração de ácido lático foi de 39 g $AL.L^{-1}$, após 36 h de fermentação.

Lima; Coelho; Contiero (2010) também utilizaram manipueira como substrato para produção de ácido lático. Nesse estudo foi utilizada uma cultura pura de *Lactobacillus rhamnosus* RL-1 e o melhor resultado foi a produção de 35,54 g $AL.L^{-1}$ após 48 horas de fermentação, com 100% de utilização de açúcares redutores. A produtividade obtida no fim da fermentação foi de 0,656 g $AL.L^{-1}.h^{-1}$, com máxima de 1,31 g $AL.L^{-1}$ nas primeiras 24 h.

Tosungnoen; Chookietwattana; Dararat (2014) utilizaram manipueira sintética e *L. plantarum* MSUL 702, isolada de polpa de mandioca, para produção de ácido lático em reator operado em batelada alimentada em meio não esterilizado. A máxima concentração de ácido lático produzida, 28,71 g $AL.L^{-1}$, foi obtida após 48 h de fermentação.

Embora essas pesquisas comprovem que a manipueira é adequada para produção de ácido lático, há alguns pontos a serem destacados:

i. não foram utilizados microrganismos autóctones da manipueira. Os três trabalhos inocularam os reatores com organismos cultivados. Tosungnoen; Chookietwattana; Dararat (2014) utilizaram uma cultura relacionada à mandioca, que é mais próximo dos organismos presentes na manipueira;

ii. Tosungnoen; Chookietwattana; Dararat (2014) e Coelho et al. (2010) utilizaram manipueira sintética e manipueira livre de sólidos e cianeto, respectivamente. A única informação sobre as características da manipueira utilizada por Lima; Coelho; Contiero (2010) é que foram usadas duas "composições[2]" da manipueira: uma natural e hidrolisada.

iii. Coelho et al. (2010) suplementaram a manipueira com fontes externas de nitrogênio.

De acordo com os estudos específicos apresentados, observa-se que a manipueira bruta em sua forma natural ainda não foi testada para a produção de ácido lático, permanecendo uma lacuna no conhecimento desse processo.

Para complementar a revisão da literatura, foi considerado importante inserir trabalhos que estudaram a fermentação natural de derivados da mandioca, como a puba e o polvilho azedo, cujo processamento é caracterizado por uma etapa de fermentação da mandioca submersa em água.

Almeida (1992) estudou o processamento e a caracterização da puba e verificou que nas primeiras 24 h, o valor de pH, que no início da fermentação da mandioca estava na faixa de 7,5 a 5,8, decresceu para valores entre 5,8 e 3,6. Adicionalmente, até às 41 h de fermentação, o principal metabólito presente foi o ácido lático. Após esse período, houve predomínio da fermentação butírica. De acordo com Aquino; Gervin; Amante (2016), o tipo de fermentação do amido de mandioca varia com a temperatura, sendo lática em regiões com temperaturas mais frias e butírica em regiões de temperaturas mais elevadas.

Carvalho et al. (1996) relataram que 80,6% dos microrganismos presentes nas amostras retiradas dos tanques fermentação na produção de polvilho azedo eram BAL e que o ácido lático constitui 60% da acidez total na fermentação do amido de mandioca. Os autores concluíram que a fermentação de amido de mandioca apresenta uma sucessão de populações microbianas e que essa sucessão é

[2] O texto original é: "*Two cassava wastewater preparations (natural and hydrolyzed) were tested [...]*" (LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010).

determinada pela sensibilidade dos organismos a resistirem a condições muito ácidas (pH próximo a 3,5) que ocorrem no decorrer do processo.

Ampe; Sirvent; Zakhia (2001) observaram uma rápida diminuição do pH durante a fermentação de amido de mandioca no preparo de polvilho azedo, o qual chegou ao valor do pKa do ácido lático, 3,5. Adicionalmente, os autores relataram que o metabólito mais importante na fermentação foi o lactato, mas que também obtiveram concentrações significativas de acetato. *Lb. plantarum* foi relatada como uma espécie muito importante na fermentação do polvilho azedo, além de estar presente durante todo o processo de fermentação.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção biotecnológica de ácido lático está sendo muito investigada por sua versatilidade. O grande obstáculo dos pesquisadores é reduzir os custos de produção com o emprego de substratos alternativos, principalmente compostos lignocelulósicos e ricos em amido. No entanto, esses compostos possuem a limitação de necessitarem de pré-tratamento, para liberação dos açúcares para a cultura, o que também aumenta o custo do processo.

A revisão bibliográfica permitiu constatar que, mesmo fornecendo maior pureza do produto final, a esterilização do meio reacional e inoculação com culturas microbianas puras é economicamente e tecnicamente desfavorável, além de dificultar a metabolização dos carboidratos complexos por um único tipo de bactéria (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Inibição das atividades das BAL por alta concentração de ácido lático e pela redução do pH do meio, além da possível conversão do ácido lático em outros produtos, são relatadas como as principais limitações da produção biotecnológica de ácido lático utilizando culturas puras e substratos complexos. No entanto, alguns relatos na literatura comprovam que essa técnica é possível, tornando fundamental o controle dos parâmetros operacionais para o sucesso do processo.

Derivados e resíduos do processamento da mandioca, como a manipueira, mostram-se como substratos promissores para produção de ácido lático. A manipueira é um efluente com alto teor de matéria orgânica e nutrientes e apresenta bactérias produtoras de ácido lático como integrantes de sua microbiota. Além da utilização

desse efluente na produção de um composto de grande importância no mercado, a manipueira teria uma destinação mais adequada, o que diminuiria o problema de poluição causada por esse resíduo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ETAPAS DO TRABALHO

Para testar as hipóteses formuladas (apresentadas no item 1.1), os experimentos foram divididos em três etapas principais:

Etapa 1: Com o objetivo de testar a hipótese geral de trabalho, foram feitos estudos preliminares em reatores em batelada utilizando manipueira bruta e microrganismos autóctones. Nessa etapa, também foi testada, de forma preliminar, a influência da temperatura no processo.

Etapa 2: Foi desenhado um planejamento experimental, com o objetivo de testar a primeira sub-hipótese e avaliar a influência do pH inicial e da temperatura na produção de ácido lático. Adicionalmente, nessa etapa o processo de fermentação foi modelado, para obtenção da constante cinética;

Etapa 3: Utilizada para testar a segunda sub-hipótese, nessa etapa avaliou-se a produção de ácido lático em reator contínuo utilizando diferentes Tempos de Detenção Hidráulica (TDH).

4.1.1 Etapa 1: estudos preliminares em reatores em batelada

Como dados da literatura sobre produção de ácido lático utilizando manipueira e organismos autóctones são inexistentes, a primeira etapa desse trabalho foi observar o comportamento da fermentação natural da manipueira bruta, sem nenhum tipo de ajuste em sua composição. Com isso, a única variável na Etapa 1 foi a temperatura.

Pela revisão da literatura, sabe-se que o tipo de fermentação de amido de mandioca varia com a temperatura, sendo lática em regiões mais frias e butírica em condições mais quentes (AQUINO; GERVIN; AMANTE, 2016). Como o amido também está presente na manipueira, buscou-se verificar nessa etapa também a influência da temperatura no tipo de fermentação da manipueira. Com isso, foram testadas três temperaturas: 25, 30 e 36°C.

4.1.1.1 Fermentação

Para essa etapa, foram colocados 400 mL de meio reacional, manipueira e inóculo (ver 4.1.1.2), em frascos de vidro de 500 mL. Para preservar as condições naturais da manipueira, não houve ajuste inicial ou controle do pH, cujo valor inicial foi de 4,4. Além disso, não houve substituição do ar no *headspace* do reator por N_2 e, portanto, não foi obtido um meio reacional estritamente anaeróbio. Os frascos foram, selados e colocados em câmaras de controle de temperatura. Diariamente, os frascos foram agitados manualmente. Três reatores foram operados para cada temperatura, totalizando 9 reatores em batelada.

4.1.1.2 Substrato e inóculo

O substrato utilizado foi manipueira proveniente da indústria de farinha de mandioca Plaza Ind. LTDA, localizada em Santa Maria da Serra, SP. A manipueira coletada foi armazenada em recipientes plásticos de 10 L, colocados sob refrigeração em freezer a –18º C, onde permaneceram até sua utilização. A caracterização da manipueira é apresentada na Tabela 5-1.

O inóculo foi obtido a partir da fermentação natural da manipueira a 25°C por 22 dias. O fermentado foi concentrado em centrífuga e depois diluído de modo que a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no inóculo fosse de 1 $g.L^{-1}$. Cada reator foi inoculado com 10% (40 mL) deste inóculo.

4.1.2 Etapa 2: estudos de otimização e cinéticos

Nessa etapa, foram realizados ensaios em reatores em batelada a fim de obter os parâmetros ótimos de temperatura e pH para produção de ácido lático e posteriormente, utilizar essa condição para obtenção da constante cinética do processo. Para o estudo de otimização, foi desenhado um planejamento fatorial completo com três níveis em triplicata, que será detalhado no item 4.1.2.3. As temperaturas estudadas foram: 25, 30 e 35°C e os pH estudados foram 4,5, 5,5 e 6,5.

4.1.2.1 Fermentação

Frascos tipo Duran de 500 mL foram preenchidos com 400 mL de manipueira. O pH foi ajustado com soluções aquosas de NaOH ou de HCl, a depender do pH inicial da manipueira, para 4,5, 5,5 e 6,5. N_2 foi fluxionado no meio líquido por 15 minutos,

para garantir condição de anaerobiose, e os reatores foram colocados em câmaras com controle de temperatura a 25, 30 e 35°C sob agitação constante de 135 rpm.

O monitoramento da fermentação foi feito por meio de análise de pH, AL, carboidratos solúveis, com amostra filtrada em membrana de 0,45 μm , e ácidos orgânicos voláteis e álcoois.

4.1.2.2 Substrato e inóculo

O substrato utilizado foi o mesmo da etapa anterior (4.1.1.2). Não houve preparação de inóculo nem inoculação dos reatores, sendo a cultura microbiana composta pela cultura autóctone da manipueira.

4.1.2.3 Obtenção da melhor condição de temperatura e pH para produção de ácido lático

Foram avaliados os efeitos da variação de temperatura (X_1) e pH (X_2) nas respostas seletividade (S_{AL}) e rendimento de AL (Y_{AL}) utilizando planejamento fatorial. Um Planejamento Fatorial Completo (PFC) com três níveis em triplicata foi criado usando o programa computacional *Statistica* (Statsoft Inc., Tulsa, USA). As variáveis contínuas X_1 e X_2 foram codificadas com os níveis -1, 0 e 1, os quais correspondem aos valores de temperatura de 25, 30 e 35 ºC e valores de pH de 4,5, 5,5 e 6,5. Análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA). Com os resultados do planejamento fatorial, foi ajustado um modelo quadrático com interações de primeira ordem (Eq. 1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e \qquad \text{Eq. 1}$$

Na qual, Y é a variável dependente (S_{AL} ou Y_{AL}), β_0 é constante; β_1 e β_2, β_{11} e β_{12} são os feitos linear, quadrático e interativo dos fatores, respectivamente; e e é o erro.

Superfície de resposta e gráficos de contorno foram criados para os modelos de previsão que apresentaram falta de ajuste desprezível e altos valores de R^2. Coeficientes que não foram estatisticamente significativos (com p-valor maior do que 0,05) foram eliminados e os parâmetros do modelo foram recalculados antes da plotagem dos gráficos.

4.1.2.4 Análise cinética

Com os dados da melhor condição obtida, foi aproximado um modelo de reações irreversíveis de primeira ordem para modelar o consumo de substrato. Com isso, fazendo o balanço de massa em um reator em batelada perfeitamente misturado, isotérmico e com volume constante e considerando carboidratos solúveis como substrato:

$$entra - sai - reage = acúmulo \qquad \text{Eq. 2}$$

$$C_s^{entra} \cdot Q - C_s^{sai} \cdot Q - r_s \cdot V = \frac{d(VC_s)}{dt} \qquad \text{Eq. 3}$$

Nessa expressão, C_s^{entra} é a concentração de substrato que entra no sistema ($M_{substrato}.L^{-3}$), Q é a vazão em ($L^3.T^{-1}$), C_s^{sai} é a concentração de substrato que sai do sistema ($M_{substrato}.L^{-3}$), r_s é a velocidade de consumo de substrato ($M_{substrato}.L^{-3}.T^{-1}$), V é o volume do sistema (L^3), C_s é a concentração de substrato dentro do sistema ($M_{substrato}.L^{-3}$) no tempo t (T). Como não há vazão de entrada nem de saída e o volume do reator é constante:

$$r_s = -\frac{dC_s}{dt} \qquad \text{Eq. 4}$$

A velocidade de consumo de substrato deve ser expressa em termos específicos, relacionando-a à quantidade de microrganismos presentes no meio:

$$r_s' = \frac{r_s}{C_x(t)} \qquad \text{Eq. 5}$$

Nessa expressão, r_s' é a velocidade específica de consumo de substrato ($M_{substrato}.M^{-1}_{microrganismos}.L^{-3}.T^{-1}$) e C_x é a concentração de microrganismos dentro do sistema ($M_{microrganismos}.L^{-3}$).

Com isso, a Eq. 4 vira

$$r_s' \cdot C_x(t) = -\frac{dC_s}{dt} \qquad \text{Eq. 6}$$

Como foi considerada cinética de primeira ordem,

$$r_s' = k_1' \cdot C_s \qquad \text{Eq. 7}$$

Em que, k_1' é a constante de velocidade específica ($L^3.T^{-1}.M^{-1}_{microrganismos}$).

Por fim, a Eq. 4 torna-se:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_1' \cdot C_s(t) \cdot C_x(t) \qquad \text{Eq. 8}$$

Embora ocorra variação da concentração de microrganismos dentro do sistema, seu monitoramento em sistemas com substratos complexos e culturas mistas ao longo do período de fermentação não é tão simples, de forma que apenas as concentrações inicial e final de biomassa foram medidas, em termos de SSV. Dessa forma, fixou-se o valor médio de concentração de microrganismos ($\overline{C_x}$) como a média aritmética entre a concentração de SSV inicial e final. Assim, considerando que a concentração inicial ($t = t_0$) de substrato seja C_s^0, a Eq. 8 pode ser integrada entre esses limites:

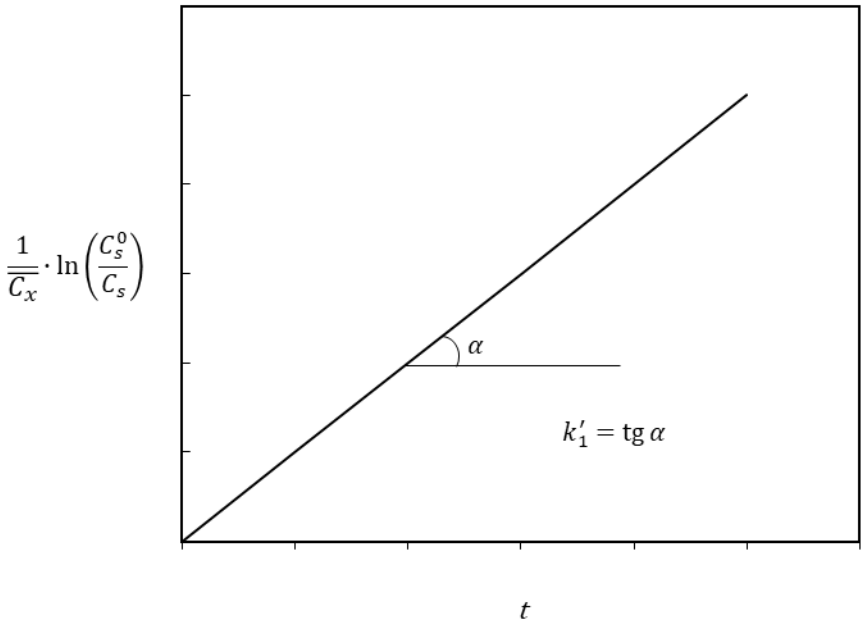
$$\int_{C_s^0}^{C_s} \frac{dC_s}{C_s} = -k_1' \cdot \overline{C_x} \int_{t_0}^{t} dt \qquad \text{Eq. 9}$$

Integrando a Eq. 9 e considerando $t_0 = 0$, tem-se:

$$\ln\left(\frac{C_s^0}{C_s}\right) = k_1' \cdot \overline{C_x} \cdot t \qquad \text{Eq. 10}$$

Em posse dos dados de consumo de carboidratos, foi possível determinar k_1', utilização regressão matemática, como pode ser exemplificado na Figura 4-1.

Figura 4-1 - Representação gráfica da variação da concentração de substrato com o tempo para reação irreversível de primeira ordem



4.1.2.5 Determinação do Tempo de Detenção Hidráulica em reator contínuo

Para dimensionar o reator contínuo utilizado neste trabalho, foi utilizado k_1' obtido na análise cinética do item 4.1.2.4. Para isso, foi feito o balanço de massa em reator de fluxo de pistão ideal, isotérmico, com volume constante e em estado estacionário, considerando cinética de primeira ordem.

Fazendo o balanço de massa em um volume de controle dV:

$$entra - sai - reage = acúmulo \qquad \text{Eq. 11}$$

Como o reator está em estado estacionário:

$$C_s \cdot Q - (C_s + dC_s) \cdot Q - r_s' \cdot C_x \cdot dV = 0 \qquad \text{Eq. 12}$$

$$-dC_s \cdot Q = k_1' \cdot C_s \cdot C_x \cdot dV \qquad \text{Eq. 13}$$

Nessas equações, C_s é a concentração de substrato ($M_{substrato}.L^{-3}$), Q é a vazão em ($L^3.T^{-1}$), V é o volume do sistema (L^3), r_s' é a velocidade específica de consumo de substrato ($M_{substrato}.M^{-1}_{micorganismos}\ L^{-3}.T^{-1}$), k_1' é a constante de velocidade específica

($L^3.T^{-1}.M^{-1}_{microrganismos}$) e C_x é a concentração de microrganismos dentro do sistema ($M_{microrganismos}.L^{-3}$).

Integrando a Eq. 13, considerando que a concentração de microrganismos não varia ao longo do reator, assumindo um valor constante $\overline{C_x}$ ($M_{microrganismos}.L^{-3}$):

$$-\int_{C_{s_0}}^{C_S} \frac{dC_s}{C_s} = \frac{1}{Q} k_1' \cdot \overline{C_x} \int_0^V dV \rightarrow -[\ln(C_s) - \ln(C_{s_0})] = \frac{1}{Q} k_1' \cdot \overline{C_x} \cdot V \qquad \text{Eq. 14}$$

$$\ln\left(\frac{C_{s0}}{C_s}\right) = \frac{V}{Q} k_1' \cdot \overline{C_x} \qquad \text{Eq. 15}$$

Utilizando as definições de fator de conversão de substrato (X_s) e tempo de detenção hidráulica (TDH), chega-se:

$$TDH = \frac{V}{Q} = \frac{1}{k_1' \cdot \overline{C_x}} \ln\left[\frac{C_{s0}}{C_{s0}(1 - X_s)}\right] = \frac{1}{k_1' \cdot \overline{C_x}} \ln\left(\frac{1}{1 - X_s}\right) \qquad \text{Eq. 16}$$

Pela Eq. 16 observa-se que, de posse dos valores de k_1' e C_{s_0}, estimando $\overline{C_x}$ e adotando um valor de interesse para X_S, é possível obter o TDH teórico.

Como não há uma referência para produção de biomassa utilizando manipueira em RALFE, a estimativa da $\overline{C_x}$ foi baseada no trabalho desenvolvido por Anzola-Rojas et al. (2015), no qual foram medidas concentrações de biomassa presente em reatores tubulares de leito fixo, utilizando cilindros de PAD e reator sistema acidogênico. Com isso, a média aritmética das concentrações de biomassa das quatro condições operacionais testadas no trabalho de Anzola-Rojas et al. (2015) foi utilizada como estimativa para $\overline{C_x}$, cujo valor foi 20,6 g $SSV.L^{-1}$.

4.1.3 Etapa 3: operação do reator contínuo

O Reator Anaeróbio de Leito Fixo Estruturado (RALFE) foi utilizado nessa etapa do trabalho. Reatores de leito estruturado favorecem a aderência da biomassa na superfície do material suporte, aumentando o tempo de retenção celular e ao mesmo tempo minimizam o entupimento do leito, dificultando que sejam formados caminhos preferenciais que modifiquem o escoamento característico do reator (MOCKAITIS et al., 2011).

4.1.3.1 Substrato e inoculação

Devido a necessidade de mudança de estado do autor da pesquisa, para essa etapa do trabalho foi utilizada manipueira coletada em uma casa de farinha localizada no município de Taquarana, região agreste do estado de Alagoas. Com isso, houve diferenças entre as características da manipueira daquela usada nas etapas 1 e 2. Após coleta, a manipueira foi armazenada em freezer a -18º C até sua utilização.

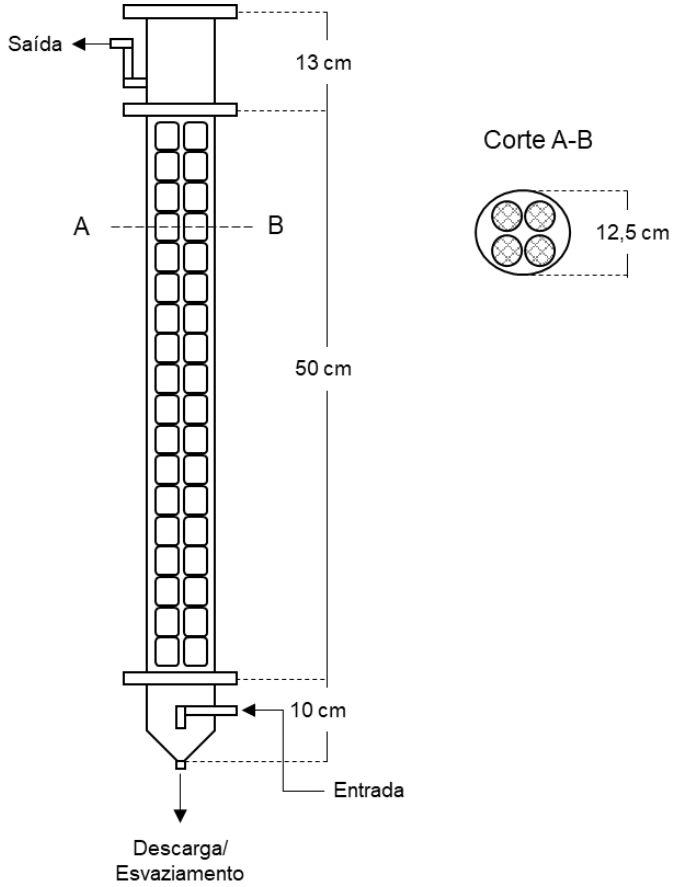
A inoculação do RALFE foi feita segundo uma adaptação da metodologia adotada por Gomes et al. (2016). O RALFE foi preenchido com manipueira bruta e o sistema foi mantido à temperatura ambiente por três dias, para estimular a autofermentação dos carboidratos. Nesses três dias, o RALFE se encontrava aberto à atmosfera. Após isso, o reator foi selado e a manipueira acidificada foi recirculada dentro do reator durante 5 dias na temperatura de trabalho, 35°C. A vazão de recirculação foi mantida em aproximadamente 2,1 $mL.min^{-1}$, que foi a vazão inicial adotada, considerando o TDH inicial de 12 h.

O começo da operação ocorreu com a substituição de manipueira fermentada recirculada por nova alimentação de manipueira.

4.1.3.2 Aparato experimental e condições operacionais

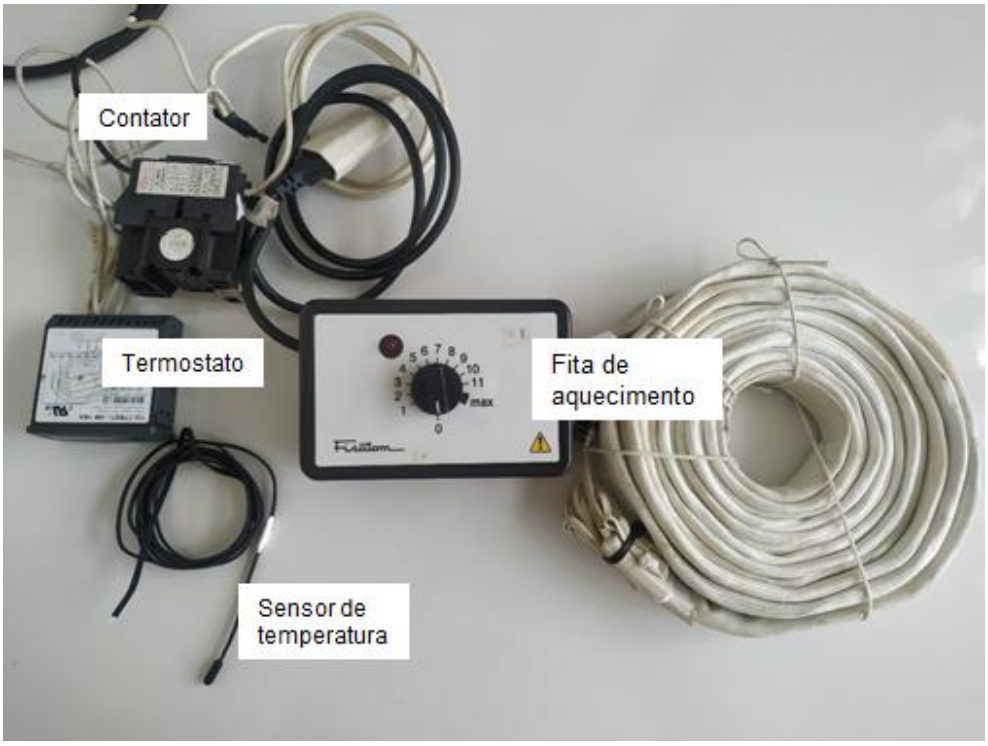
O desenho esquemático do RALFE é mostrado na Figura 4-2. O reator foi construído em acrílico com as seguintes dimensões: diâmetro externo 12,5 cm, diâmetro interno de 11,7 cm, altura total de 73 cm, altura da zona reacional de 50 cm. O volume total do reator era de 2,18 L. A alimentação com a manipueira era feita pela parte inferior do reator, por meio de uma bomba peristáltica de laboratório (*Gilson Miniplus Evolution*), com saída pela parte superior.

Figura 4-2- Desenho esquemático do RALFE



Foram utilizadas para as condições ótimas de temperatura e pH inicia obtidas na Etapa 2. O ajuste do pH foi realizado com uso de soluções aquosas de NaOH ou de HCl, a depender do pH inicial da manipueira. O controle de temperatura dentro do reator foi realizado por meio de um sistema composto por uma fita de aquecimento da marca Fisatom com 2,5 cm de largura e comprimento total de 5 m, um termostato da marca Full Gauge modelo TIC- 17RGTi, um sensor de temperatura e um contator (Figura 4-3).

Figura 4-3 – Sistema de controle de temperatura utilizado na Etapa 3



Nessa etapa foi avaliada a viabilidade de produção de AL em reator contínuo aplicando diferentes TDH. O TDH inicial aplicado foi obtido a partir da Eq. 16 utilizando a análise cinética apresentada nos itens 4.1.2.4 e 4.1.2.5. Posteriormente, o TDH foi gradativamente reduzido, a fim de observar se haveria influência positiva na concentração de AL produzido. Com isso, três condições de TDH foram avaliadas, as quais são mostradas na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Condições operacionais aplicadas ao RALFE durante a Etapa 3

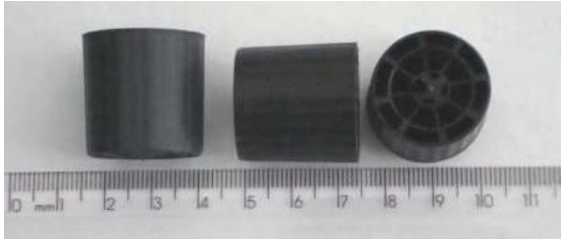
Fase	Duração (dias)	TDH (h)
1	103	12
2	42	10
3	38	8

4.1.3.3 Material suporte

O RALFE foi preenchido com cilindros MOD940 da AMBIO Engenharia LTDA, que foram estruturados por meio de hastes de aço inoxidável. A mídia MOD940 é feita em Polietileno de Alta Densidade (PAD) e possuía 25 mm de altura e de diâmetro (Figura 4-4). O polietileno foi indicado no trabalho desenvolvido por Silva et al. (2006)

como material suporte mais adequado para utilização em reatores acidogênicos. A utilização dos cilindros de MOB940 foi devido à maior facilidade de estruturação do leito.

Figura 4-4 – Cilindros de polietileno de alta densidade (MOD940, Ambio Eng. LTDA) como suporte para imobilização da biomassa na Etapa 3



4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

O monitoramento dos reatores em batelada se deu pelo acompanhamento dos parâmetros de interesse de amostras retiradas do meio reacional ao longo do período de fermentação. Para monitorar o RALFE, foram realizadas análises do afluente e efluente do reator de duas a três vezes por semana. As análises de monitoramento realizadas foram pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO) bruta e solúvel, carboidratos totais e solúveis, ácido lático, ácidos graxos voláteis e álcoois e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV). Também foi realizada a determinação da relação entre os isômeros de AL (D-AL /L-AL) nas Etapas 2 e 3 do trabalho.

As determinações de pH, SSV e DQO total e solúvel foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Carboidratos totais e solúveis foram quantificados de acordo com o método de Dubois et al. (1956). Para a análise de DQO e carboidratos solúveis, as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm. Ácido lático foi determinado pelo método colorimétrico desenvolvido por Taylor (1996). Ácidos graxos voláteis e álcoois foram determinados por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP- INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura de filme), segundo Adorno; Hirasawa; Varesche (2014).

A relação entre os isômeros do ácido lático foram determinados pelo teste UV para determinação de D- e L-ácido lático em alimentos e outros materiais (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) (BOHN et al., 2017).

4.2.1 Avaliação do desempenho dos reatores

A avaliação do desempenho dos reatores foi feita por meio das variáveis: fator de conversão de carboidratos (X_s), concentração de ácido lático produzido (P_{AL}), seletividade de ácido lático (S_{AL}), relação entre os isômeros de ácido lático (D-AL/L-AL), rendimento de ácido lático (Y_{AL}).

Conversão de carboidratos

Para os ensaios em reatores em batelada, a conversão de carboidratos foi calculada por meio da Eq. 17.

$$X_s = \frac{C_{ch}^{i} - C_{ch}^{f}}{C_{ch}^{i}} \qquad \text{Eq. 17}$$

Em que, X_s é o fator de conversão de carboidratos; C_{ch}^{i} e C_{ch}^{f} são as concentrações inicial e final de carboidratos, respectivamente.

Para o RALFE, a conversão de carboidratos foi calculada pela Eq. 18.

$$X_s = \frac{C_{ch}^{a} - C_{ch}^{e}}{C_{ch}^{a}} \qquad \text{Eq. 18}$$

Em que, C_{ch}^{a} e C_{ch}^{e} são as concentrações de carboidratos afluente e efluente, respectivamente.

Concentração de ácido lático produzido

É definida como a quantidade de ácido lático produzida durante o processo de fermentação. Para os reatores em batelada foi calculada segundo a Eq. 19 e para os RALFE, usou-se a Eq. 20.

$$C_{AL} = C_{AL}^{f} - C_{AL}^{i} \qquad \text{Eq. 19}$$

Em que, C_{AL} é a produção de ácido lático, C_{AL}^{f}e C_{AL}^{f}são as concentrações de ácido lático final e inicial, respectivamente.

$$C_{AL} = C_{AL}^{e} - C_{AL}^{a} \qquad \text{Eq. 20}$$

Em que, C_{AL}^{e} e C_{AL}^{a} são as concentrações de ácido lático efluente e afluente, respectivamente.

Seletividade de ácido lático

A seletividade é calculada pela relação entre a concentração de ácido lático e soma das concentrações dos produtos da fermentação. Para se ter uma base de comparação igual para todos os compostos, a seletividade foi calculada por meio da DQO equivalente de cada composto. Para o cálculo da DQO equivalente foi feita uma relação estequiométrica para encontrar quanto de O_2 seriam necessários para oxidar o composto em questão, que gerou a Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Equivalente DQO para os compostos de interesse

Composto	**Equivalente DQO**
Glicose	1,1 g $O_2.g^{-1}$ Glicose
Ácido lático	0,5 g $O_2.g^{-1}$ AL
Ácido Acético	1,1 g $O_2.g^{-1}$ AA
Etanol	2,1 g $O_2.g^{-1}$ Etanol

Com isso, a seletividade do ácido lático foi calculada de acordo com a Eq. 21.

$$S_{AL} = \frac{AL_{EqDQO}}{\sum Produtos_{EqDQO}} \qquad \text{Eq. 21}$$

Em que, AL_{EqDQO} é a concentração de ácido lático produzido em equivalentes DQO e $\sum Produtos_{EqDQO}$ é a somatória da produção em equivalentes DQO de todos os produtos de fermentação determinados.

Rendimento de ácido lático em termos de DQO

O cálculo do rendimento de ácido lático foi feito pela relação entre concentração de ácido lático produzido e consumo de carboidratos. Para os reatores em batelada, foi utilizada a Eq. 22 e para o reator contínuo, foi utilizada a Eq. 23.

$$Y_{AL} = \frac{C_{AL}}{C_{Ch}^{i} - C_{Ch}^{f}} \qquad \text{Eq. 22}$$

$$Y_{AL} = \frac{C_{AL}}{C_{Ch}^{a} - C_{Ch}^{e}} \qquad \text{Eq. 23}$$

Em que, Y_{AL} é o rendimento de ácido lático, em termos de DQO, calculado de acordo com o mesmo procedimento explicado para Seletividade.

Carga de carboidratos aplicada ao reator

Essa variável apenas foi quantificada no RALFE e é baseada no conceito de Carga Orgânica Volumétrica, com a consideração de concentração de carboidratos afluente, em vez de DQO. Foi calculada segundo a Eq. 24.

$$CCh_a = \frac{C_{Ch}^{a}}{TDH} \qquad \text{Eq. 24}$$

Em que, CCh_a é a carga de carboidratos aplicada ($g_{Ch}.L^{-1}.h^{-1}$).

Vazão mássica de ácido lático

É calculada pelo produto entre a concentração de ácido lático efluente ao RALFE e a vazão.

$$Q_{AL} = C_{AL}^{e} \cdot Q \qquad \text{Eq. 25}$$

Em que Q_{AL} é a vazão mássica de AL em g AL.dia^{-1} e Q é a vazão do efluente em L.dia^{-1}.

4.2.2 Análise da comunidade microbiana

4.2.2.1 Coleta e preparação das amostras

Reatores em batelada - Etapa 2:

Amostras de biomassa foram retiradas dos reatores após a finalização do período de fermentação. Foram preparadas amostras compostas, compreendidas de quantidades iguais das triplicatas de cada condição testada. As amostras compostas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 25ºC, para concentração da biomassa. O sobrenadante foi descartado e uma parte das amostras compostas de cada condição foi diluída para distribuição nas lâminas, que iriam ser observadas no microscópio. A outra parte do pellet microbiano foi lavado com solução tampão PBS (1X) e preservado a -20 ºC.

Reator contínuo - Etapa 3:

Amostras de biomassa suspensa e aderida ao meio suporte de PAD foram retiradas. Para obtenção da biomassa aderida ao material suporte, os cilindros de PAD retirados do reator foram submersos em água destilada dentro de um recipiente de vidro, que foi agitado manualmente até não haver resquícios visíveis de biomassa aderida ao material. Tanto a amostra de biomassa aderida quanto da suspensa foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e pellets microbianos foram armazenados a -20°C.

4.2.2.2 Caracterização microbiana por microscopia óptica

Na Etapa 2 do trabalho foram realizadas análises de microscopia óptica para caracterização da morfologia dos microrganismos presentes em cada condição testada. Além disso, também foi realizado o teste da coloração Gram (MADIGAN et al., 2010). As análises foram feitas sob microscopia óptica em contraste de fases utilizando o microscópio Olympus BX60-FLA. As imagens foram capturadas por meio de câmera acoplada (Sistema *Optronics*) com o auxílio do software *Image Pro-Plus* versão 3.0.1.

4.2.2.3 Extração de DNA, sequenciamento metabarcoding do gene 16S rRNA e processamento de bioinformática

A metodologia para caracterização da comunidade microbiana das etapas 2 e 3 foi realizada de acordo com a seguinte descrição: DNA genômico foi extraído usando o conjunto *FastDNA® Spin Kit for Soil* (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Amplificação da região V4 do gene 16S rRNA de Bacteria foi feita a utilização dos primers 515F (5′ −GTGCCAGCMGCCGCGGTAA–3′) e 806R (5′–GGACTACNNGGGTATCTAAT–3′). Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas com o conjunto *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, USA). As bibliotecas de sequências foram geradas com o auxílio do *NEBNext® Ultra DNA Library Pre-Kit for Illumina* (New England Biolabs, Ipswich, USA) e o sequenciamento emparelhado foi conduzido em uma plataforma Illumina HiSeq 2500. O processamento dos dados por bioinformática foi realizado exatamente como descrito por Silva et al. (2021).

Resumidamente, as sequências foram unidas, podadas e filtradas por qualidade (número máximo de erros esperados = 1%). As sequências duplicadas,

singletons e quimeras foram removidos. Unidades taxonômicas operacionais (UTO) com 97% de similaridade entre si foram criadas utilizando-se o algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). A anotação taxonômica foi conduzida com o SINTAX e utilizando-se o RDP 16S rRNA training set v16 como banco de dados de referência (Edgar, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa parte do trabalho são os resultados obtidos ao longo da realização do trabalho, tomando como base as hipóteses e os objetivos previamente definidos e as informações obtidas pesquisa bibliográfica.

5.1 ETAPA 1: ESTUDOS PRELIMINARES EM REATORES EM BATELADA

As características da manipueira utilizada nessa etapa são apresentadas na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 – Caracterização da manipueira coletada em Santa Maria da Serra, utilizada nas Etapas 1 e 2 do trabalho

Parâmetro	
DQO (g O_2.L^{-1})	46,8
Concentração de carboidratos - C_{Ch}(g Ch.L^{-1})	20,7
pH	4,4
SST (mg.L^{-1})	1287
SSV (mg.L^{-1})	1224

Os resultados apresentados a seguir são referentes aos ensaios preliminares em batelada, nos quais se avaliou a possibilidade de produção de ácido lático a partir de manipueira e sua cultura autóctone, além de uma avaliação preliminar da influência da temperatura na formação dos produtos na fermentação da manipueira durante 18 dias.

5.1.1 Produtos da fermentação da manipueira

Os principais produtos de fermentação da manipueira foram AL, etanol (EtOH) e ácido acético (AA) Figura 5-1. As concentrações dos produtos gerados durante a fermentação foram subtraídas pelas suas respectivas concentrações iniciais, com o objetivo de apresentar apenas a quantidade gerada no experimento.

Na temperatura de 25°C, AL foi o produto formado em maior concentração durante toda a fermentação, com concentração molar máxima de 144 mmol AL.L^{-1} ao final do experimento. O segundo maior produto de fermentação foi o etanol, com comportamento ao longo do tempo semelhante ao apresentado pelo AL, porém em menor concentração molar, com valor máximo de 91 mmol AL.L^{-1}, também obtida no

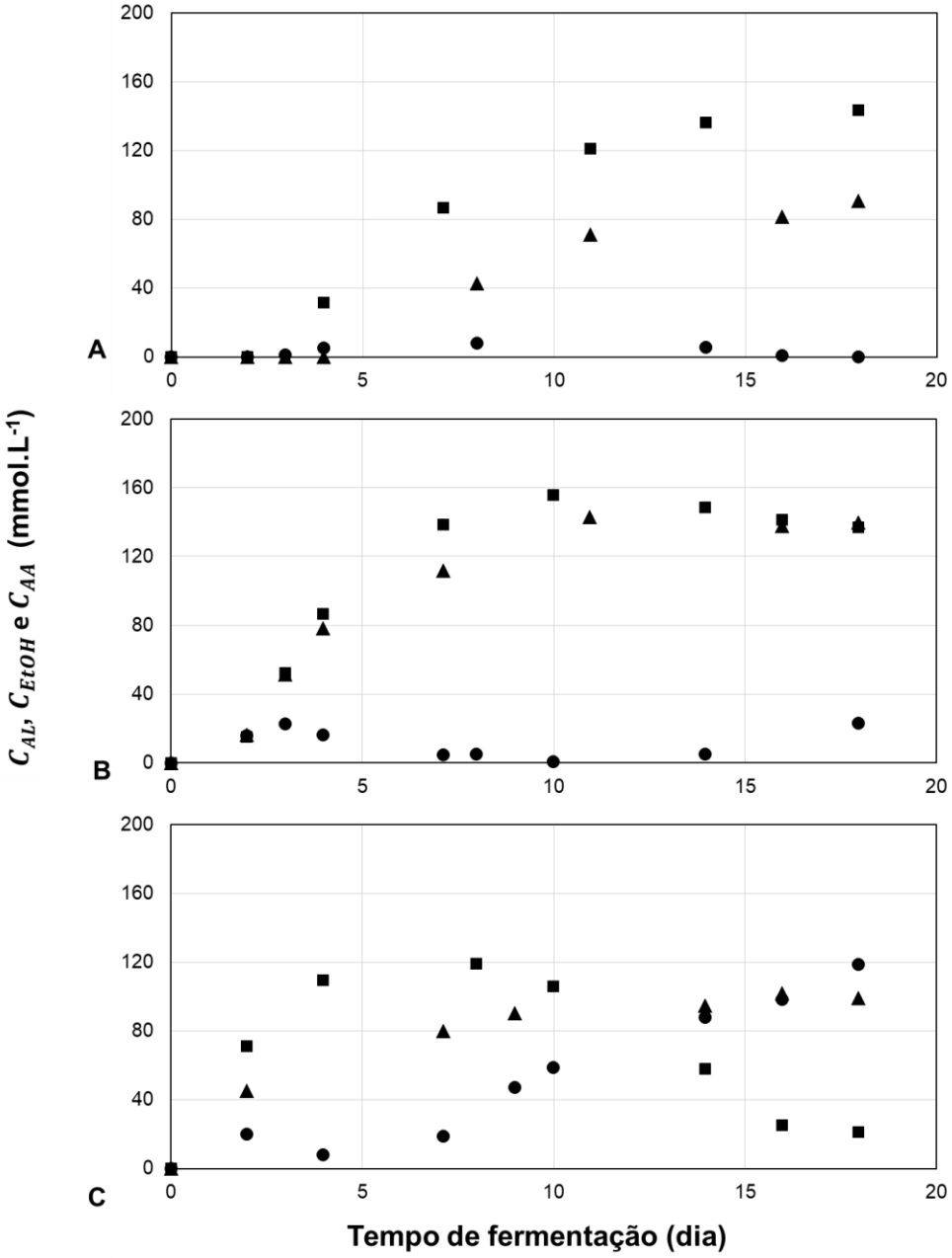
18° dia de fermentação. A concentração de AA não apresentou aumento significativo, chegando a ser menor do que a inicial no 18° dia de fermentação.

Na fermentação conduzida a 30° C, as concentrações molares de AL e etanol seguiram próximas, com concentrações equimolares no 17° dia de fermentação. A partir do 10° dia de fermentação foi observado um provável consumo de AL para formação de AA, fenômeno que não foi observado na temperatura de 25° C. As concentrações máximas de AL e etanol foram, 156 mmol $AL.L^{-1}$ no 10° dia e 143 mmol $AL.L^{-1}$ no 11° dia, respectivamente.

Na temperatura de 36° C, o AL foi o principal produto de fermentação e atingiu concentração máxima de 119 mmol $AL.L^{-1}$ no 8° dia de fermentação, a partir do qual, a sua concentração diminuiu, seguido por um aumento da concentração de AA, fenômeno que se mostrou de forma mais expressiva do que na temperatura de 30º C. A concentração de AL chegou a 21 mmol $AL.L^{-1}$, enquanto a concentração de AA atingiu 119 mmol $AL.L^{-1}$ no 18° dia de fermentação. A concentração de etanol aumentou com o passar da fermentação, com valor máximo de 99 mmol $AL.L^{-1}$ no 18° dia de fermentação.

Foi observada, nas fermentações a 30 e 36º C, a redução da concentração de AL com concomitante aumento da concentração de AA. Uma hipótese para a redução da concentração de AL e produção de AA é o favorecimento de outras culturas microbianas, devido à redução do pH e de carboidratos no meio, já que AL pode ser metabolizado por outras espécies de bactérias para formar AA, etanol, CO_2 e H_2 sob condições anaeróbias (ROSA et al., 2016).

Figura 5-1 – Etapa 1: Produtos da fermentação de manipueira a diferentes temperaturas. A: 25° C, B: 30° C e C: 36° C. AL (■), EtOH (▲) e AA (●)



5.1.2 Concentração produzida de ácido lático

Para verificar se as concentrações máximas das três temperaturas testadas diferem entre si, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com nível de significância α=0,05. O p-valor para o teste foi menor do que o nível de significância, indicando que a temperatura influenciou na concentração máxima de ácido lático. O resultado do teste indicou que as temperaturas de 25 e 30° C não são diferentes entre

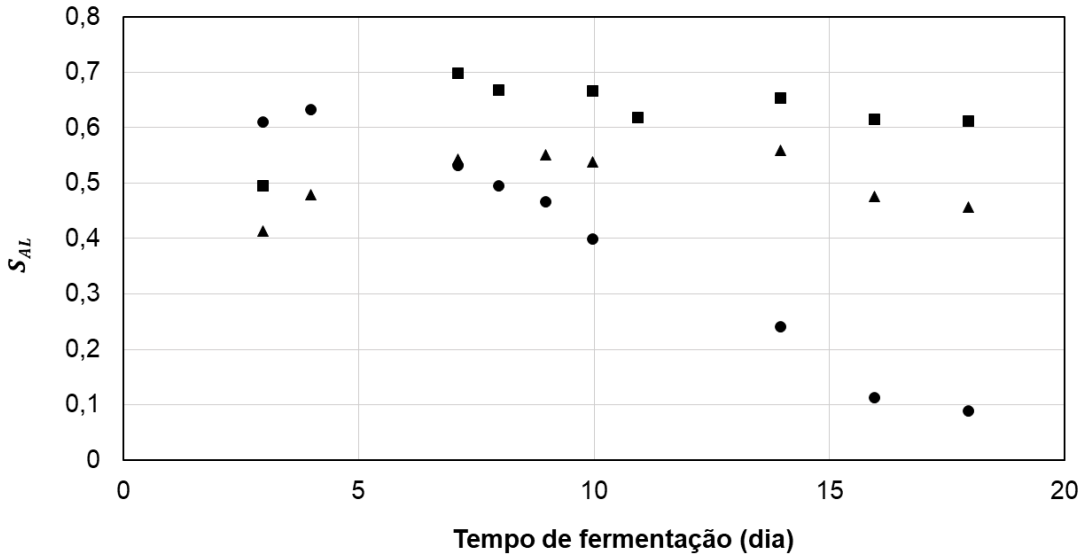
si e que resultaram em concentrações máximas de ácido lático maiores do que as obtidas na temperatura de 36° C.

Mesmo não existindo diferença estatística entre as concentrações máximas de ácido lático nas temperaturas de 25 e 30° C, a máxima concentração na temperatura de 30° C foi alcançada no 10° dia de fermentação, enquanto a concentração máxima foi obtida em quase o dobro do tempo na temperatura de 25° C, 18 dias.

5.1.3 Seletividade do ácido lático

Como pode ser observado na Figura 5-1, a variação da temperatura gerou comportamentos bastante distintos entre os produtos de fermentação, o que influenciou na seletividade do ácido lático, como pode ser visto na Figura 5-2.

Figura 5-2 – Etapa 1: Seletividade do ácido lático com relação aos outros produtos. 25° C (■), 30° C (▲) e 36° C (●)



Durante os primeiros 4 dias, a seletividade do ácido lático foi maior na temperatura de 36° C, atingindo o valor de 0,6, principalmente pelo fato da velocidade da reação de produção de ácido lático ser maior nessa temperatura, enquanto nas temperaturas de 25 e 30° C o aumento da concentração de ácido lático se deu de maneira mais lenta.

No decorrer da fermentação, a seletividade de ácido lático na temperatura de 36° C decresceu progressivamente até atingir 0,1, devido ao consumo deste ácido e formação de ácido acético. Já nas temperaturas de 25 e 30° C, a seletividade

aumentou até o 7° dia e permaneceu praticamente constante até o 14° dia, com valores de 0,65 e 0,56, respectivamente. A partir do 16º dia, a concentração apresenta uma diminuição, atingindo valores de 0,61 e 0,46 para 25 e 30° C, respectivamente.

Devido a produção de etanol ser favorecida na temperatura de 30° C em relação à temperatura de 25° C, a seletividade na temperatura de 25° C foi maior do que a de 30° C durante toda a fermentação.

5.1.4 Tipo de fermentação

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que houve prevalência de organismos heterofermentativos, já que, concomitantemente à produção de ácido lático, há também a produção de etanol. Adicionalmente, durante a fermentação houve produção de CO_2, o que também é característico de heterofermentação, pois na rota da pentose monofosfato há a liberação de CO_2 na conversão de hexoses a pentoses.

Na temperatura de 30° C houve produção quase equimolar de ácido lático e etanol, enquanto na temperatura de 25° C, a produção de etanol foi em média, 50% da produção de ácido lático. Isso pode implicar que, em temperaturas menores, a atividade das enzimas da rota de formação do etanol foi reduzida. Outra possível explicação foi o favorecimento dos organismos homofermentativos na temperatura de 25° C.

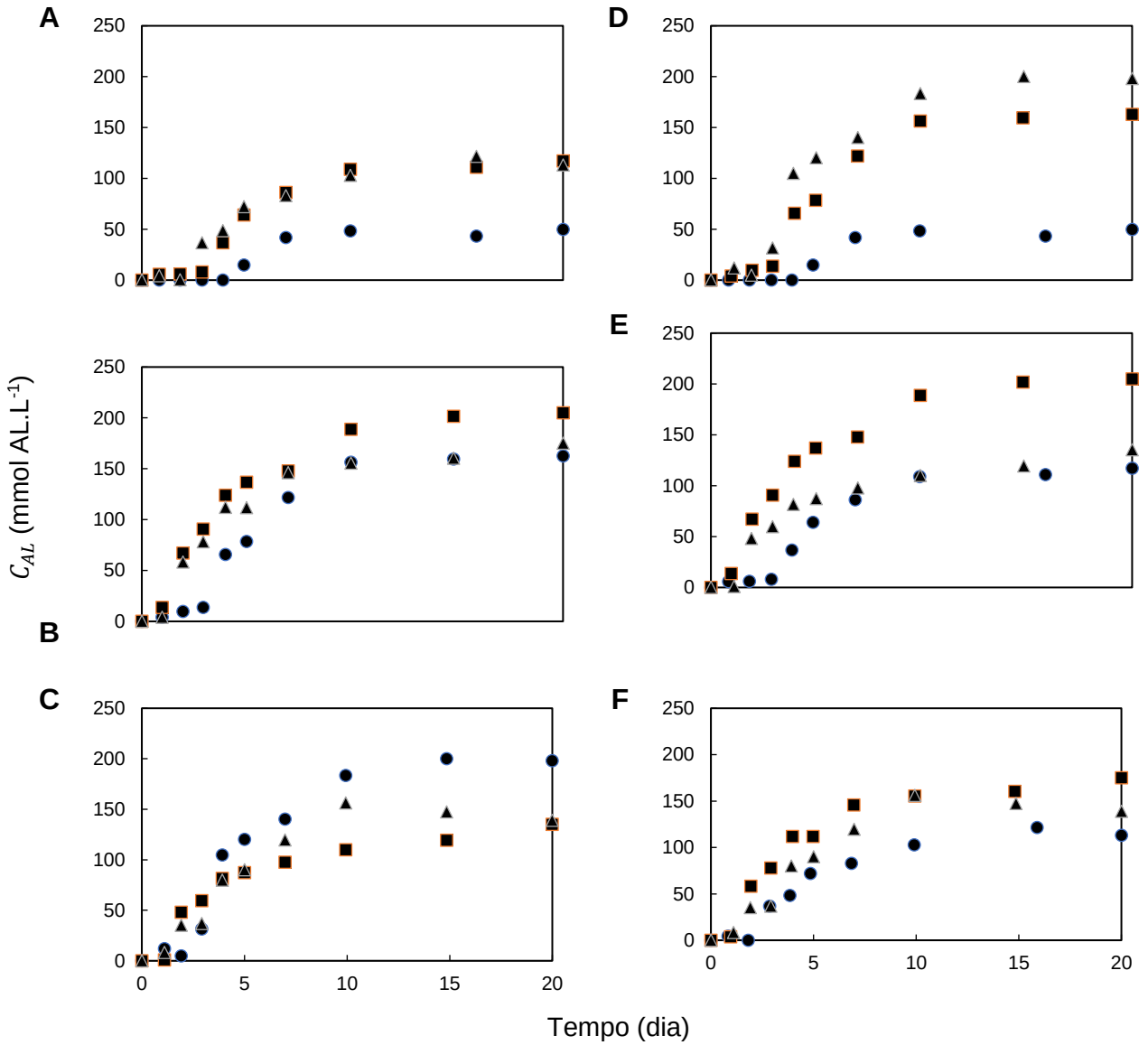
Nessa etapa preliminar da pesquisa pôde-se observar o comportamento geral da fermentação da manipueira em reatores em batelada. Um dos principais resultados obtidos dessa etapa foi a confirmação de que a fermentação natural da manipueira produz ácido lático. Foi notável também constatar que houve influência no comportamento da fermentação com a condição de temperatura usada e pH inicial original da manipueira (pH de 4,4). Por isso, optou-se em fazer um estudo mais aprofundado nas condições iniciais de fermentação, em especial ajuste do pH inicial, e temperatura de fermentação.

5.2 ETAPA 2: ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO E CINÉTICOS

5.2.1 Concentração produzida de ácido lático

A variação da concentração produzida de AL para cada condição testada encontra-se na Figura 5-3. Da mesma forma que a Etapa 1, as características da manipueira utilizada na Etapa 2 são apresentadas na Tabela 5-1.

Figura 5-3- Etapa 2: Variação da C_{AL} ao longo do tempo de fermentação em função de diferentes temperaturas valores de pH. Gráficos **A**, **B** e **C** mostram a variação do pH (● 4,5; ■ 5,5; e ▲ 6,5) nas temperaturas **A**: 25° C, **B**: 30° C e **C**: 35° C. Gráficos **D, E** e **F** mostram a variação da temperatura (● 25° C; ■ 30° C; e ▲ 35° C) nos diferentes valores de pH **D**: 4,5, **E**: 5,5 e **F**: 6,5



Na temperatura mais baixa, 25° C, a menor produção de ácido lático ocorreu com pH de 4,5. Essa condição (25° C e pH 4,5), além de apresentar um tempo de adaptação maior do que as outras condições (4 dias), apresentou o pior desempenho comparando todas as condições de temperatura e pH testadas com produção de apenas 50 mmol $AL.L^{-1}$. As fermentações com valores de pH 5,5 e 6,5 foram bastante similares, atingindo 117 e 113 mmol $AL.L^{-1}$ no 20° dia de fermentação, respectivamente, mais do que o dobro da concentração obtida com pH 4,5.

O aumento da temperatura para 30° C proporcionou melhora significativa na produção de ácido lático em todos os valores de pH. Nessa temperatura, a maior concentração de ácido lático obtida foi com pH de 5,5, atingindo 205 mmol $AL.L^{-1}$, maior valor observado, considerando todas as condições de pH e temperatura testadas. A fermentação com pH 4,5 e 30° C teve melhor desempenho comparada com o mesmo pH na fermentação a 25° C, sendo obtidos 163 mmol $AL.L^{-1}$. O aumento do pH para 6,5 não provocou melhora na fermentação, resultando em uma concentração de 175 mmol $AL.L^{-1}$, não muito distante da obtida com pH 4,5.

A fermentação na temperatura de 35° C levou a resultados bastante diferentes das outras temperaturas. Nessa condição, o melhor desempenho foi obtido no menor valor de pH testado, alcançando 200 mmol $AL.L^{-1}$ no 15º dia de fermentação. Com pH 5,5, a máxima concentração foi 135 mmol $AL.L^{-1}$. Já com pH 6,5, o maior valor obtido foi 156 mmol $AL.L^{-1}$.

Como na literatura não há estudos de produção de ácido lático a partir de manipueira utilizando sua cultura autóctone, estudos de produção de ácido lático a partir de substratos alternativos com cultura mista foram usados para comparação.

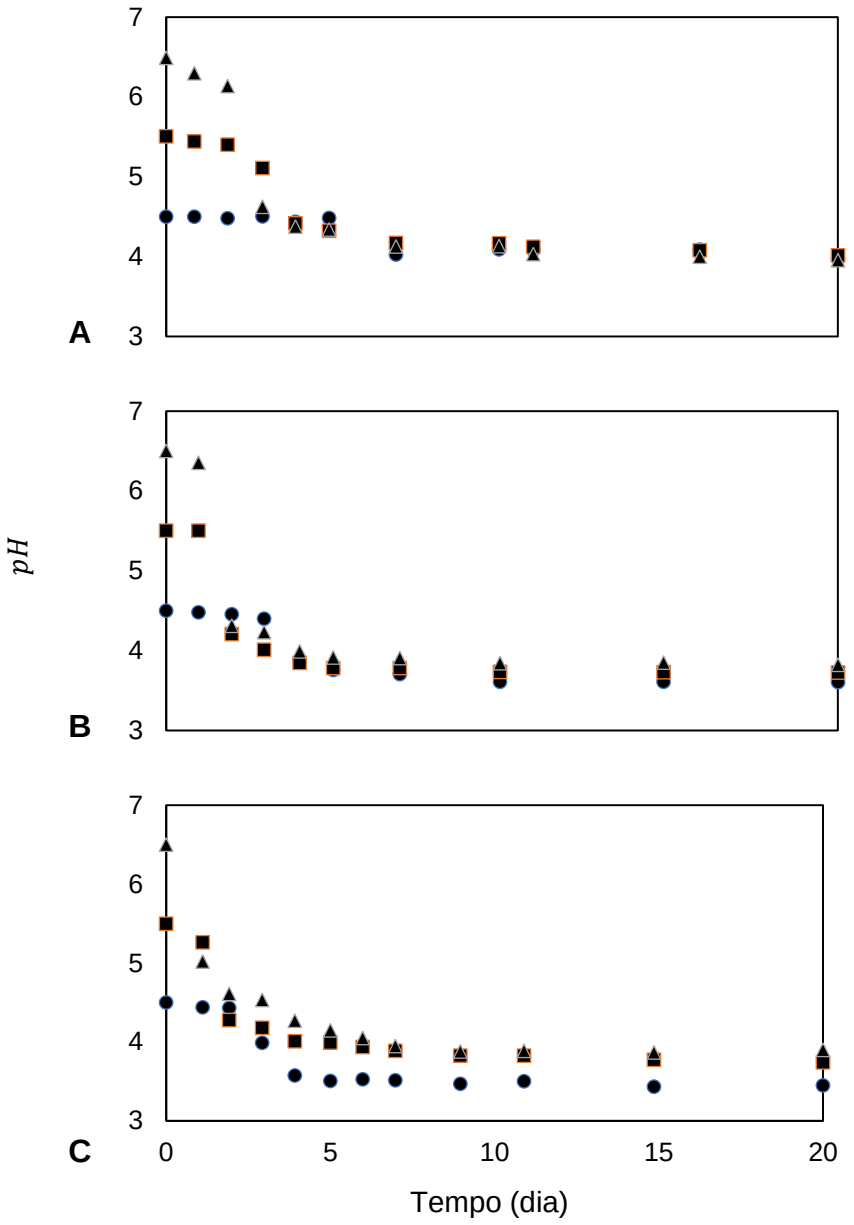
Em geral, os resultados obtidos para produção de ácido lático com cultura autóctone e sem controle de pH obtidos nessa etapa são muito diferentes dos apresentados na literatura. O controle do pH ao longo da fermentação é fortemente aconselhado, já que as BAL, em sua maioria, são conhecidas por ter crescimento inibido em baixos valores de pH (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011). Bonk et al. (2017) observaram concentração de ácido lático menor em ensaios sem ajuste de pH do que com ajuste de pH na fermentação de resíduo de alimento por cultura mista. Os autores associaram o resultado à inibição por produto, já que a produção de ácido lático baixou o pH do meio para 2,96. Tang et al. (2016, 2017)

também não obtiveram resultados satisfatórios na fermentação de resíduo de alimento por cultura mista sem ajuste de pH. Nesse caso, o pH do meio chegou a 3,3 e inibição pelo baixo valor de pH foi a justificativa pelo pior desempenho observado nos ensaios.

Pelo contrário, nessa etapa do trabalho, em nenhuma das condições houve controle do pH ao longo da fermentação e isso não dificultou o processo. A única modificação da manipueira antes da fermentação foi o ajuste do pH inicial. Em todas as condições, o pH decresceu para valores próximos de 4 nos primeiros 4 dias de fermentação (Figura 5-4). Destaque para a fermentação com pH 4,5 e 35°C, na qual o pH foi reduzido para 3,5 com 5 dias de fermentação e mesmo assim foi a condição com o segundo melhor resultado de produção de ácido lático. Não controlar o pH do meio ao longo da fermentação é uma vantagem técnica e econômica, o que torna o processo mais atrativo.

A utilização de um resíduo real juntamente com cultura autóctone de microrganismos pode ter favorecido a fermentação para a produção de ácido lático sem o controle do pH. Como a manipueira é um resíduo de fermentação rápida, seu pH decresce para valores muito baixos. Com isso, muitos dos organismos que estão presentes já suportam essa condição extrema de pH, além de que culturas mistas se adaptam mais facilmente a variações das condições ambientais (DRESCHKE et al., 2015) e, com isso, há possibilidade de selecionar organismos que realizam determinadas reações apenas modificando parâmetros operacionais.

Figura 5-4 – Etapa 2: Variação do pH ao longo da fermentação. A: 25° C, B: 30° C e C: 35° C. ● pH inicial 4,5; ■ pH inicial 5,5; e ▲ pH inicial 6,5



A variação da temperatura teve um efeito positivo na concentração de ácido lático. As fermentações na temperatura mais baixa testada (25° C) apresentaram pior desempenho em todas as condições de pH (Figura 5-3D, E e F). Comparando a produção de ácido lático nas fermentações de 30 e 35° C, o maior destaque está nos resultados com pH de 5,5, em que os ensaios a 30° C apresentaram melhores resultados. Em geral, a maioria dos estudos para produção de ácido lático utiliza temperatura na faixa mesofílica, entre 30 e 40°C. Condições mais extremas, como temperatura na faixa termofílica, são usadas apenas quando se deseja selecionar organismos para produzir um tipo de isômero do ácido lático (AKAO et al., 2007).

Em alguns estudos, após um algum tempo de fermentação, a concentração de ácido lático diminuiu, juntamente com o aumento da concentração de ácidos orgânicos voláteis, como acetato, propionato e butirato. Tang et al. (2016, 2017) relataram esse consumo de ácido lático em pH 6 e temperatura de 37° C e Zhang et al. (2017) observaram o mesmo fenômeno com pH de 7 e 9 e 35° C e pH de 7 e 8 e 50° C. Uma desvantagem da utilização de culturas mistas para produção de ácido lático está no fato de vários organismos com diferentes metabolismos estarem presentes no sistema. Como o ácido lático é um intermediário, se as condições ambientais favorecerem, organismos consumidores de ácido lático irão transformá-lo em outro composto.

Contudo, na presente etapa do trabalho não houve consumo de ácido lático para produção de outros compostos. Como pode ser observado na Figura 5-3, em nenhuma condição houve tendência a diminuição da concentração de ácido lático, permanecendo em um patamar estável durante 20 dias de fermentação. Uma explicação seria que a cultura autóctone da manipueira é bem específica e formada principalmente por BAL. Outro motivo pode ser o fato de as condições da fermentação serem bastante extremas, com relação ao pH (próximo de 3,5), e poucos organismos conseguem se desenvolver nesse ambiente.

5.2.2 Tipo de fermentação e seletividade

Na Figura 5-5 são apresentados os produtos de fermentação para todas as condições testadas. Como pode ser observado, apenas foram formados ácido lático

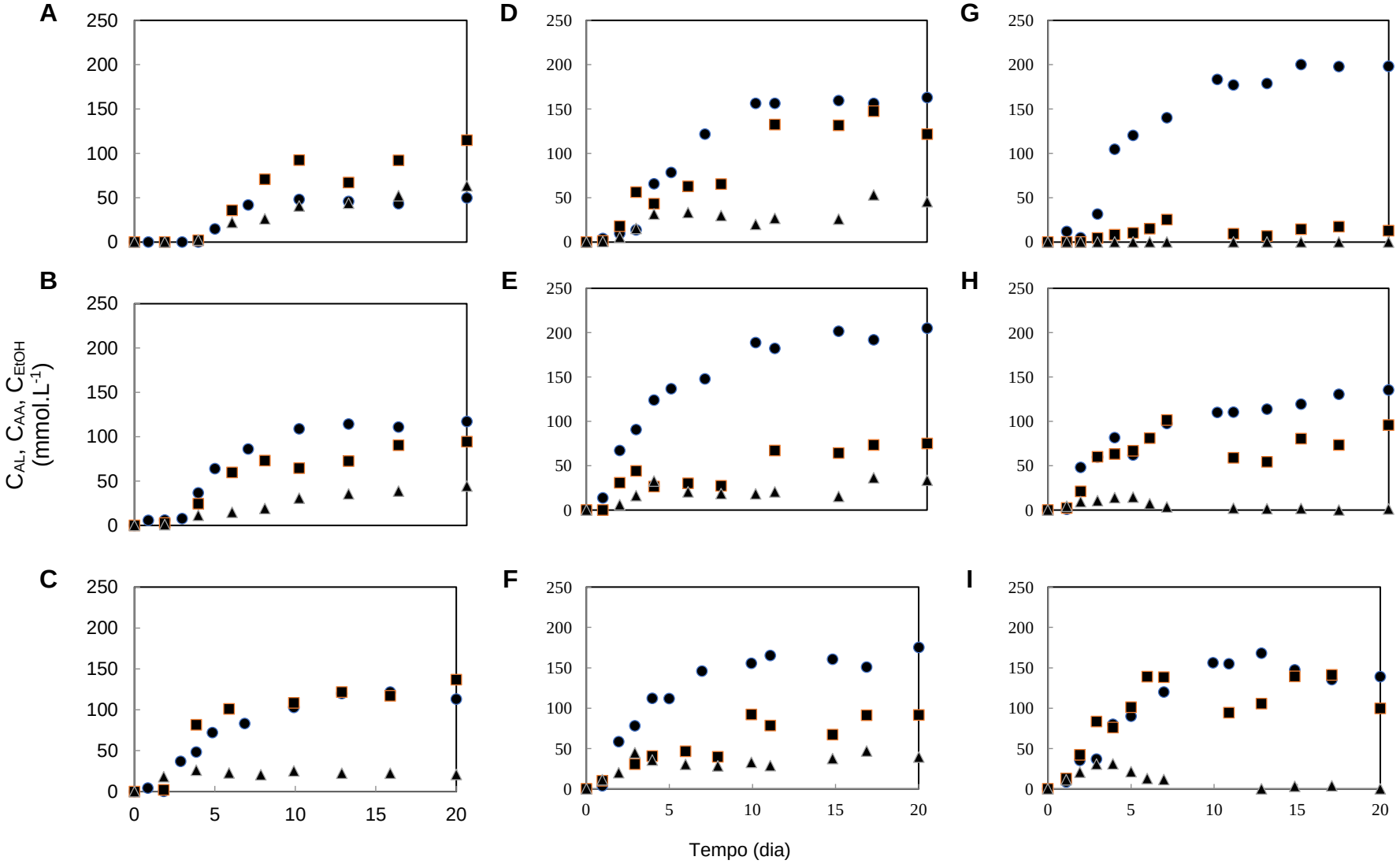
(●), etanol (■) e ácido acético (▲). A variação das condições de pH e temperatura influenciou consideravelmente a proporção de cada produto.

Na condição com temperatura de 25° C e pH de 4,5 (Figura 5-5A), além de ter ocorrido heterofermentação, com a formação de concentrações equimolares de ácido lático e ácido acético, também houve fermentação alcóolica, pois etanol atingiu concentrações maiores do que a de ácido lático durante toda a fermentação. Com aumento do pH na mesma temperatura, houve mudança de rota, com favorecimento da fermentação heterolática, com concentrações equimolares de ácido lático e etanol, enquanto que não houve aumento significativo na concentração de ácido acético, a qual atingiu 25 $mmol.L^{-1}$, comparada com 122 $mmol.L^{-1}$ de ácido lático e etanol.

Com temperatura de 30° C (Figura 5-5D, E e F) também houve heterofermentação com produção de ácido lático, etanol e ácido acético. No entanto, na fermentação com pH de 5,5 houve atividade de organismos homoláticos, já que a concentração molar de ácido lático é maior do que a soma das concentrações de etanol e ácido acético. Com pH de 4,5 na mesma temperatura, heterofermentação foi bastante favorecida.

Na temperatura de 35°C, heterofermentação aconteceu nas condições com pH de 5,5 e 6,5 com produção de ácido lático e etanol. No entanto, com pH de 4,5 não houve aumento da concentração de ácido acético nem aumento significativo de etanol, indicando que essa condição favoreceu os organismos homofermentativos.

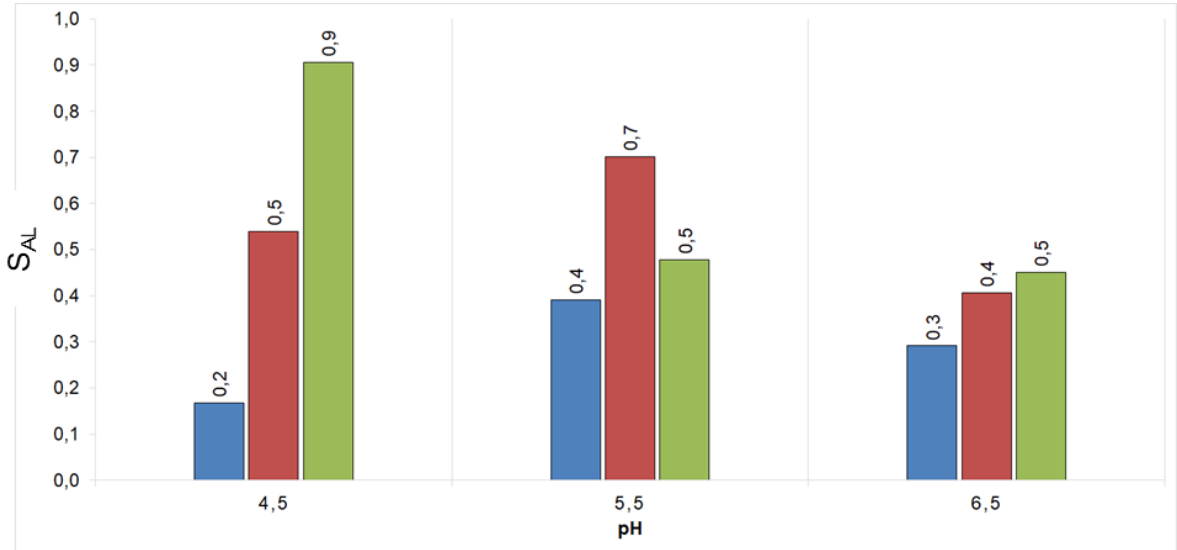
Figura 5-5- Etapa 2: Produtos de fermentação ao longo do tempo. A (25°C, pH 4,5), B (25°C, pH 5,5), C (25°C, pH 6,5), D (30°C, pH 4,5), E (30°C, pH 5,5), F (30°C, pH 6,5), G (35°C, pH 4,5), H (35°C, pH 5,5) e I (35°C, pH 6,5). ●AL, ■ EtOH e ▲ AA



Uma das desvantagens da produção biotecnológica de ácido lático utilizando substratos complexos e culturas mistas é a presença de outros compostos além de ácido lático no produto final. Isso resulta em demanda técnica e econômica para purificação do ácido lático. Por isso, homofermentação é preferida à heterofermentação, como é o caso da fermentação da manipueira em temperatura de 35° C e pH 4,5.

Como a fermentação de ácido lático com temperatura de 35° C e pH de 4,5 foi majoritariamente homolática, a seletividade do ácido lático com relação aos produtos de fermentação foi muito alta, chegando a 0,9 no 10° dia fermentação (Figura 5-6). A seletividade da condição 25° C e pH 4,5 foi a mais baixa de todas (0,2) justamente por ter ocorrido fermentação alcóolica, na qual o ácido lático não é produzido, em conjunto com a heterofermentação. A outra condição que se destacou, com seletividade 0,7, foi 30° C e pH 5,5, com maior concentração de ácido lático. No entanto, como ocorreu heterofermentação, sua seletividade não foi muito alta.

Figura 5-6 – Seletividade do AL com relação aos produtos de fermentação (AL, AA e EtOH) após 10 dias de fermentação. ■ 25° C, ■30° C ■ 35° C



Com esses resultados de seletividade, nota-se que houve diferença no comportamento das fermentações com pH de 4,5 (Figura 5-3D e Figura 5-5A, D e G) desta etapa em comparação com a Etapa 1 (Figura 5-1). Embora submetidas às mesmas condições de lote de manipueira, pH e temperatura (pH ~4,5 e temperatura de 25, 30 e 35º C), houve expressiva diferença entre as fermentações. Conforme descrito em nos itens 4.1.1.1 e 4.1.2.1, na Etapa 1 não houve fluxionamento de N_2,

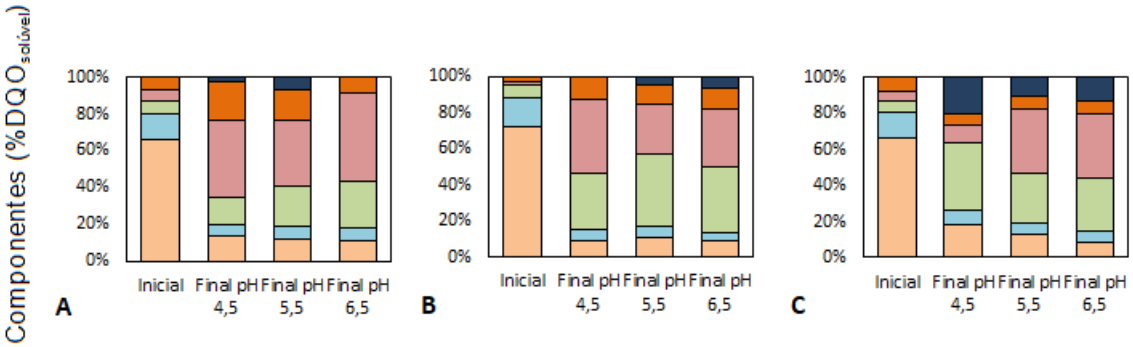
enquanto na Etapa 2, N_2 foi fluxionado no meio líquido por 15 minutos, garantindo a condição anaeróbia dentro dos reatores.

Para a condição de pH de 4,5 e temperatura de 35º C, a manutenção do meio anaeróbio favoreceu a produção e manutenção da concentração de AL durante o experimento, de modo que, no 10º dia de fermentação, a seletividade de AL foi expressivamente maior do que a verificada no mesmo período na Etapa 1.

5.2.3 Balanço de DQO

Na Figura 5-7 são apresentados os gráficos com o balanço de DQO para cada condição testada. Em geral, os compostos presentes na manipueira bruta no início das bateladas são os mesmos presentes no final da fermentação. Isso pode indicar que em todas as condições ocorreu fermentação lática e que a cultura autóctone da manipueira é predominantemente composta de organismos produtores de ácido lático.

Figura 5-7 – Etapa 2: Balanço de DQO para as diferentes condições de temperatura (**A**: 25° C, **B**: 30° C e **C**: 35° C) e pH. ■ carboidratos solúveis, ■ proteína, ■ ácido lático, ■ etanol, ■ ácido acético, ■ outros



É possível observar que a única condição que varia muito em relação às demais é 35° C e pH 4,5 (Figura 5-7C), na qual a maioria do substrato foi usado para produção de ácido lático, havendo consumo de ácido acético e pouco aumento da concentração de etanol.

Com o balanço de DQO é possível calcular o rendimento de ácido lático em relação ao consumo de carboidratos solúveis (Tabela 5-2).

Tabela 5-2 – Etapa 2: Rendimento de ácido lático com relação a carboidratos solúveis nas condições de temperatura e pH testadas

Condição		Y_{AL} (g $DQO_{AL}.g^{-1}$ DQO_{Ch})
Temperatura (°C)	pH	
25	4,5	0,2
	5,5	0,3
	6,5	0,3
30	4,5	0,5
	5,5	0,5
	6,5	0,5
35	4,5	0,9
	5,5	0,5
	6,5	0,4

Nas condições de temperatura 25 e 30° C, houve rendimentos bastante similares dentre os valores de pH testados, chegando no máximo a 0,3 e 0,5 respectivamente. Destaque para temperatura 35° C pH 4,5, que teve o maior rendimento com relação ao consumo de carboidratos com 0,9.

5.2.4 Variação dos isômeros

A relação entre os isômeros do ácido lático para cada condição testada é apresentada na Tabela 5-3.

Tabela 5-3 – Etapa 2: Relação entre os isômeros do ácido lático nas condições de temperatura e pH testadas

Condição		**D-ácido lático/L-ácido lático**
Temperatura (°C)	pH	
25	4,5	1,0
	5,5	1,0
	6,5	1,0
30	4,5	1,1
	5,5	1,1
	6,5	0,9
35	4,5	1,2
	5,5	1,2
	6,5	1,1

Em todas as condições, a relação entre os isômeros é próxima a 1, o que significa que uma mistura racêmica dos dois isômeros está sendo formada pelos organismos presentes. A condição 30° C e pH 6,5 levou ao menor valor da relação, enquanto as condições 35° C pH 4,5 e pH 5,5 resultaram os maiores valores.

Uma das principais vantagens em utilizar microrganismos para produção de ácido lático é a possibilidade de se obter isômeros opticamente puros. Nesses casos, são utilizados microrganismos específicos em meios esterilizados. No entanto, há demanda de mercado também para misturas de proporções diferentes de L e D-ácido lático, como é o caso do PDLLA, o qual é utilização principalmente em aplicações na medicina (ANNUNZIATA et al., 2017; DESTEFANO; KHAN; TABADA, 2020; GIEREJ et al., 2019; HE; WANG; DING, 2013; LI et al., 2015; YAO et al., 2020).

De toda forma, há alternativas operacionais para favorecer a produção de um determinado isômero ou inibir a produção de outro. Akao et al. (2007), conseguiram produzir e manter L-ácido lático opticamente puro (99%) utilizando cultura mista a partir da variação das condições de pH e temperatura, a partir de resíduo sólido sintético, composto por restos de alimentos. Os autores encontraram que maior pureza foi obtida com temperatura 55° C e pH 5,5. No entanto, a manutenção da pureza do ácido lático é muito sensível à variação desses dois parâmetros. O aumento do pH em temperatura menor que 60° C causou produção de butirato e gás e a diminuição da temperatura, mantendo pH 5,5, levou à produção de mistura racêmica. Outros estudos também relataram mudança da pureza do isômero do ácido lático com a variação das condições ambientais, como o de Zhang et al. (2008).

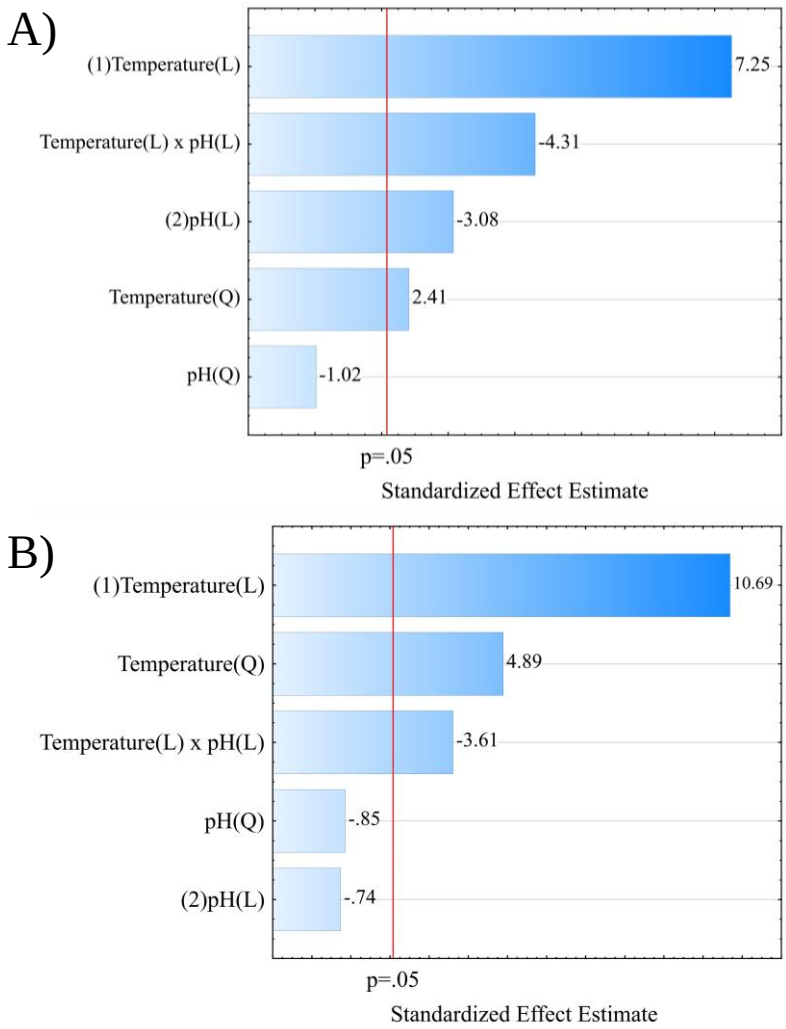
5.2.5 Modelo empírico e análise de superfície de resposta

Resultados obtidos do PFC foram utilizados para avaliar o efeito da temperatura (X_1), do pH (X_2) e da sua interação (X_1, X_2) na produção de ácido lático a partir de manipueira e sua cultura mista autóctone. As variáveis investigadas foram S_{AL} e Y_{AL}. Diagramas de Pareto dos efeitos normalizados mostram que os efeitos lineares da temperatura são os mais significativos para as duas respostas (no intervalo de confiança de 95%), promovendo um efeito positivo na produção de ácido lático (Figura 5-8).

Efeitos lineares do pH afetaram negativamente a seletividade, mas não tiveram efeitos no rendimento. Interessante ressaltar que os efeitos da interação entre pH e temperatura também foram significativos nas duas respostas analisadas, tendo um impacto negativo na fermentação de ácido lático. Ou seja, o aumento no pH inicial do meio reacional reduziu a produção de ácido lático em altas temperaturas (30-35º C), enquanto efeito oposto ocorreu em baixas temperaturas, como nos experimentos

submetidos à temperatura de 25º C, nos quais o aumento do pH favoreceu a produção de AL.

Figura 5-8 – Etapa 2: Fatores e interações significativas apresentados pelos diagramas de Pareto dos efeitos normalizados para A): S_{AL}; e B) Y_{AL}



Também foram aproximados modelos empíricos a partir dos resultados do PFC para prever as respostas de S_{AL} e Y_{AL} em função da temperatura e pH. A qualidade do ajuste, calculado a partir de ANOVA, mostraram que os dois modelos de regressão são preditivos (Tabela 5-4 e Tabela 5-5).

Tabela 5-4 – Etapa 2: Resultado da ANOVA com nível de significância de 5% para o ajuste do modelo quadrático para os resultados de S_{AL}

	SQ[a]	DF[b]	VMQ[c]	F-valor	p-valor
Regressão	1.0	4	0.2	21.6	<0.0001
Resíduos	0.3	22	0.0		
Falta de ajuste	0.2	4	0.0	12.6	<0.0001
Erro	0.1	18	0.0		
Total	1.2	26			

[a] soma dos quadrados; [b] graus de liberdade; e [c] valor médio quadrático

Tabela 5-5 – Etapa 2: Resultado da ANOVA com nível de significância de 5% para o ajuste do modelo quadrático para os resultados de Y_{AL} da Etapa 2

	SQ[a]	DF[b]	VMQ[c]	F-valor	p-valor
Regressão	0.6	3	0.2	52.0	<0.0001
Resíduos	0.1	23	0.0		
Falta de ajuste	0.0	5	0.0	1.9	0.1505
Erro	0.1	18	0.0		
Total	0.7	26			

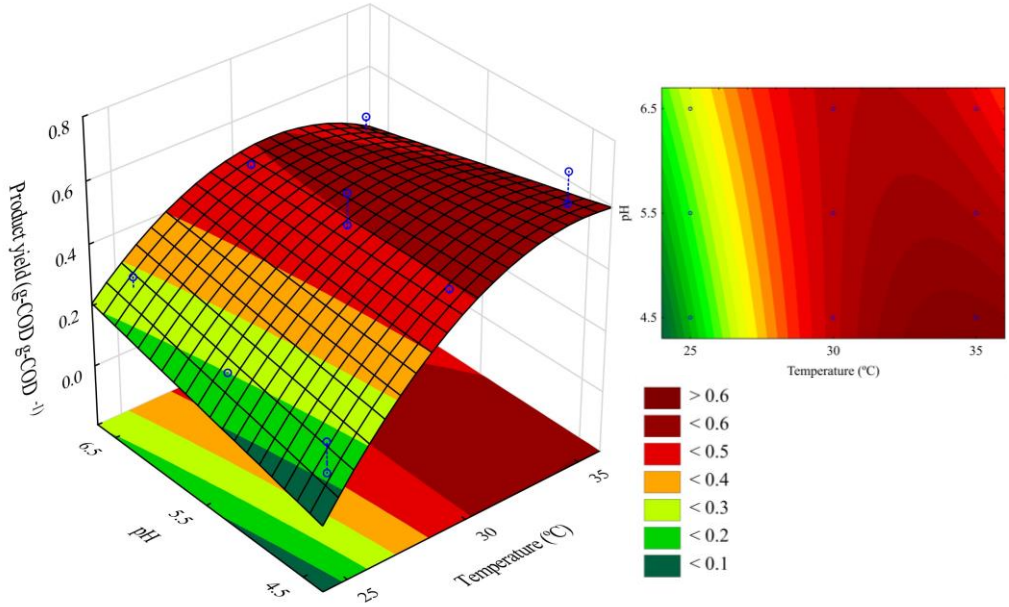
[a] soma dos quadrados; [b] graus de liberdade; e [c] valor médio quadrático

O modelo teve bom ajuste para a resposta Y_{AL} (p-valor = 0,15). No entanto, para as respostas de S_{AL}, a falta de ajuste foi significativa. Esses resultados mostram que o modelo quadrático com interações de primeira ordem não é apropriado para prever S_{AL} na faixa de valores de pH e temperatura analisados. Com isso, para operação do RALFE na Etapa 3, utilizou-se a condição que apresentou maior Y_{AL}: temperatura de 35º C e pH de 4,5.

Modelo empírico e superfície de resposta criados para modelar Y_{AL} são mostrados na Eq. 26 e Figura 5-9, respectivamente.

$$Y_{AL} = 0{,}489 + 0{,}161\, X_1 - 0{,}128\, X_1^2 - 0{,}067\, X_1 X_2 \qquad \text{Eq. 26}$$

Figura 5-9 – Etapa 2: Superfície de resposta e gráfico de contorno para PFC criado usando o modelo quadrático. Variável dependente: rendimento de ácido lático (Y_{Al}, g $DQO_{AL}.g^{-1}$ DQO). R^2=0,87. Coeficientes que não foram estatisticamente significativos (p-valor > 0,05) foram removidos antes da plotagem da superfície

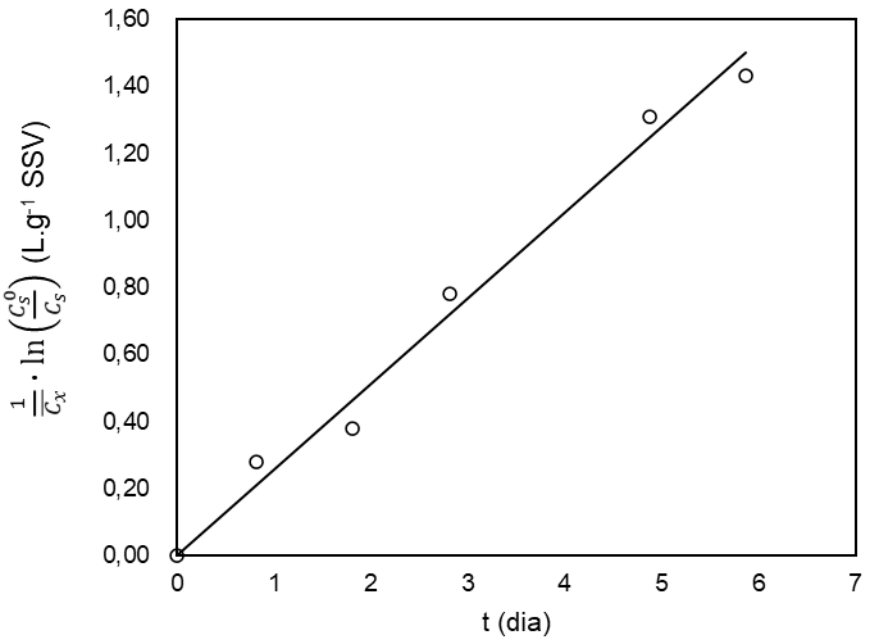


5.2.6 Análise cinética

Com os dados da condição de temperatura e pH escolhida na Etapa 2 (35º C e pH de 4,5), foi realizada uma análise cinética, para a obtenção da constante de velocidade específica de consumo de substrato e racionalizar o dimensionamento do RALFE (ver itens 4.1.2.3 e 4.1.2.4).

Plotando a Eq. 10 com os dados de consumo de carboidratos obtidos da fermentação na condição 35º C e pH de 4,5 e ajustando um modelo linear, tem-se o gráfico da Figura 5-10.

Figura 5-10 – Etapa 2: Representação gráfica da variação da concentração substrato com o tempo a partir dos dados medidos de carboidratos solúveis (○) e o modelo linear ajustado (−) da condição com temperatura 35º C e pH de 4,5



O valor de $\overline{C_x}$ utilizado foi 1603,65 mg SSV.L^{-1}, calculado como a média aritmética entre a concentração de SSV do meio reacional no início da fermentação e no final, cujos valores são 1224,0 mg SSV.L^{-1} e 1983,3 mg SSV.L^{-1}, respectivamente.

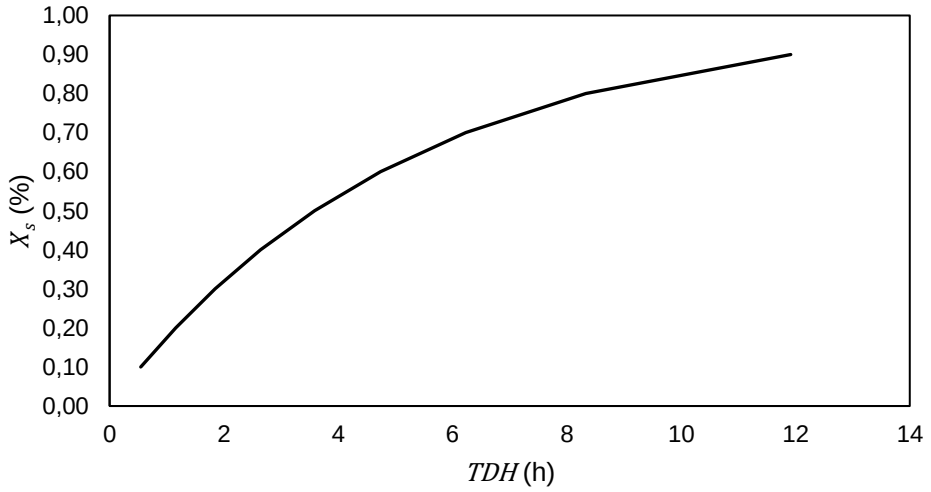
O modelo linear aproximado (R^2=0,995) para os dados da Figura 5-10 é apresentado na Eq. 27.

$$\frac{1}{\overline{C_x}} \ln\left(\frac{C_s^0}{C_s}\right) = 0{,}255 \cdot t \qquad \text{Eq. 27}$$

Com isso, 0,255 L.g^{-1} SSV.dia^{-1} foi o valor estimado para constante de velocidade específica de consumo de carboidratos da fermentação da manipueira utilizando sua cultura mista autóctone na temperatura de 35º C e pH de 4,5. Com o valor de k_1' pôde-se utilizar uma abordagem mais racional para modelar o processo e fazer aumento de escala. Neste caso, k_1' foi usada para fazer uma análise de qual o TDH inicial seria mais adequado para ser aplicado ao RALFE na Etapa 3.

Utilizando a Eq. 16 e o valor de k_1', plotou-se o gráfico da Figura 5-11, que relaciona o TDH necessário para atingir a conversão de carboidratos, X_s. O valor de $\overline{C_x}$ estimado dentro do RALFE foi de 20,6 g SSV.L^{-1}, como explicado em 4.1.2.5.

Figura 5-11- Etapa 2: Relação entre TDH e X_s obtida a partir da Eq. 16, com valor de $\overline{C_x}$ de 20,6 g SSV.L^{-1}



A partir dos resultados apresentados na Figura 5-11, definiu-se por um X_s de 0,9, o que corresponde a um TDH de 12 h para o reator contínuo.

5.2.7 Caracterização da comunidade microbiana

A comunidade microbiana autóctone da manipueira foi caracterizada por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S, previamente amplificado. Um total de 79.416 sequências foram obtidas após filtro de qualidade, as quais foram agrupadas em 71 OTUs com 97% de similaridade. A cobertura (índice de Good) obtida foi de 80.0%. A Figura 5-12A mostra que 98% das bactérias encontradas na microbiota autóctone da manipueira são similares ao gênero *Lactobacillus*. Gêneros semelhantes a *Weissela*, *Thauera*, *Sporosarcina* e representantes de *Acidobacteria* também foram encontrados em menor quantidade. Uma classificação mais detalhada a nível de UTO, mostrou a presença de, pelo menos, quatro lactobacilli distintos (Figura 5-12B).

Caracterização semelhante foi encontrada por Rosa et al. (2014), que utilizaram uma mistura de manipueira com glicose (50%) para produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado, mantendo um pH do meio entre 4 e 4,5 e temperatura de 30ºC. O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de suinocultura e a manipueira foi submetida a

tratamento ácido e térmico antes de ser alimentada ao reator. Análise filogenética do rRNA 16S realizada em amostras de biomassa retiradas do efluente do reator mostraram que 98,2% das sequências analisadas correspondiam à família Lactobacillaceae e que 76,8% dos clones eram associados ao gênero *Lactobacillus* sp.

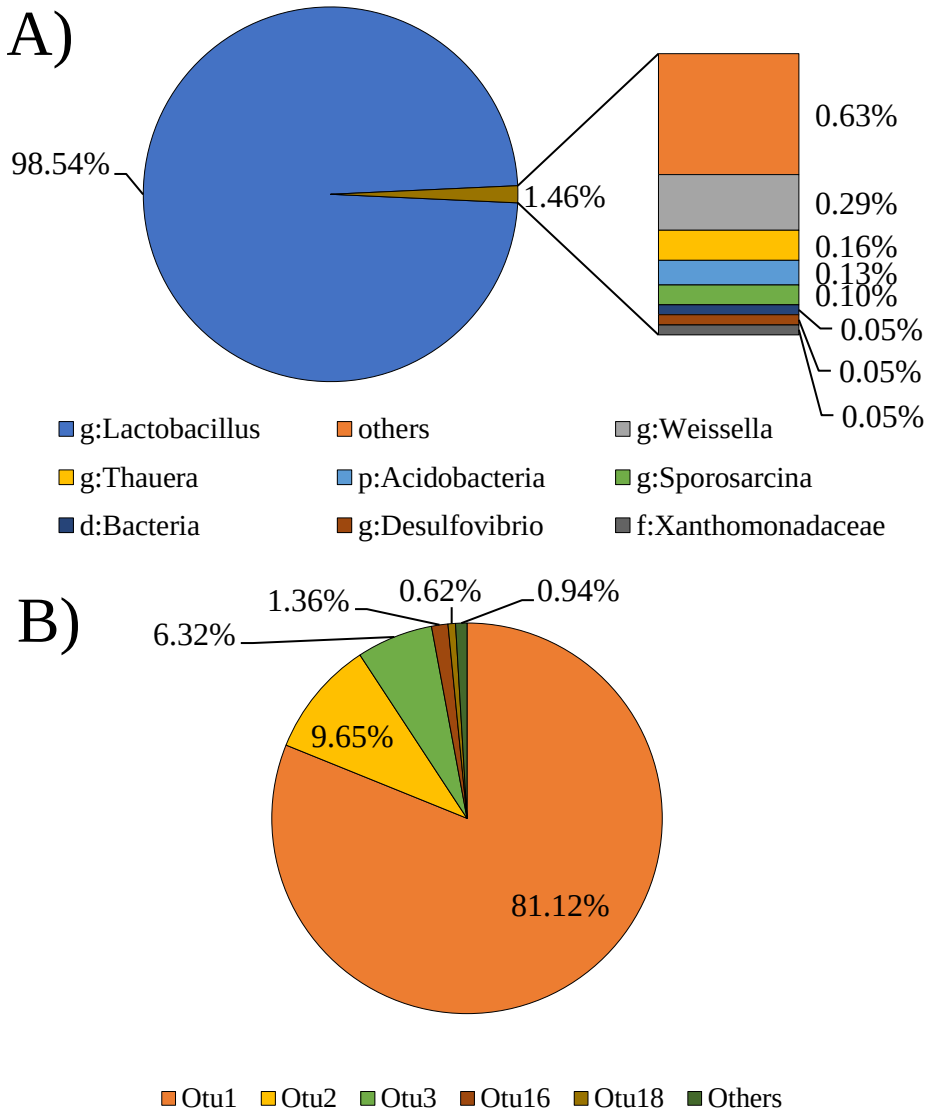
Gomes et al. (2016) identificaram bacteriocinas associadas com BAL na fermentação de manipueira em reator contínuo de tubos múltiplos, o que foi associado à inibição da produção de hidrogênio. Interessante ressaltar que mesmo após pré-tratamentos ácido e térmico, ainda foi possível identificar presença de bacteriocinas.

Tang et al. (2016) observaram composição semelhante na microbiota autóctone de resíduo de alimento com alto teor de amido, no qual *Lactobacillus* e *Weissela* foram predominantes (valores de abundância relativa de 49,64% e 19,18%, respectivamente). Após a fermentação, a proporção de *Lactobacillus* aumentou para 99,29%, o que foi relacionado à diminuição do pH do meio para 4,0, visto que esses organismos são resistentes a condições ácidas (MADIGAN et al., 2014). Isso também explica a alta abundância relativa na manipueira utilizada.

O valor encontrado para a dominância, a nível de gênero, de organismos semelhantes a *Lactobacillus* foi 0,03, o que explica os resultados de produtos de fermentação encontrados. Espécies de *Lactobacillus* são divididas em homofermentativas e heterofermentativas, que se subdividem em heterofermentativas obrigatórias e facultativas (MESQUITA et al., 2017). Com isso, é justificável a presença de ácido lático, etanol e ácido acético como os únicos produtos de fermentação identificados em todas as condições de fermentação.

Além disso, em todas as condições de fermentação o pH do meio baixou para valores próximos a 4 após os primeiros 5 dias de fermentação, com aumento da produção de ácido lático mesmo nessa condição de pH. É relatado que a faixa de pH entre 5 e 7 é considerada ótima para crescimento de BAL e que apenas organismos do gênero *Lactobacillus* conseguem se desenvolver em pH inferior a 5,7 (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; HOFVENDAHL; HAHN–HÄGERDAL, 2000).

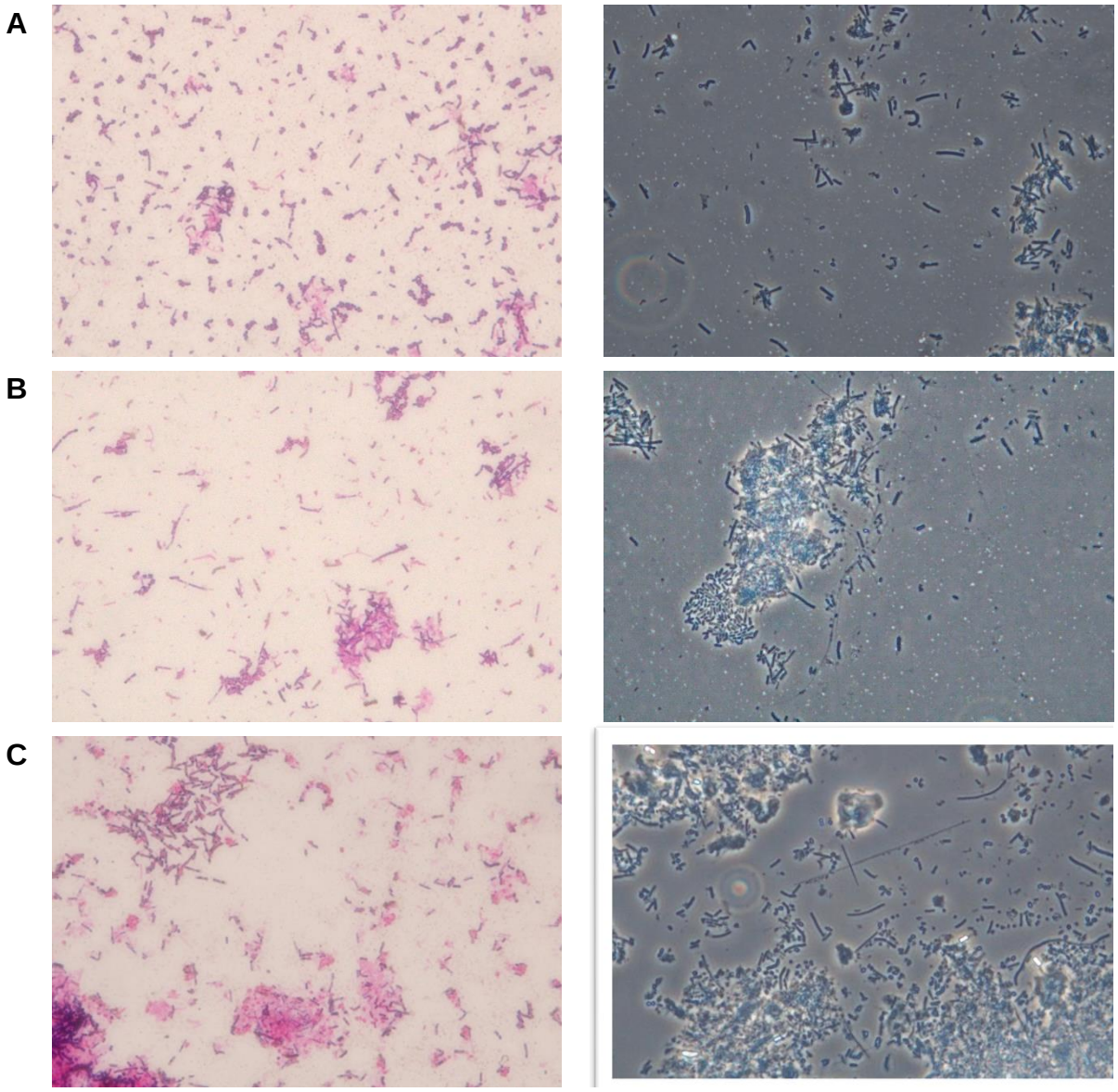
Figura 5-12 – Etapa 2: Estrutura da comunidade microbiana na amostra de manipueira bruta (inóculo) em A) nível de gênero; e B) nível de unidades taxonômicas operacionais (OTU). A abundância relativa foi calculada pela divisão do número de sequências de cada gênero ou OTU pelo total de sequências de bactéria



A presença de mistura racêmica dos isômeros de ácido lático, observada em todas as condições, também é característica de organismos do gênero *Lactobacillus*. Por exemplo, espécies como *L. plantarum* e *L. fermentum* produzem as mesmas proporções de L e D-ácido lático (ZHANG et al., 2008).

As Figuras Figura 5-13, Figura 5-14 e Figura 5-15 mostram as imagens feitas por microscopia óptica. Imagens à esquerda representam o teste Gram e imagens à direita são microscopia por contraste de fases simples.

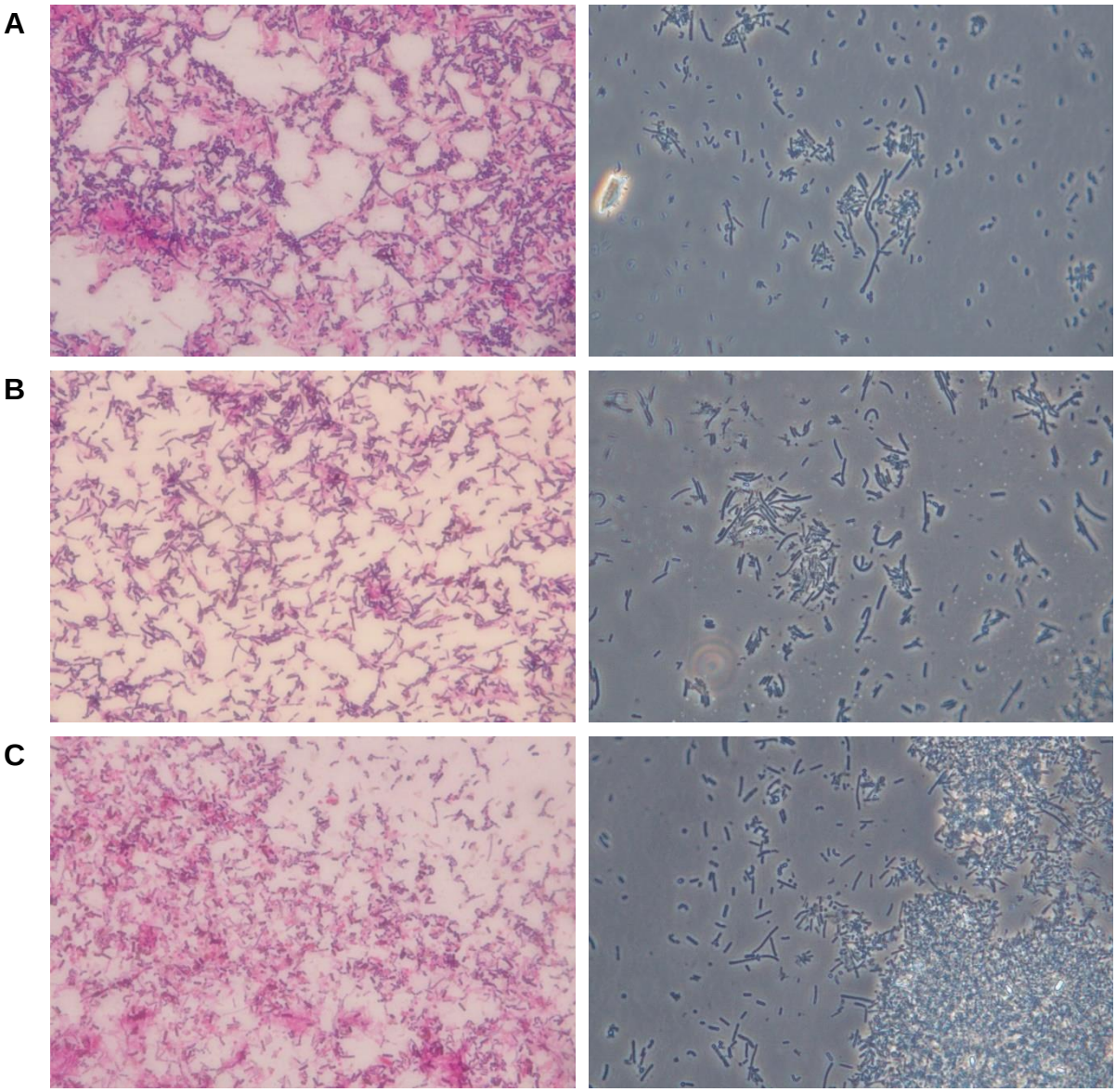
Figura 5-13 – Etapa 2: Teste Gram (esquerda) e microscopia de contraste de fases (direita) das amostras na condição 25°C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5



O teste conduzido na temperatura de 25° C e pH de 4,5 (Figura 5-13A) apresentou majoritariamente organismos Gram positivos, com morfologia de bacilos. Há também a presença de organismos curvados em menor número. A condição de 25° C e de pH 5,5 (Figura 5-13B) também apresenta majoritariamente organismos em forma de bacilos, porém há mais organismos Gram negativos do que a condição de 25° C e pH de 4,5. Há também a presença de filamentos delgados bem finos, os quais são Gram negativos. Na condição de 25° C pH de 6,5 (Figura 5-13C) há mais diversidade de microrganismos, o que pode ser explicado pela condição mais próxima

da neutralidade de pH. Nessa condição há a presença de organismos morfologicamente semelhantes a bacilos, cocos, além de filamentos compridos e finos.

Figura 5-14 – Etapa 2: Teste Gram (esquerda) e microscopia (direita) das amostras na condição 30° C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5



Com temperatura de 30°C e pH de 4,5 (Figura 5-14A) também há prevalência de bacilos com presença de organismos com morfologia semelhante a cocobacilos. O teste Gram mostrou que há maioria de organismos Gram positivos, embora haja também uma boa parcela de organismos Gram negativos. A mudança do pH para 5,5 (Figura 5-14B) favoreceu o desenvolvimento de bacilos mais alongados, sendo a

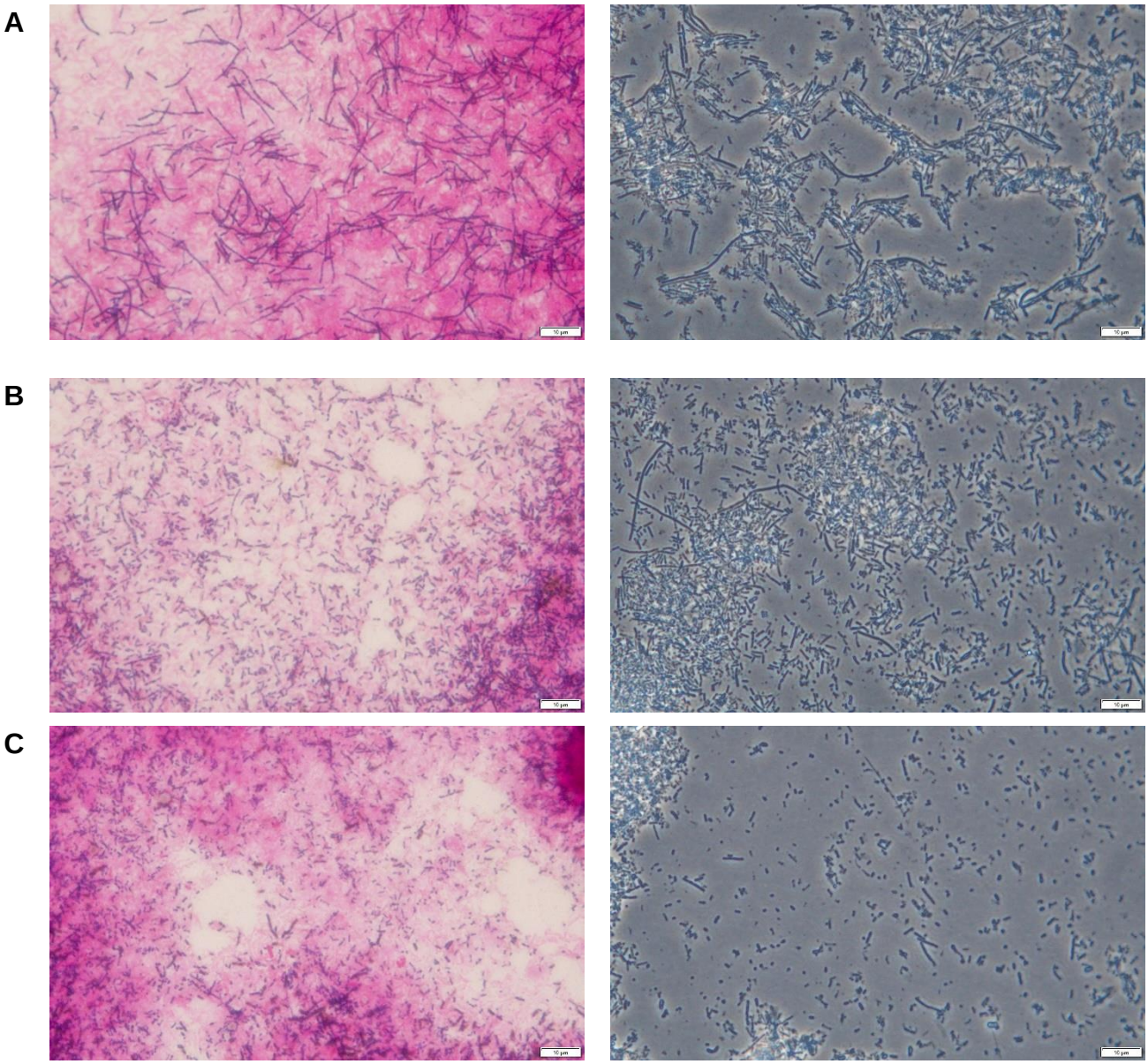
amostra composta por menos cocobacilos. Há também a presença de estruturas curvadas, semelhantes às presentes na condição de 25° C e pH de 4,5. A condição com temperatura de 30° C e pH de 6,5 (Figura 5-14C) favoreceu o aparecimento de cocos e estreptococos, além dos bacilos mais alongados.

A amostra da fermentação a 35° C e de pH 4,5 apresentou o que parecem ser cadeias de bacilos que se destacam por serem muito longas e Gram positivas (Figura 5-15A). Na condição de 35° C e pH de 5,5 (Figura 5-15B) há presença de menos cadeias de bacilos e mais organismos em forma de bacilos menores, na maioria Gram positivos. A fermentação a 35° C e pH de 6,5 não apresentou organismos em cadeias alongadas, sendo composta principalmente por bacilos menores (Figura 5-15C).

Com a análise das imagens de microscopia, observa-se que a morfologia dos organismos modificou consideravelmente com a variação das condições, o que já era esperado, visto que é uma cultura mista. Em geral, há predominância de organismos morfologicamente semelhantes a bacilos, no entanto a condição ambiental influenciou no tamanho das bactérias.

A condição que apresentou maior destaque foi a condição com temperatura de 35° C e pH de 4,5 (Figura 5-15A), na qual organismos bastante alongados e Gram positivos foram predominantes. Vale ressaltar, que essa foi a única condição, na qual houve predominância de homofermentação. É notável também a presença de organismos alongados na fermentação a 30° C e pH de 5,5, na qual ocorreu heterofermentação, mas também houve homofermentação, por apresentar concentração de ácido lático maior do que a soma das concentrações de etanol e ácido acético.

Figura 5-15 – Teste Gram (esquerda) e microscopia (direita) das amostras na condição 35°C. A: pH 4,5, B: pH 5,5 e C: pH 6,5 da Etapa 2



5.3 ETAPA 3: OPERAÇÃO DO RALFE

Nessa etapa, foi avaliada a possibilidade de produção contínua de ácido lático no RALFE. As características da manipueira, coletada na casa de farinha em Taquarana-AL, são apresentadas na Tabela 5-6.

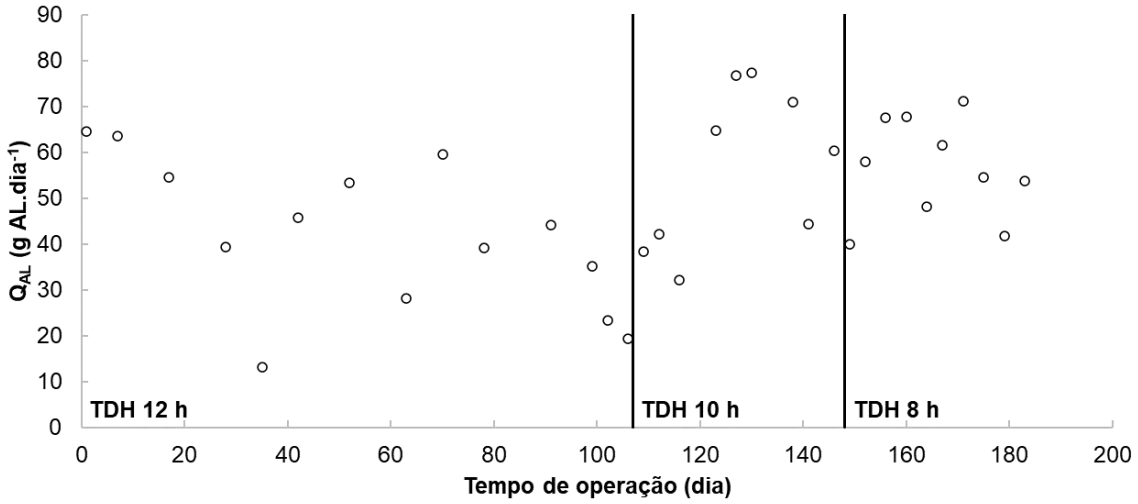
Tabela 5-6 - Características da manipueira utilizada na etapa 3 em diferentes coletas

Coleta	pH	C_{Ch} (g Ch.L^{-1})	C_{AL} (g AL.L^{-1})
18/11/19	5,3	48,7	4,3
18/12/19	5,2	36,3	2,6
14/01/20	5,3	79,3	<3,0
04/02/20	5,8	54,8	< 1,0
03/03/20	5,5	87,2	1,0
19/03/20	5,3	54,9	2,8

5.3.1 Influência do TDH na produção de AL em RALFE

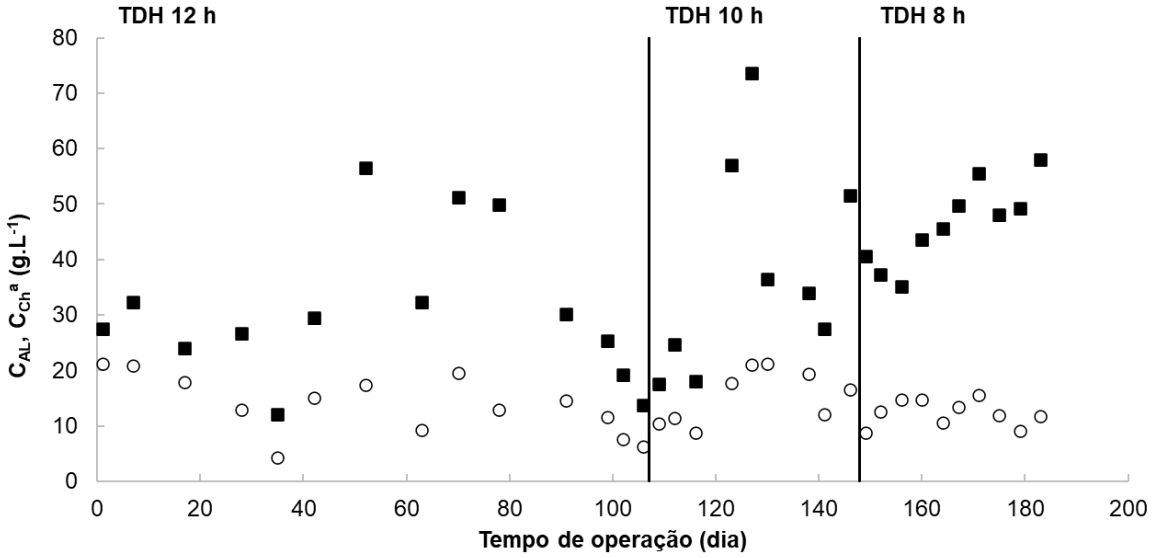
Os resultados de vazão mássica de ácido lático obtida nas três condições de TDH testadas no RALFE estão mostrados na Figura 5-16.

Figura 5-16 – Etapa 3: Série de dados de Q_{AL} nas três condições de TDH testadas



Observa-se que em todas as condições houve produção contínua de AL. No entanto, há grande variabilidade nos resultados. Essa variação não está apenas relacionada à mudança do TDH, mas à composição da manipueira, em especial à concentração de carboidrato bruto afluente, cuja relação pode ser vista na Figura 5-17.

Figura 5-17 – Etapa 3: Série de dados de C_{Ch}^{a} (■) e C_{AL} (○) ao longo do tempo de operação do RALFE



Uma das maiores dificuldades em trabalhar com manipueira bruta foi sua variabilidade, causada por três fatores principais: diferentes campanhas de coleta de manipueira, facilidade de fermentação e presença de grande quantidade de sólidos suspensos de fácil sedimentação. Esses três fenômenos influenciam diretamente na concentração de carboidratos presentes na manipueira.

Com a proposta de utilização da manipueira bruta, apenas ajustando o pH inicial, tentou-se preservar suas características originais, inclusive a concentração de sólidos presentes. A manipueira fresca, assim que é liberada da prensa, apresenta grande quantidade de partículas pequenas em suspensão. À medida que a manipueira é colocada em repouso (exemplo: transporte do local de coleta, tempo de congelamento e descongelamento), esses sólidos sedimentam e formam uma massa consistente. Mesmo agitando a manipueira e tentando uniformizá-la, em pouco tempo a massa de sólidos sedimenta, permanecendo no fundo do recipiente de alimentação. Com isso, antes de cada alimentação, fazia-se a agitação da manipueira e esperava-se alguns minutos até a maior parte da massa sedimentar. Por isso, houve dificuldade em alimentar o RALFE com concentração constante de SSV e de carboidratos, mesmo com manipueira de lotes iguais.

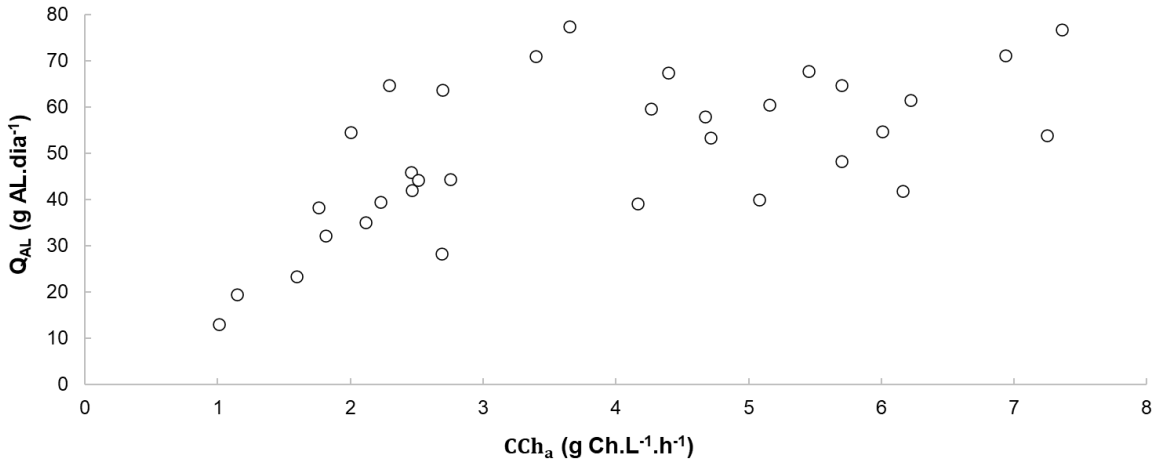
Uma das variáveis influenciadas pelo TDH e que é importante no monitoramento do reator é a carga de carboidratos aplicada. Como mostrado na

Figura 5-17, além da variabilidade dos dados, observa-se que há aumento da concentração afluente de carboidratos. Com isso, a performance do RALFE foi avaliada utilizando a carga de carboidratos aplicada (CCh_a), a qual leva em consideração tanto a variação do TDH quando a variação da concentração afluente de carboidratos.

5.3.2 Produção de ácido lático durante a operação do RALFE

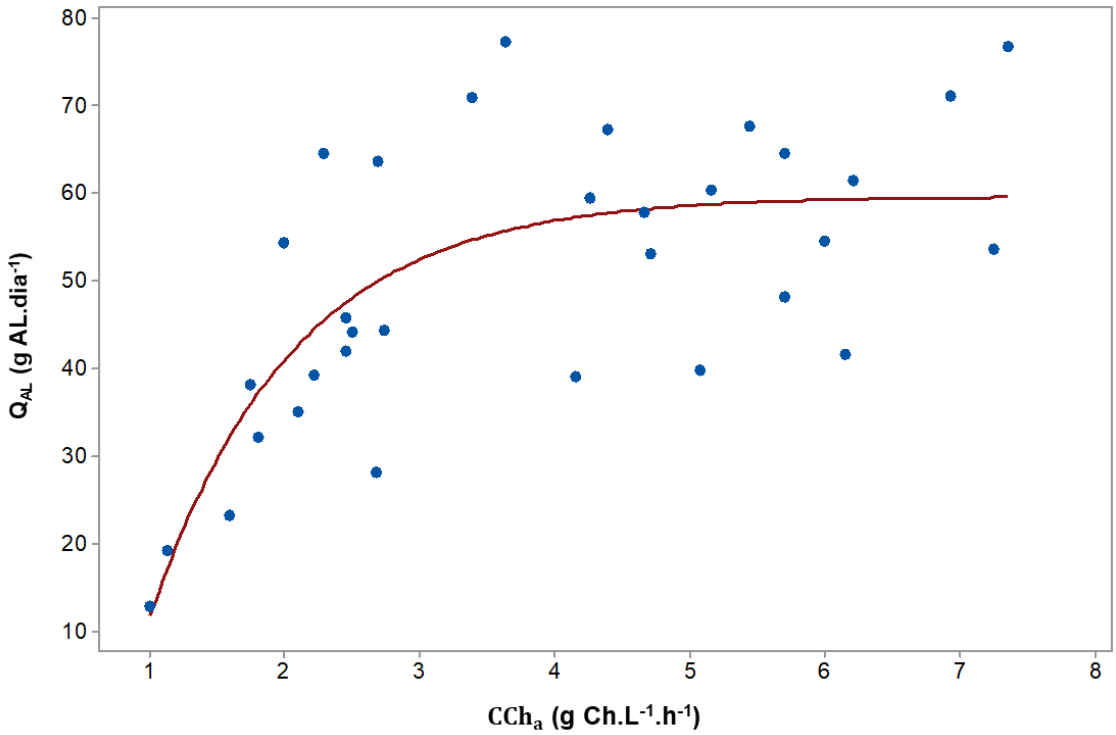
A Figura 5-18 apresenta a influência da carga aplicada de carboidratos na vazão mássica de ácido lático. Com cargas menores do que 2 g Ch.L^{-1}.h^{-1}, Q_{AL} aumentou com o aumento da carga. No entanto, não foi observado essa tendência para valores de CCh_a acima de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}. Como será melhor abordado no item 5.3.4, condições com valores de CCh_a superiores a de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1} favoreceram outras rotas metabólicas, e, por isso, não foi observado aumento da concentração de AL nessas condições.

Figura 5-18 – Etapa 3: Variação de Q_{AL} com a CCh_a



Pela Figura 5-18, observa-se que há um valor de CCh_a acima do qual a produção Q_{AL} aproxima-se de uma constante. Para modelar o comportamento dessa relação, uma regressão não linear usando uma função assintótica côncava (Eq. 28) foi ajustada aos dados experimentais. A Figura 5-19 mostra a representação gráfica dos dados experimentais e os dados modelados de Q_{AL} em função da CCh_a.

Figura 5-19 - Etapa 3: Dados experimentais (●) e dados modelados (-) da variação de Q_{AL} com CCh_a



O desvio padrão da regressão (S) é 11,6 gAL.dia^{-1}. Como o R^2 não se aplica para modelos não lineares, usa-se S para indicar o ajuste do modelo.

$$Q_{AL} = \theta_1 + \theta_2 \cdot e^{-\theta_3 \cdot CCh_a} \qquad \text{Eq. 28}$$

Em que, θ_1, θ_2 e θ_3 são constantes da função assintótica côncava.

A Eq. 29 representa o modelo matemático ajustado aos dados de Q_{AL} e CCh_a com as constantes obtidas pela regressão não linear.

$$Q_{AL} = 59{,}75 - 124{,}85 \cdot e^{-0{,}95 \cdot CCh_a} \qquad \text{Eq. 29}$$

Com o objetivo de identificar o valor de CCh_a em que Q_{AL} aproxima-se da constante, a Eq. 29 foi solucionada considerando o valor de Q_{AL} igual a 95% do valor da constante θ_1. O valor obtido para CCh_a foi de 4 g Ch. L^{-1}.d^{-1}. Com isso, o aumento

de CCh_a para valores acima de 4 g Ch. $L^{-1}.d^{-1}$ não resulta em alteração significativa da Q_{AL}.

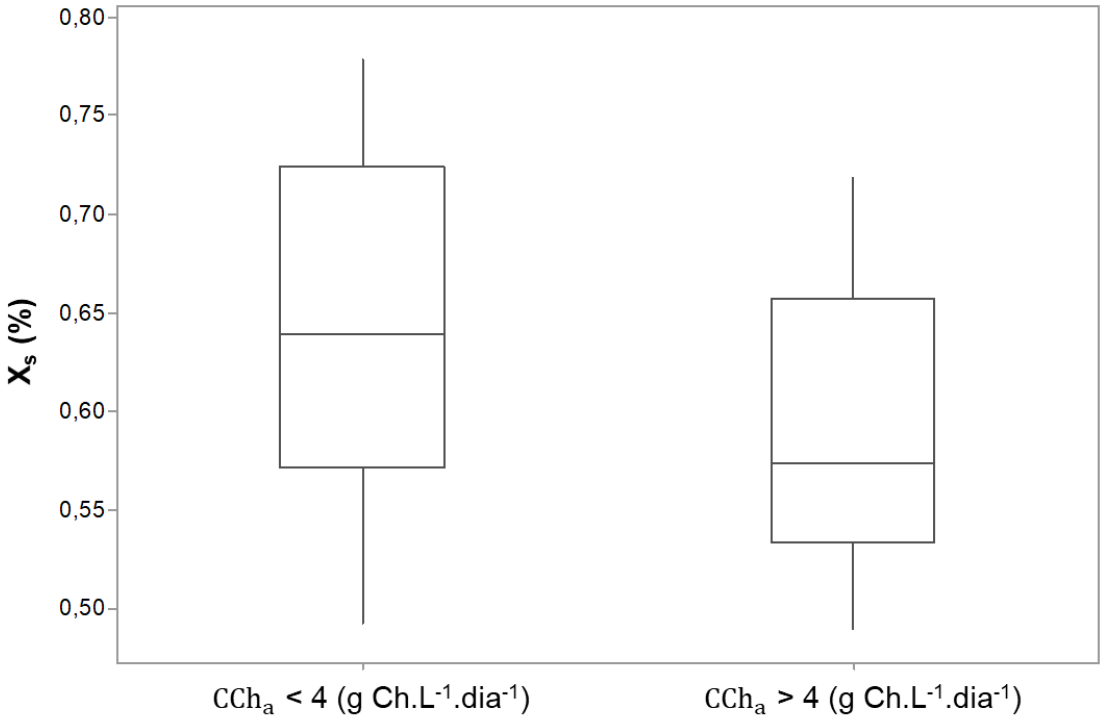
5.3.3 Conversão de carboidratos e rendimento de ácido lático

Pela Figura 5-20, observa-se que os valores de X_s foram abaixo de 0,8 independentemente do valor de CCh_a. Além disso, há tendência na redução de X_s com o aumento de CCh_a para valores maiores do que 4 g Ch. $L^{-1}.d^{-1}$.

Como foi apresentado na seção 5.2.6, o dimensionamento do RALFE foi baseado em uma conversão de carboidratos de 0,9, o qual seria obtido com um TDH de 12 h. Para o menor TDH, 8 h, esperava-se um valor de X_s de 0,8. Experimentalmente, valores de X_s acima de 0,8 não foram observados durante toda a operação do RALFE.

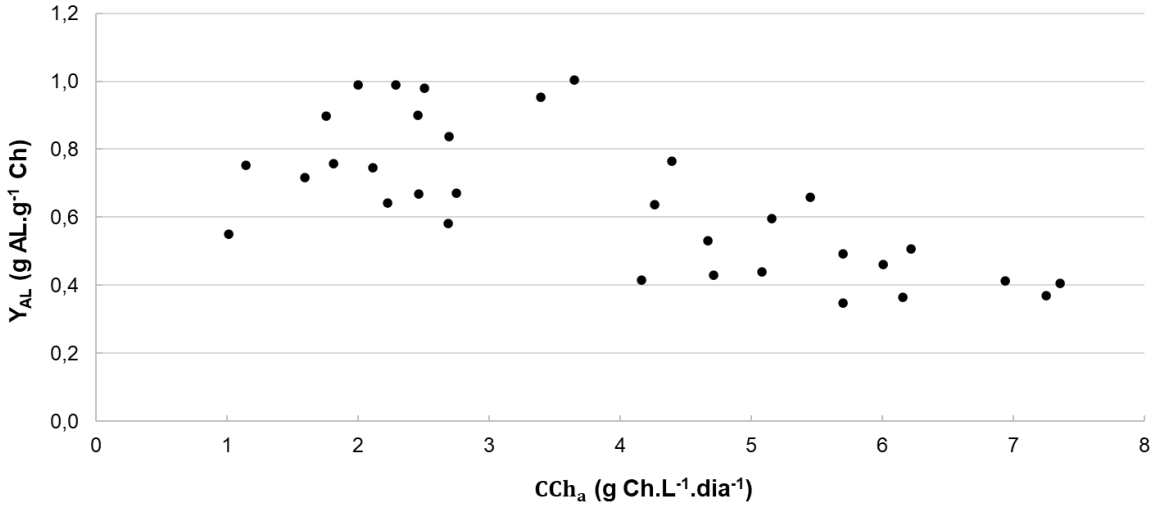
Devido à limitação de informações sobre o processo de produção de AL a partir manipueira e cultura autóctone, as condições aplicadas inicialmente foram estimadas considerando a suposição de que o RALFE é um reator ideal Plug-Flow e o valor utilizado para $\overline{C_x}$ não foi retirado de um processo semelhante. Esses fatores podem explicar as divergências encontradas entre os dados experimentais e o modelo do processo proposto.

Figura 5-20 – Etapa 3: Variação da conversão de carboidratos (Xs) com a carga de carboidratos aplicada (Ch_a)



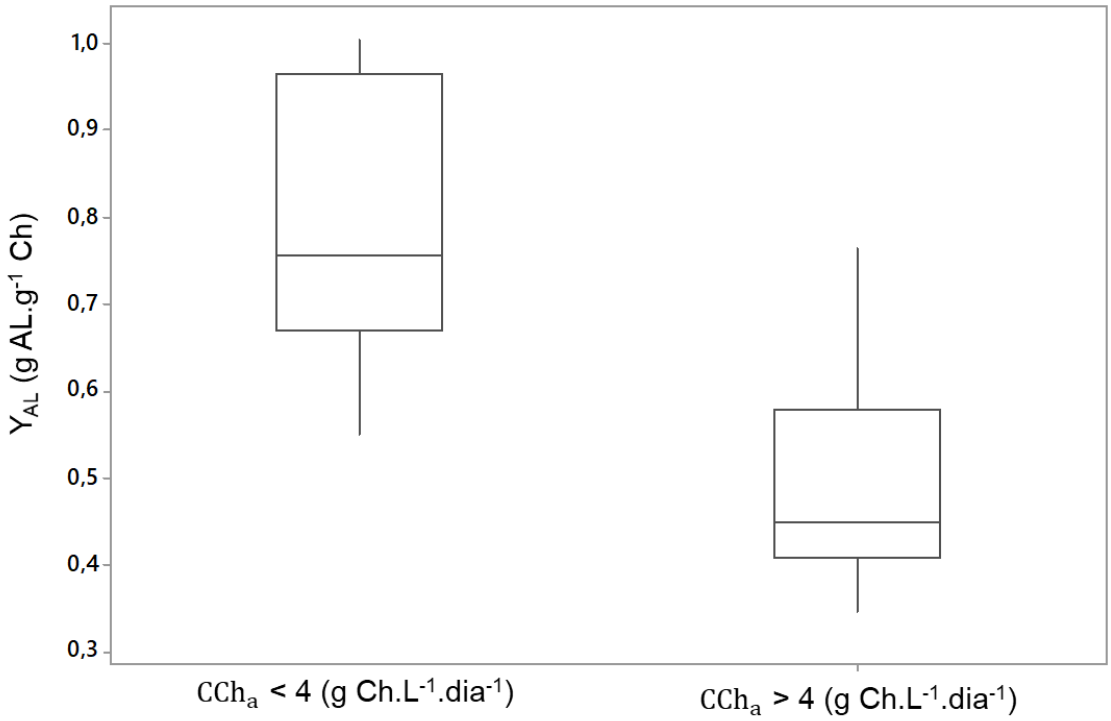
A Figura 5-21 ilustra a relação entre o rendimento de ácido lático e a CCh_a, na qual observa-se tendência a redução de Y_{AL} com o aumento da CCh_a. Para valores de CCh_a abaixo de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}, o rendimento de ácido lático atingiu valores entre 0,6 e 1,0. Por outro lado, para valores de CCh_a acima de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}, o rendimento de ácido lático concentrou-se na faixa entre 0,4 e 0,6.

Figura 5-21 – Etapa 3: Influência da carga de carboidratos aplicada (CCh_a) no rendimento de ácido lático (Y_{AL})



Os boxplots da Figura 5-22 apresentam claramente essa diferença. A aplicação do teste não-paramétrico de Mann-Whitney resultou na confirmação estatística de que valores de CCh_a menores do que 4 g Ch.L^{-1}.dia^{-1} resultam em maiores rendimentos de ácido lático (intervalo de confiança de 95%).

Figura 5-22 – Etapa 3: Boxplots de rendimento de ácido lático em diferentes faixas de carga de carboidratos aplicada



5.3.4 Produtos da fermentação da manipueira e seletividade

Durante a operação do RALFE, os principais produtos de fermentação identificados foram ácido lático e ácido acético (Figura 5-23). Como já mencionado no item 5.3.2, a Q_{AL} pode ser relacionada com CCh_a por meio de uma função assintótica côncava, cujo valor da assíntota é aproximadamente 60 g AL.dia^{-1}, que é obtida a partir de uma CCh_a de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}. A produção de ácido acético não seguiu a mesma tendência da produção de ácido lático para valores de CCh_a abaixo de 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}, apresentando grande variabilidade, principalmente em CCh_a abaixo de 3 g Ch.L^{-1}.h^{-1}. Para CCh_a acima de 3 g Ch.L^{-1}.h^{-1}, observou-se que Q_{AA} aproxima-se de uma constante, cujo valor estimado é de 17$\pm$6 g AA.dia^{-1}.

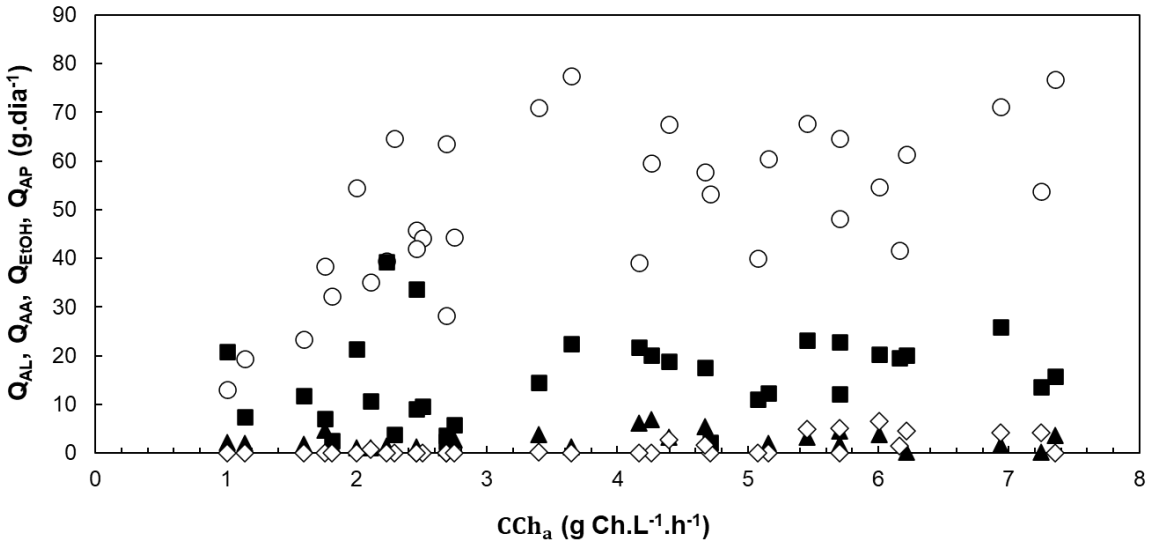
Além de ácido lático e ácido acético, houve também produção de etanol e ácido propiônico com valores bem inferiores aos obtidos para AL e AA (Figura 5-23). Destaca-se que apenas houve produção de ácido propiônico na operação com TDH de 8 h, na qual a CCh_a assumiu valores entre 4 e 7 g Ch.L^{-1}.h^{-1}. Até o momento, não havia sido identificada produção de ácido propiônico em nenhuma condição estudada,

considerando também os reatores em batelada. Esse fenômeno justifica o menor rendimento de ácido lático obtido em cargas maiores identificado na Figura 5-21.

No reator contínuo de múltiplos tubos operado por Gomes et al. (2016), utilizou-se TDH de 4 h com temperatura de 25ºC e pH afluente de 6,5. No fim da fermentação, não foi observado aumento da concentração de AL. Pelo contrário, a pequena quantidade de ácido lático presente no afluente não foi identificada no efluente do reator. Esse resultado não era esperado pelos autores, visto que o efeito das BAL presentes na manipueira inibiram a produção do produto desejado, hidrogênio. Por outro lado, o maior produto de fermentação foi o ácido propiônico, cuja geração foi atribuída a bactérias do ácido propiônico, que podem oxidar AL em outros ácidos graxos voláteis.

Já nos reatores operados por Rosa et al. (2016), sob temperatura de 30ºC e pH de 5, AL foi identificado em alta concentração apenas na condição com maior carga de orgânica volumétrica aplicada (30 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}) e TDH de 12 h, com redução da concentração de AL com a diminuição da carga orgânica volumétrica. Outros metabólitos presentes na fermentação foram etanol, ácido propionico e ácido butirico.

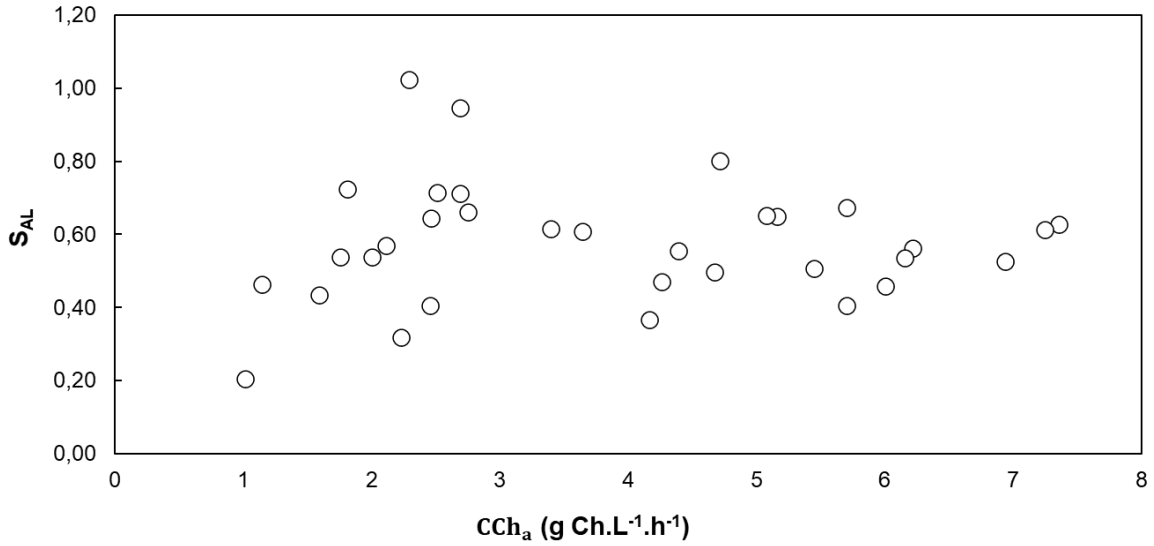
Figura 5-23 – Etapa 3: Produtos de fermentação na operação do RALFE. Ácido lático (○), etanol (■), ácido acético (▲) e ácido propiônico (◊)



Observa-se que aconteceu fermentação heterolática durante toda a operação do RALFE, com concomitante produção de ácido lático e ácido acético. Nos experimentos em batelada, a condição com pH de 4,5 e temperatura de 35º C

apresentou maior favorecimento à homofermentação, com menor produção de etanol e ácido acético durante a fermentação, obtendo seletividade de 0,9. Na operação do RALFE, nas mesmas condições de pH e temperatura, não foram mantidos valores de seletividade tão expressivos (Figura 5-24), o que já era esperado devido à presença contínua de ácido acético como produto de fermentação.

Figura 5-24 – Etapa 3: Variação de S_{AL} com relação a CCh_a



5.3.5 Variação dos isômeros de AL na operação do RALFE

Em todas as condições de TDH testadas houve produção dos dois isômeros do ácido lático Tabela 5-7. A utilização do TDH como variável para comparação nesse item foi motivada pela obtenção dos dados de proporção dos isômeros do AL anteriormente à decisão de utilizar a CCh_a como variável mais adequada para capturar a relação entre os resultados obtidos no experimento.

A variação da condição de TDH gerou uma mudança sutil na relação entre os isômeros de ácido lático, havendo maior concentração de L-ácido lático conforme redução do TDH.

Tabela 5-7 – Etapa 3: Variação da relação entre os isômeros D e L-ácido lático nos TDH testados

TDH (h)	D-ácido lático/L-ácido lático
12	1,0
10	0,9
8	0,8

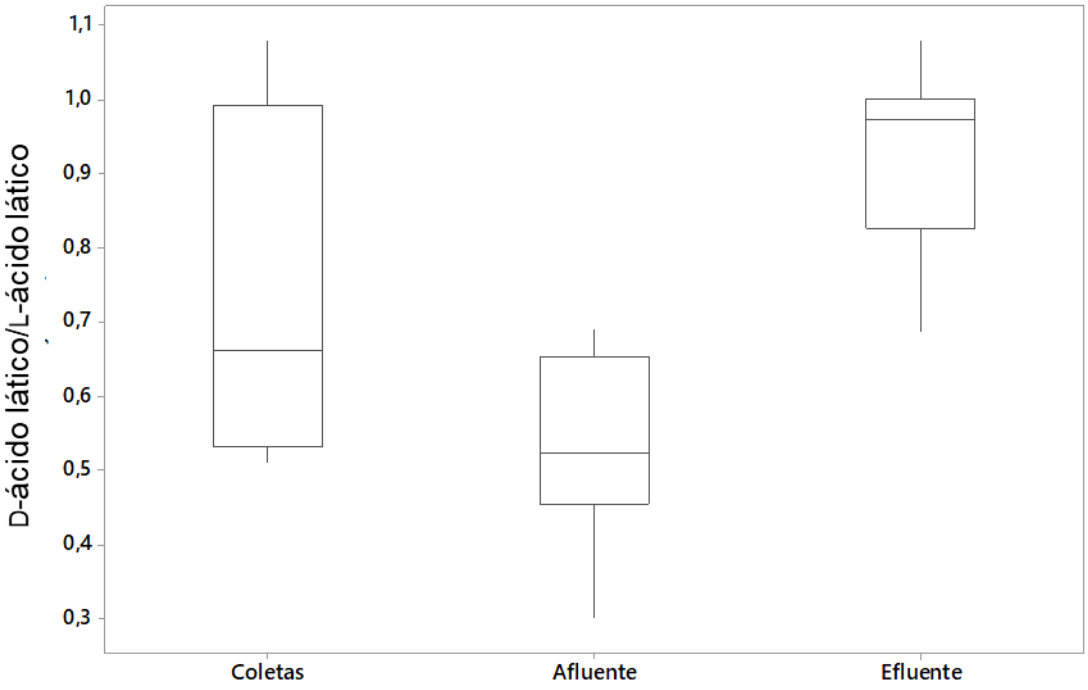
A Figura 5-25 apresenta *boxplots* com de relação entre os isômeros D e L-ácido lático em amostras de manipueira em três diferentes condições:

- Nas amostras de manipueira bruta (“Coletas”): essas amostras foram coletadas direto da fábrica de mandioca em recipientes de menor volume (100 mL) e congeladas. Como o volume do líquido é pequeno, o tempo de congelamento e descongelamento é menor, o que reduz a influência da fermentação espontânea da manipueira. Com isso, essas amostras são consideradas as que mais representam a manipueira bruta que sai da fábrica;
- Amostras de manipueira afluente ao reator (“Afluente”): representam amostras de manipueira retirada do galão de alimentação. No momento da coleta na fábrica, essa manipueira foi armazenada em recipientes de 5 L. Com isso, devido ao volume maior de manipueira, o processo de fermentação durante o período de congelamento e descongelamento foi mais significativo;
- Amostras efluente ao RALFE (“Efluente”).

Observa-se que há muita variação na relação dos isômeros das amostras “Coletas”. Nas amostras “Efluente”, a relação D-ácido lático/L-ácido lático é predominantemente maior do que 0,7. O resultado interessante foi obtido nas amostras “Afluente”, nas quais a relação D-ácido lático/L-ácido lático foi menor, indicando que há predominância de L-ácido lático nessas amostras.

Esse resultado sugere que a fermentação espontânea da manipueira que ocorre durante o descongelamento, em temperaturas menores e com pH aproximado a 5 (Tabela 5-6), favorece a produção de L-ácido lático. A partir do momento em que a manipueira passa pelo RALFE, no qual a temperatura é 35ºC e o pH é ajustado para 4,5, predominam a produção dos dois isômeros do ácido lático.

Figura 5-25 – Etapa 3: Relação entre os isômeros de ácido lático da manipueira: nas coletas realizadas, afluente ao RALFE e da manipueira fermentada efluente ao RALFE. “Coletas” representa amostras de manipueira bruta; “Afluente” refere-se a amostras de manipueira alimentadas ao reator após o descongelamento; e “Efluente” refere-se a amostras de manipueira efluentes ao reator



Na Etapa 2 não houve diferença entre a proporção dos isômeros nas condições de temperatura e pH testadas. As amostras para análise da proporção dos isômeros na Etapa 2 foram coletadas após a finalização da fermentação, e os valores finais de pH de todas as condições de fermentação estavam próximos ou menores do que 4 desde o 5º dia de fermentação (Figura 5-4). Essa condição favorece organismos do gênero *Lactobacillus*, produtores de mistura racêmica do ácido lático.

No caso da amostra “afluente” especificada na Etapa 3, o pH do meio estava em valores próximos a 5 devido à baixa quantidade de ácidos existentes na manipueira bruta, o que pode ter levado a essa diferença na proporção dos isômeros.

5.3.6 Quantificação da biomassa aderida de biomassa suspensa

Na Etapa 2, para o dimensionamento racional do RALFE, foi utilizado uma estimativa para $\overline{C_x}$, baseada no trabalho de Anzola-Rojas et al. (2015), pois não havia

referência sobre essa variável no processo de produção ácido lático a partir de manipueira em reatores contínuos com biomassa aderida em material suporte.

Com isso, no final da operação do RALFE, foi realizada análise de SSV de amostras de biomassa suspensa e aderida ao material suporte de PAD, para estimar a concentração de microrganismos durante a operação do RALFE. Os valores obtidos foram 37,8 e 81,1 g SSV.L^{-1} para biomassa aderida e suspensa, respectivamente.

Utilizando o valor obtido de SSV dentro do RALFE no fim da operação, 119 g SSV.L^{-1}, para recalcular o recalculando o valor de TDH pela Eq. 16, obtém-se um TDH de apenas 2 h para a mesma conversão de carboidratos de 0,9, valor 6 vezes inferior ao utilizado no experimento.

Embora o valor obtido experimentalmente de microrganismos dentro do RALFE, em termos de SSV, seja muito superior ao utilizado no dimensionamento do reator, não foi observado melhor desempenho. Como já foi mencionado no item 5.3.1, a manipueira possui alta concentração de sólidos suspensos de fácil sedimentação, os quais contribuem de forma significativa para o valor de SSV, especialmente o SSV de biomassa suspensa.

5.3.7 Caracterização filogenética da comunidade microbiana do RALFE

Amostras de biomassa microbiana da comunidade suspensa e da comunidade aderida ao material suporte do RALFE foram analisadas por técnica de sequenciamento metabarcoding do gene 16S rRNA na plataforma Illumina HiSeq 2500. Um total de 969.319 sequências viáveis foram obtidas, após a filtragem por qualidade, as quais foram agrupadas em 48 UTO com 97% de similaridade entre si. A cobertura do sequenciamento do RALFE foi de 63,9%. Os resultados são demonstrados na Figura 5-26 e na Tabela 5-8.

Figura 5-26 – Etapa 3: Abundância relativa das principais *taxa* observadas nas amostras de biomassa suspensa e de biomassa aderida ao material suporte (cilindros MOD940). As amostras foram coletadas do RALFE ao final da operação

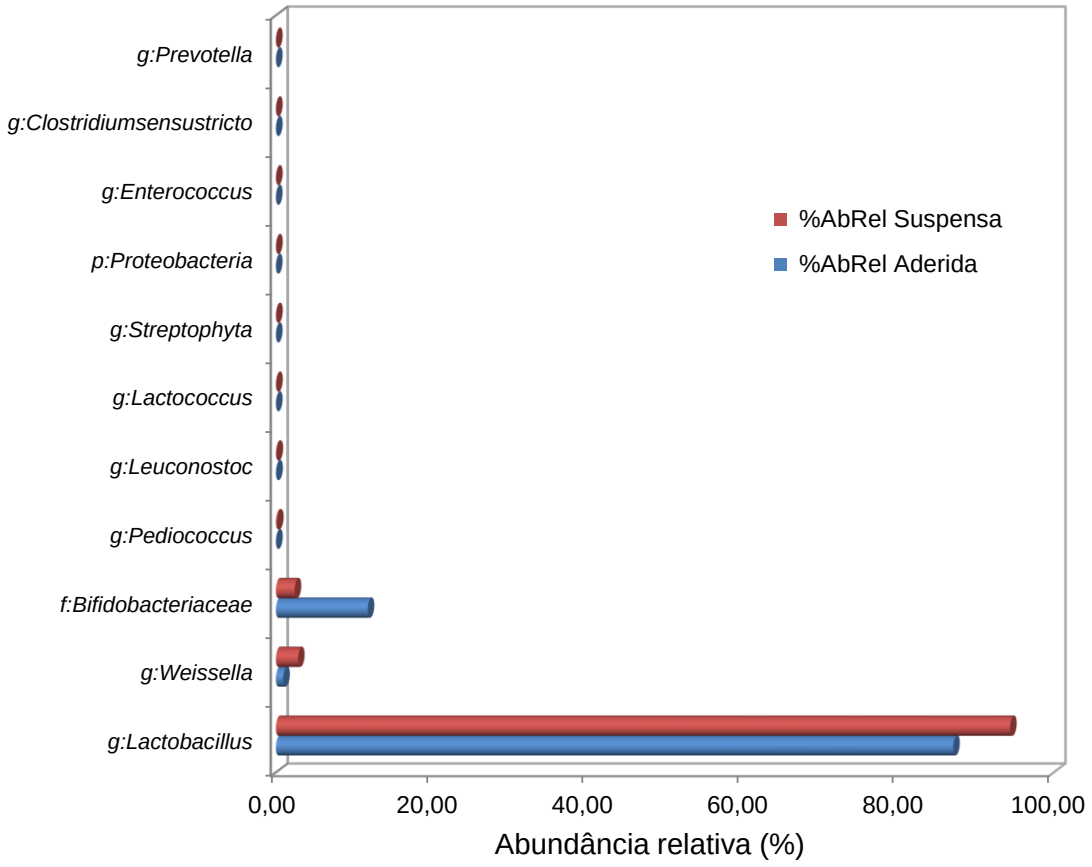


Tabela 5-8 – Etapa 3: Sumário dos índices de diversidade do sequenciamento da biomassa suspensa e aderida do RALFE

Parâmetro	Biomassa Suspensa	Biomassa Aderida
Nº de UTOs	44	48
Nº de leituras	449365	422600
Dominância	0,20	0,32

Bactérias similares a *Lactobacillus* foram as mais abundantes nas amostras de biomassa suspensa e de biomassa aderida, tendo sido observadas nas proporções de 94,4 e 87,1%, respectivamente. A elevada AbRel% de lactobacilli pode ser explicada pelo baixo pH da manipueira utilizada na alimentação do sistema (pH de 4,5), visto que as espécies desse gênero resistem melhor às condições ácidas que as

demais bactérias ácido-láticas (MADIGAN et al., 2014). Outros estudos demonstraram que a fermentação de resíduos alimentícios por culturas mistas, em baixo pH, resultaram na dominância de *Lactobacillus* (BONK et al., 2017a; WU et al., 2015b). Os lactobacilli podem ser homofermentativos ou heterofermentativos, que explica a presença de etanol como produto de fermentação.

Membros de Bifidobacteriaceae apresentaram elevada AbRel% na amostra de biomassa aderida (11,8%). Essa família compreende o gênero *Bifidobacterium*, que também integra o grupo de bactérias ácido-láticas, embora pertença a um filo distinto da grande maioria das bactérias produtoras de AL (MORA-VILLALOBOS et al., 2020). Bactérias do gênero *Bifidobacterium* produzem lactato e acetato como principais produtos da fermentação (SGORBATI; BIAVATI; PALENZONA, 1995), o que pode explicar a presença de ácido acético dentre os metabólitos identificados.

Bactérias similares a *Weissella* estiveram presentes nas proporções de 2,8 e 0,9%, respectivamente. Membros desse gênero já foram identificados em resíduos alimentícios diversos, inclusive na manipueira (PADONOU et al., 2010; TANG et al., 2016a). *Weissella* pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas heterofermentativas, produzindo ácido lático, dióxido de carbono, etanol e/ ou acetato como produtos da fermentação (BJÖRKROTH; DICKS; ENDO, 2014). De fato, etanol e ácido acético estão entre os metabólitos identificados na análise de cromatografia a gás.

Os resultados do sequenciamento metabarcoding do gene 16S rRNA são condizentes com a produção de AL e de outros metabólitos observados na manipueira fermentada. Embora a homofermentação tenha sido o padrão fermentativo dominante, observou-se a ocorrência de fermentação heterolática, provavelmente em virtude da presença de lactobacilli heterofermentativos, membros da família Bifidobacteriaceae e do gênero *Weissella*. A comunidade microbiana aderida ao leito de PAD foi bastante similar à comunidade planctônica, divergindo, principalmente, nas proporções de Bifidobacteriaceae. Todas as principais taxa presentes ao final da operação do RALFE pertencem ao grupo de bactérias ácido-láticas, demonstrando que as condições de temperatura (35ºC) e pH (4,5) utilizados foram adequadas para a seleção de microrganismos produtores de AL originalmente presentes na manipueira.

Na produção industrial de ácido lático, espécies de *Lactobacillus* são os organismos mais utilizados. É relatado que são organismos que necessitam de

condições nutricionais específicas, como nitrogênio, vitaminas e minerais (OLIVEIRA et al., 2018). Nesses casos, há necessidade de esterilização do meio e suplementação nutricional. Nesta pesquisa, lactobacilli foram os principais microrganismos encontrados na biomassa suspensa e aderida do RALFE, os quais foram responsáveis pela contínua produção do ácido lático com altos rendimentos.

Com isso, por meio da pesquisa desenvolvida, foi possível produzir um composto economicamente atrativo, sem a necessidade de qualquer suplementação nutricional ou esterilização, utilizando um resíduo que possui carboidratos prontamente disponíveis. Além disso, os organismos responsáveis por esse processo natural são os mesmos utilizados de forma pura na produção industrial.

5.3.8 Potencial de produção de ácido lático em indústrias de farinha

Com os resultados obtidos na operação do RALFE, foi realizada uma estimativa do potencial de produção de ácido lático das indústrias em Coité do Noia, em Alagoas, e Santa Maria da Serra, em São Paulo, a partir dos respectivos dados de produção mensal de mandioca (Tabela 3-2). Para fazer a estimativa, foi considerado que:

- De acordo com a Tabela 3-2, 400 e 360 L de manipueira são geradas por tonelada de mandioca processada em Coité do Nóia e em Santa Maria da Serra, respectivamente;
- Com relação à operação do RALFE, CCh_a seria mantida em 4 g Ch.L^{-1}.h^{-1}.

A relação entre a quantidade de ácido lático produzida por volume de manipueira foi calculada considerando a operação do RALFE com TDH de 10 h, que corresponde a uma vazão de 3,7 L.dia $^{-1}$. Baseando-se na Eq. 29, o valor de Q_{AL} foi considerado 60 g AL.dia^{-1}. Com isso, chega-se ao valor estimado de 16 g de ácido lático produzidos por litro de manipueira.

Com isso, a estimativa da produção diária de ácido lático na casa de farinha de Coité do Nóia/AL, cuja produção mensal de mandioca é de 75 toneladas, foi de 16 kg. Para a indústria de Santa Maria da Serra/SP, cuja produção mensal é de 720 toneladas, estima-se o potencial de produção de 172,8 kg de ácido lático diários.

Com relação à área necessária para produção de ácido lático, foi considerado dados da Tabela 3-1 de produção de mandioca por área plantada. No Brasil, em 2018, foram colhidas, em média, 14,64 toneladas de mandioca por hectare. Com isso,

utilizando uma geração de manipueira de 380 L por tonelada de mandioca processada e que 16 gramas de ácido lático são gerados por litro de manipueira, chega-se ao dado médio de que 89 kg de ácido lático são produzidos por hectare.

Por fim, considerando que, em média, cada tonelada de mandioca produz 250 kg de farinha de mandioca (GALVIS; AGREDO; PATIÑO, 2017), estima-se que 24 gramas de ácido lático podem ser gerados por cada quilo de farinha mandioca produzida.

O ácido lático produzido utilizando manipueira e microrganismos autóctones é uma mistura racêmica, a qual pode ser matéria prima para produção de ácido poli-D,L-lático ou PDLLA, um polímero biodegradável e biocompatível. Produtos manufaturados de PDLLA são usados principalmente na medicina e ortodontia, com aplicação de membranas, pinos e parafusos de PDLLA em procedimentos regenerativos de tecidos e ossos (ANNUNZIATA et al., 2017).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos da produção de ácido lático em reatores anaeróbios, foi possível comprovar a hipótese geral de trabalho, que postulava que ácido lático pode ser produzido a partir de manipueira e sua cultura autóctone em reatores anaeróbios em batelada e contínuo. Com base nos objetivos da pesquisa, foi possível concluir que:

- Temperatura e pH são variáveis importantes na produção de ácido lático utilizando manipueira e sua cultura autóctone. Aumento do pH inicial reduz a produção de ácido lático em temperatura de 35º C, enquanto em temperatura de 25º C o aumento do pH favorece a produção de AL;
- Das condições de pH e temperatura testadas em reatores em batelada, a que apresentou melhor S_{AL} e Y_{AL} foi a fermentação com temperatura de 35ºC e pH de 4,5, com C_{AL} de 200 mmol.L^{-1} no 15º dia de fermentação, S_{AL} de 0,9 e Y_{AL} de 0,9 g DQO_{AL}.g^{-1} DQO_{Ch}. Outra condição que se destacou foi temperatura de 30ºC e pH de 5,5, com C_{AL} de 205 mmol.L^{-1} acumulados até o 20º dia de fermentação,, S_{AL} de 0,7 e Y_{AL} de 0,5 g DQO_{AL}.g^{-1} DQO_{Ch}.
- A produção de ácido lático em reatores anaeróbios em batelada foi estável durante todo o período de fermentação, em todas as condições, sem tendência a redução da sua concentração e formação de ácidos graxos voláteis.
- Foi possível manter a produção de ácido lático durante todo o período de operação do RALFE. Valores de X_s entre 50 e 80% e Y_{AL} entre 0,4 e 1,0 g DQO_{AL}.g^{-1} DQO_{Ch} foram mantidos desde o início da operação. O aumento da CCh_a não resultou em maior produção de ácido lático, possuindo efeito negativo no Y_{AL} com valores acima de 4 g Ch.L^{-1}.dia^{-1}.
- Valores menores de Q_{AL} são obtidos com CCh_a abaixo de 4 g Ch.L^{-1}.dia^{-1}, enquanto não há variação da Q_{AL} em valores de CCh_a acima de 4 g Ch.L^{-1}.dia^{-}1, com valor de aproximadamente, 60 g AL.dia^{-1}.
- Operação do RALFE com TDH de 8 h, com valores de CCh_a variando entre 4 e 7 g Ch.L^{-1}.dia^{-1}, resultou em produção de ácido propiônico, o que teve efeito negativo no Y_{AL} e na S_{AL}.

- Heterofermentação e produção dos dois isômeros do AL prevaleceram em todas as condições testadas, tanto em reatores em batelada como no RALFE.
- Caracterização da comunidade microbiana confirmou que tanto na manipueira bruta como na manipueira fermentada há prevalência (~90%) de organismos semelhantes a *Lactobacillus*.
- Considerando uma indústria de farinha de mandioca com processamento mensal de 720 toneladas de mandioca, o potencial de produção de ácido lático é de aproximadamente 3 toneladas. Com relação à área necessária para produção de ácido lático, estima-se que 84 kg de ácido lático são produzidos em um hectare.
- O ácido lático produzido utilizando manipueira e cultura mista autóctone tem potencial de produzir PDLLA, com utilização em procedimentos regenerativos na medicina e ortodontia.

7. SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e dos obstáculos encontrados, propõe-se para trabalhos futuros dentro do mesmo tema de pesquisa:

- Avaliar a influência/importância dos sólidos suspensos presentes na manipueira para produção de ácido lático;
- Caracterizar de forma detalhada as rotas metabólicas associadas ao processo;
- Investigar como a variação das condições de temperatura e pH alteram a proporção entre os isômeros de ácido lático;
- Avaliar a fermentação da maninpueira fresca em escala de bancada e depois piloto;
- Avaliar a importância do meio suporte;
- Avaliar a produção de bifidobactérias.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, Special issue: IBS 2010 - Industrial Biotechnology. v. 156, n. 4, p. 286–301, 20 dez. 2011.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, “Bioenergy and Biorefinery from Biomass” through innovative technology development. v. 31, n. 6, p. 877–902, 1 nov. 2013.

ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 12 out. 2020.

ADORNO, M. A.; HIRASAWA, J.; VARESCHE, M. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, p. 406–414, 1 jan. 2014.

AKAO, S. et al. Effects of pH and temperature on products and bacterial community in l-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2636–2642, 1 jun. 2007.

ALLEM, A. C. The origins and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M. (Eds.). . **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI, 2002. p. 1–16.

ALMEIDA, P. F. DE. **Processamento e caracterização da puba**. Campinas, SP, 1992. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/zeus/auth.php?back=http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000046024&go=x&code=x&unit=x>.

AMORIM, N. C. DOS S. **Produção de ácido capróico associado à produção de hidrogênio utilizando a manipueira**. Tese de doutorado—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing

gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1–2, p. 45–54, 11 abr. 2001.

ANNUNZIATA, M. et al. The Use of Poly-d,l-lactic Acid (PDLLA) Devices for Bone Augmentation Techniques: A Systematic Review. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 12, 13 dez. 2017.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P. et al. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 46–54, 1 mar. 2015.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.

AQUINO, A. C. M. DE S.; GERVIN, V. M.; AMANTE, E. R. Avaliação do processo produtivo de polvilho azedo em indústrias de Santa Catarina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 0, 2016.

AVANCINI, S. R. P. et al. Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2273–2278, nov. 2007.

BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. Dissertação de mestrado—Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2000.

BEZERRA, V. S. **Planejando uma casa de farinha de mandioca**. 1. ed. Macapá: Embrapa, 2011.

BJÖRKROTH, J.; DICKS, L. M. T.; ENDO, A. The genus Weissella. In: **Lactic Acid Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 417–428.

BOHN, J. et al. Isolation of lactic acid-forming bacteria from biogas plants. **Journal of Biotechnology**, v. 244, p. 4–15, 20 fev. 2017.

BONK, F. et al. Exploring the selective lactic acid production from food waste in uncontrolled pH mixed culture fermentations using different reactor configurations. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 416–424, 2017a.

BONK, F. et al. Exploring the selective lactic acid production from food waste in uncontrolled pH mixed culture fermentations using different reactor configurations. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 416–424, 1 ago. 2017b.

BOTELHO, S. M.; MARLI COSTA POLTRONIERI; RODRIGUES, J. E. L. F. **Manipueira: um adubo orgânico para agricultura familiar**. . In: XIII CONGRESSO BRASILEIRA DE MANDIOCA. Botucatu, SP: 2009.

CARVALHO, E. P. DE et al. Povilho azedo: aspectos físicos, químicos e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 129–137, 1996.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, mar. 2013.

CAVALCANTE FAI, A. E. et al. Optimized production of biosurfactant from Pseudozyma tsukubaensis using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 535–542, 1 out. 2015.

CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2000. v. 4

CHAHAL, S. P.; STARR, J. N. Lactic Acid. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

COELHO, L. F. et al. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by Lactobacillus rhamnosus B 103. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1944–1950, 30 ago. 2010.

DAMASCENO, S. et al. Production of volatile compounds by Geotrichum fragrans using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 411–414, 29 dez. 2003.

DATTA, R. et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, Papers presented at the International Congress Beyond 2000: Chemicals from Biotechnology Ecological Challenge and Economic Restraints. v. 16, n. 2–3, p. 221–231, fev. 1995.

DATTA, R. Hydroxycarboxylic Acids. In: JOHN WILEY & SONS, INC. (Ed.). . **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 0825041804012020.a01.pub2.

DERAL - DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL. **Prognóstico mandioca - novembro 2018**. Paraná: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2020. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/mandioca_2019_v1.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2020.

DESTEFANO, V.; KHAN, S.; TABADA, A. Applications of PLA in modern medicine. **Engineered Regeneration**, v. 1, p. 76–87, 1 jan. 2020.

DRESCHKE, G. et al. Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 47–55, jan. 2015.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EITEMAN, M. A.; RAMALINGAM, S. Microbial production of lactic acid. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 5, p. 955–972, 22 jan. 2015.

FAO. **Save and grow: Cassava**. Rome: [s.n.].

FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 29 maio. 2020.

GALVIS, J. A. A.; AGREDO, J. A. G.; PATIÑO, B. O. Refined cassava flour in bread making: a review. **Ingeniería e Investigación**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2017.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 930–939, nov. 2011.

GIEREJ, A. et al. Poly(D,L-Lactic Acid) (PDLLA) Biodegradable and Biocompatible Polymer Optical Fiber. **Journal of Lightwave Technology**, v. 37, n. 9, p. 1916–1923, maio 2019.

GOMES, S. D. et al. **Biohydrogen production in continuous multiple tubes reactor from cassava flour wastewater**. Proceedings of the 6th International Conference on Hydrogen Production. **Anais**... In: 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HYDROGEN PRODUCTION. Oshawa: 2015.

GOMES, S. D. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, Special Issue on Progress in Hydrogen Production and Applications (ICH2P-2015), 3-6 May 2015, Oshawa, Ontario, Canada. v. 41, n. 19, p. 8120–8131, 25 maio 2016.

HASAN, S. D. M. et al. Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water: effect of temperature and alkalinity. **Environmental Technology**, v. 36, n. 20, p. 2637–2646, 18 out. 2015.

HE, Y.; WANG, W.; DING, J. Effects of L-lactic acid and D,L-lactic acid on viability and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Chinese Science Bulletin**, v. 58, n. 20, p. 2404–2411, 1 jul. 2013.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. l-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 4, p. 301–307, 1 mar. 1997.

HOFVENDAHL, K.; HAHN–HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2–4, p. 87–107, fev. 2000.

IBGE. **Tabela 6588: Série histórica da estimativa anual da área plantada, área colhida, produção e rendimento médio dos produtos das lavouras**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>. Acesso em: 3 jun. 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Industrial Anual - Produto 2017**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/industria/9044-pesquisa-industrial-anual-produto.html?=&t=downloads>. Acesso em: 5 jun. 2020.

JAWAD, A. H. et al. Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. **Journal of King Saud University - Science**, v. 25, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2013.

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, n. 3, p. 524–534, mar. 2007.

KIM, D.-H. et al. Effect of temperature on continuous fermentative lactic acid (LA) production and bacterial community, and development of LA-producing UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 355–361, set. 2012.

KOMESU, A. et al. Lactic acid production to purification: A review. **BioResources**, Lactic acid manufacture. v. 12, n. 2, p. 4364–4383, 2017.

LACERDA, I. C. A. et al. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213–219, 25 nov. 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2005.

LI, R.-Y. et al. Evaluation of biocompatibility and toxicity of biodegradable poly (DL-lactic acid) films. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 8, p. 1357–1370, 15 ago. 2015.

LIANG, S.; MCDONALD, A. G.; COATS, E. R. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2022–2027, nov. 2014.

LIMA, C. DE; COELHO, L.; CONTIERO, J. Fermentative production of L-lactic acid from cassava flour wastewater by Lactobacillus rhamnosus RL-1. **Journal of Biotechnology**, v. 150, Supplement, p. 511, nov. 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13 edition ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 14 edition ed. Igarss: Pearson, 2014.

MARI, A. G. et al. Biohydrogen and biomethane production from cassava wastewater in a two-stage anaerobic sequencing batch biofilm reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, 22nd World Hydrogen Energy Conference. v. 45, n. 8, p. 5165–5174, 14 fev. 2020.

MAZZOLI, R. et al. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1216–1236, 15 nov. 2014.

MESQUITA, A. et al. Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, p. 115, 2 maio 2017.

MOCKAITIS, G. et al. **Continuous Anaerobic Bioreactor With Fixed-StructuredBed (ABFSB) for wastewater treatment: a developing technology**. Proceedings of X DAAL. **Anais**... In: LATIN AMERICA WORKSHOP AND SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION. Ouro Preto: 2011.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 181–194, 2009.

MORA-VILLALOBOS, J. A. et al. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations : **Fermentation**, p. 1–21, 2020.

MURARIU, M.; DUBOIS, P. PLA composites: From production to properties. **Advanced Drug Delivery Reviews**, PLA biodegradable polymers. v. 107, p. 17–46, 15 dez. 2016.

MUSSATTO, S. I. et al. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 437–444, 1 jul. 2008.

OLIVEIRA, R. A. DE et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, 2018.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of Manihot esculenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5586–5591, 11 maio 1999.

PADONOU, S. W. et al. Weissella beninensis sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus Weissella. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2193–2198, 2010.

PEDROSO, P. M. O. et al. Plantas tóxicas para animais de produção na Região do Recôncavo da Bahia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 1, p. 120–132, 30 mar. 2018.

POHANKA, M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. **BioMed Research International**, v. 2020, 17 jun. 2020.

REINHARDT, D. HA. **Mandioca - a raiz do Brasil. "O pão do Brasil". Um símbolo da identidade cultural brasileira**. In: AUDIÊNCIA PUBLICA DA COMISSÃO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA, ABASTECIMENTO E DESENV. RURAL. Brasília, 16 abr. 2013. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2013/audiencia-publica-16-de-abril-de-2013-embrapa-mandioca>. Acesso em: 3 jun. 2020

ROSA, P. R. F. et al. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13118–13127, 22 ago. 2014.

ROSA, P. R. F. et al. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1–9, 15 jan. 2016.

SABO, S. DA S. et al. Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527–536, out. 2014.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus Bifidobacterium. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.). . **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston, MA: Springer US, 1995. v. 2p. 279–306.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93–98, abr. 2006.

SILVA, B. G. et al. Foam aerated biofilm reactor: a novel counter-diffusional process for COD and nitrogen removal from low COD/N effluents. **Environmental Technology**, p. 1–13, 9 mar. 2021.

SOUZA, S. DE O. et al. Resíduos de casas de farinha do agreste alagoano: perspectivas de utilização/Waste of flour houses of Alagoas state: use and perspectives. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas**, v. 9, n. 1, p. 65–73, 31 mar. 2015.

TANG, J. et al. Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. **Waste Management**, v. 52, p. 278–285, 2016a.

TANG, J. et al. Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. **Waste Management**, v. 52, p. 278–285, 1 jun. 2016b.

TANG, J. et al. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 544–552, 1 jan. 2017.

TASHIRO, Y. et al. Continuous d-lactic acid production by a novel thermotolerant Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis QU 41. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1741–1750, 17 dez. 2010.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1 jan. 1996.

TOSUNGNOEN, S.; CHOOKIETWATTANA, K.; DARARAT, S. Lactic Acid Production from Repeated-Batch and Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cassava Starch Wastewater by Amylolytic Lactobacillus Plantarum MSUL 702. **APCBEE Procedia**, ICAAA 2013 & CAAS 2013. v. 8, p. 204–209, 2014.

WANG, L. et al. Efficient production of l-lactic acid from cassava powder by Lactobacillus rhamnosus. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7895–7901, out. 2010.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10–18, jan. 2015.

WEE, Y.-J.; KIM, J.-N.; RYU, H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006.

WU, Y. et al. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 53–58, 2015a.

WU, Y. et al. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 53–58, 2015b.

YAO, H. et al. A novel controlled release tetrandrine-loaded PDLLA film: evaluation of drug release and anti-adhesion effects in vitro and in vivo. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 1, p. 13–22, 1 fev. 2020.

ZHANG, B. et al. Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 855–862, 1 mar. 2008.

ZHANG, M. et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Bioresource Technology**, Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy. v. 215, p. 50–62, set. 2016.

ZHANG, W. et al. High-rate lactic acid production from food waste and waste activated sludge via interactive control of pH adjustment and fermentation temperature. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p. 197–206, 15 nov. 2017.