



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ EDVAN MARQUES JUNIOR

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE
BAGAÇO DE CAJU E SUA UTILIZAÇÃO PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
ÁCIDO POLILÁTICO**

FORTALEZA

2023

JOSÉ EDVAN MARQUES JUNIOR

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE
BAGAÇO DE CAJU E SUA UTILIZAÇÃO PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
ÁCIDO POLILÁTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M318p Marques Junior, José Edvan.
Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de bagaço de caju e sua utilização para síntese enzimática de ácido polilático / José Edvan Marques Junior. – 2023.
153 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque.
1. Ácido láctico. 2. biopolímero. 3. bioprocesso. 4. bactérias ácido lácticas. 5. aproveitamento de resíduos. I. Título.

CDD 660

JOSÉ EDVAN MARQUES JUNIOR

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE
BAGAÇO DE CAJU E SUA UTILIZAÇÃO PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
ÁCIDO POLILÁTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Profa. Dra. Michelle Rossana Ferreira Vaz
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Micael de Andrade Lima
University of Greenwich-UK

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por tudo o que Ele tem realizado na minha vida, pela minha saúde, por me dar paciência para continuar e por estar sempre por perto.

Ao meu pai Edvan, que sempre me falou que a caminhada seria difícil, só não imaginava que seria tanto, e eu tenho certeza de que ele continua comigo nessas caminhadas da vida. À minha mãe Marisa, por toda a paciência e por ser sempre um exemplo de como ser forte, determinada, por nunca desistir e por todo o amor e por ser a maior inspiração da minha vida. À minha irmã Edvannia, a melhor irmã do mundo, que vem sendo uma companheira e uma verdadeira amiga nas horas mais complicadas, que me ajuda em todas as questões e por toda sua calma. À minha mãe Eliza, por mostrar que o conceito de família é tudo aquilo que a gente quer por perto e ama. Às minhas tias Iris, Marlene, Socorro e Toinha, por todo o carinho dedicado. Aos meus tios Carlos, Leudo e Márcio, por proporcionarem as melhores lembranças da vida. À minha namorada Rebeca Casemiro, por todo o amor e paciência do mundo e por estar sempre comigo me alegrando com todo o seu amor e seu bom humor.

À Professora Dra. Valderez, por toda a paciência, amizade, respeito, por todos os risos, por me aguentar durante todos esses anos com minha bagunça e compreender meu vocabulário durante todos esses anos e por ser um exemplo a todos de uma excelente profissional e excelente pessoa.

A todos os companheiros do grupo de pesquisa GPBio que caminham comigo até hoje, Ravena, Renata, Bruninha, Juliana, Luzia, Guedes, Tici, Valdelice, Paulinha, Carlos, Geiza, Laiza, Carol, Alan, Letícia, ao professor André e a professora Luciana conseguindo sempre deixar o ambiente de trabalho o mais agradável possível. Em especial, agradeço à Jéssyca, Tiago, Brenda, Cristiane e Jouciane por todo o ensinamento passado, e a Lívia, a melhor IC que alguém poderia ter e a melhor amiga para todas as horas, que me aguentou e sorriu comigo nos piores e melhores momentos. Aos amigos, Silvia, Isa, Raíssa, Karina, Seu Luís, Danilo, Tiago, Professores Filipe e Hosiberto por todas as conversas nos corredores.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (FUNCAP) pelo apoio para realização do presente trabalho.

RESUMO

As questões socioculturais e, em especial, ambientais, têm levado a busca de novos métodos de síntese de materiais alternativamente aqueles originados de combustíveis fósseis. Nesse sentido, a produção de poliácido láctico (PLA), um substituto biodegradável do plástico, pode-se tornar viável a partir de uma rota biotecnológica limpa utilizando resíduos agroindustriais. Para tanto, propõe-se uma estratégia para o aproveitamento do bagaço de caju (BC) como matéria-prima para produção de ácido láctico (AL) pelas bactérias *Lactobacillus plantarum* LAB07, isolada do queijo, e *L. plantarum* LAB14, isolada do molho de pimenta. Depois da produção de AL, o mesmo é utilizado para síntese do PLA. O aproveitamento do BC representa um fator relevante no desenvolvimento de processos sustentáveis, devido a quantidade de resíduo que é rejeitada pela agroindústria e pelo seu potencial uso em processos de biorrefinaria, devido ao fato de a celulose, hemicelulose e lignina, principais frações que o compõem, serem utilizadas para síntese de uma ampla gama de bioprodutos. Inicialmente foi realizado um tratamento com ácido sulfúrico diluído para obter o hidrolisado do bagaço de caju (HBC) com carboidratos fermentescíveis. Depois foram avaliados diversos parâmetros durante os bioprocessos de produção de AL, como tempo de inóculo (16, 20 e 24 horas), temperatura (25, 30, 37 e 45 °C), rotação (100, 150 e 200 rpm) e a suplementação do HBC com fonte de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio e ureia). O HBC apresentou 39,9 g/L de glicose e 28,0 g/L de xilose e foi utilizado para determinar as melhores condições do bioprocessos de produção de AL em agitador orbital, seguida do estudo em biorreator com o controle do pH. Os resultados apontaram que a condição mais favorável para a produção de AL ocorreu usando uma cultura no início da fase estacionária, obtidas com tempo de inóculo de 24 h (LAB07) e 20 h (LAB14), e o processo conduzido a 30 °C e 100 rpm, adicionando-se ureia como fonte de nitrogênio e controlando-se o pH com a adição de NaOH 5 mol/L, produzindo 31,6 g/L e 29,58 g/L de AL levogiro (L) com as cepas LAB07 e LAB14, respectivamente. A utilização do BC como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio na produção de AL ocasionou uma redução de 90% dos custos se comparado com o meio MRS, meio formulado geralmente utilizado. Após isso, foram avaliados diferentes solventes para extração do AL (1-butanol,

clorofórmio, hexano, octanol e tolueno) e observou-se que o melhor resultado foi obtido ao utilizar-se 1-butanol, resultando uma recuperação de 72,1%. Em seguida, realizou-se a polimerização do AL utilizando a enzima lipase B de *Candida antarctica* (CALB) como catalisador e por análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), confirmou-se a síntese do biopolímero PLA. Então, concluiu-se que foi possível realizar a produção de AL utilizando o HBC, um subproduto agroindustrial, e produzir PLA a partir de uma rota enzimática, sendo uma alternativa viável e sustentável para obtenção de um polímero biodegradável com diversas aplicações industriais.

Palavras-chave: ácido láctico; biopolímero; bioprocesso; bactérias ácido lácticas; aproveitamento de resíduos.

ABSTRACT

Sociocultural and, in particular, environmental issues have led to the search for new methods of synthesizing materials alternatively to those originating from fossil fuels. In this sense, the production of polylactic acid (PLA), a biodegradable substitute for plastic, can become viable from a clean biotechnological route using agro-industrial waste. Therefore, a strategy is proposed for the use of cashew apple bagasse (CAB) as a raw material for the production of lactic acid (LA) by the bacteria *Lactobacillus plantarum* LAB07, isolated from cheese, and *L. plantarum* LAB14, isolated from pepper sauce. After the production of AL, it is used for the synthesis of PLA. The use of CAB represents a relevant factor in the development of sustainable processes, due to the amount of waste that is rejected by the agroindustry and its potential use in biorefinery processes, due to the fact that cellulose, hemicellulose and lignin, the main fractions that compose it, to be used for the synthesis of a wide range of bioproducts. Initially, a treatment with diluted sulfuric acid was carried out to obtain the cashew apple bagasse hydrolyzate (CABH) with fermentable carbohydrates. Afterwards, several conditions were evaluated during the LA production bioprocesses, such as the growth phase of the microorganisms to be inoculated, being evaluated by the inoculum time (16, 20 and 24 hours), temperature (25, 30, 37 and 45 °C), rotation (100, 150 and 200 rpm) and CABH supplementation with nitrogen source (yeast extract, ammonium sulfate and urea). The CABH presented 39.9 g/L of glucose and 28.0 g/L of xylose and was used to determine the best fermentation parameters for LA production in an orbital shaker, after being evaluated in a bioreactor, with controlled pH. The results showed that the most favorable condition for LA production occurred using a culture at the beginning of the stationary phase obtained with an inoculum time of 24 h (LAB07) and 20 h (LAB14) and the process conducted at 30 °C and 100 rpm, adding urea as a source of nitrogen and controlling the pH with the addition of NaOH 5 mol/L, producing 31.6 g/L and 29.58 g/L of levorotatory LA (L) with strains LAB07 and LAB14, respectively. The use of CAB as a carbon source and urea as a nitrogen source in the production of AL caused a reduction of 90% compared to the MRS medium (commonly used medium). After that, different solvents for LA extraction (1-butanol, chloroform, hexane, octanol and toluene) were evaluated and it was

observed that the best result was obtained when using 1-butanol, resulting in a recovery of 72.1%. Then, the polymerization of the LA was carried out using the enzyme lipase B of *Candida antarctica* (CALB) as catalyst and by analysis of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), the synthesis of the biopolymer PLA was confirmed. It was concluded that it was possible to produce LA using CABH, an agroindustrial by-product, and to produce PLA from an enzymatic route, being a viable and sustainable alternative for obtaining a biodegradable polymer with several industrial applications.

Keywords: lactic acid; biopolymer; bioprocess; lactic acid bacteria; waste recovery.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química dos isômeros L e D ácido láctico..... 20
- Figura 2 – Equação que representa a reação química de produção do ácido láctico a partir do acetaldeído e cianeto de hidrogênio..... 24
- Figura 3 – Rotas de produção do polímero de ácido láctico (PLA)..... 44
- Figura 4 – Perfil de crescimento dos microrganismos *Lactobacillus plantarum*, cepas LAB 07 (A) e LAB 14 (B), em meio Man, Rogosa, Sharp (MRS), sob as condições de 37 °C e 150 rpm..... 64
- Figura 5 – Perfil do crescimento celular (▲), concentrações de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 37 °C e 150 rpm usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos em diferentes tempos de inóculo: (A) 16 horas (fase de desaceleração do crescimento), (B) 20 horas (fase de desaceleração do crescimento), e (C) 24 horas (fase estacionária do crescimento)..... 66
- Figura 6 – Perfil do crescimento celular (▲), das concentrações de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 37 °C e 150 rpm usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos em diferentes tempos de inóculo: (A) 16 horas (fase de desaceleração do crescimento), (B) 20 horas (fase de desaceleração do crescimento), e (C) 24 horas (fase estacionária do crescimento) 68
- Figura 7 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 150 rpm e diferentes temperaturas (25 °C (A), 30 °C (B), 37 °C (C) e 45 °C (D)) usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 24 h..... 75
- Figura 8 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 150 rpm e diferentes temperaturas (25 °C (A), 30 °C (B), 37 °C (C) e 45 °C (D)) usando *L. plantarum* 78

LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 20 h.....

- Figura 9 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocessamento a 30 °C e diferentes agitações (100 rpm (A), 150 rpm (B) e 200 rpm (C)) usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 24 h..... 86
- Figura 10 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocessamento a 30 °C e diferentes agitações (100 rpm (A), 150 rpm (B) e 200 rpm (C)) usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 20 h..... 88
- Figura 11 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocessamento a 30 °C e 100 rpm usando *L. plantarum* LAB 07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju, inoculado por microrganismos obtidos com 24 h, e suplementando com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 5 g/L: extrato de levedura (A), sulfato de amônio (B) e Ureia (C)..... 94
- Figura 12 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocessamento a 30 °C e 100 rpm usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju, inoculado por microrganismos obtidos com 20 h, e suplementando com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 5 g/L: extrato de levedura (A), sulfato de amônio (B) e Ureia (C)..... 96
- Figura 13 – Influência do controle de pH na produção de ácido láctico por *L. plantarum* LAB 07 do hidrolisado do bagaço de caju suplementado com ureia. Condições de processo: sem controle de pH (A) e com controle de pH (B) a 30 °C e 100 rpm e inóculo cultivado por 24 h. Concentrações de células (▲), glicose (■), ácido láctico (●) e pH (▼)..... 104

Figura 14	–	Influência do controle de pH na produção de ácido láctico por <i>L. plantarum</i> LAB 14 usando o hidrolisado do bagaço de caju suplementado com ureia. Condições de processo: sem controle de pH (A) e com controle de pH (B) a 30 °C e 100 rpm e inóculo cultivado por 20 h. Concentrações de células (▲), glicose (■), ácido láctico (●) e pH (▼).	106
Figura 15	–	Fluxograma do estudo de parâmetros do processo de produção de ácido láctico a partir do bagaço de caju como fonte de carbono utilizando o microrganismo <i>L. plantarum</i> cepa LAB07 (A) e cepa LAB14 (B). As melhores condições foram destacadas em vermelho, com a concentração de ácido láctico obtida expressa entre parênteses, e foram mantidas fixas nos estudos posteriores.....	110
Figura 16	–	Imagens do meio fermentado antes (A) e após (B) o processo de clarificação do meio fermentado.....	113
Figura 17	–	Espectro de varredura do meio fermentado contendo o ácido láctico produzido a partir do hidrolisado do bagaço de caju antes (-) e após (-) processo de clarificação.....	114
Figura 18	–	Imagem ilustrativa da extração do ácido láctico, produzido a partir do hidrolisado do bagaço de caju, da fase aquosa para fase orgânica utilizando como solvente 1-butanol e com tempo de extração de 2 horas.....	118
Figura 19	–	Espectro de RMN de ¹ H da síntese do PLA por lipase B de <i>Candida antactica</i> em tolueno por 2 horas usando o ácido láctico produzido por bioprocesso.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades físico-químicas do ácido láctico.....	21
Tabela 2	– Métodos para hidrolisar materiais lignocelulósicos para produção de ácido láctico.....	30
Tabela 3	– Principais condições para produção de ácido láctico por diferentes microrganismos de diferentes matérias-primas.....	35
Tabela 4	– Caracterização química percentual do bagaço de caju antes e após a hidrólise com H ₂ SO ₄ 0,6 mol/L e quantidade mássica recuperada de cada componente partindo de 100 g de bagaço de caju (valores apresentados entre parênteses).....	60
Tabela 5	– Parâmetros cinéticos, produção, rendimento e produtividade do ácido láctico usando as cepas <i>L. plantarum</i> LAB07 e LAB14 e o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultura, inoculados com culturas obtidas em diferentes tempos de crescimento. Letras diferentes em uma mesma coluna representa resultados estatisticamente diferentes.....	71
Tabela 6	– Parâmetros cinéticos, produção, rendimento e produtividade de ácido láctico obtidos pelas cepas <i>L. plantarum</i> LAB07 e LAB14 a diferentes temperaturas e usando o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultura. Letras diferentes em uma mesma coluna representa resultados estatisticamente diferentes.....	82
Tabela 7	– Fatores de conversão, produção, rendimento e produtividade de ácido láctico pelas cepas <i>L. plantarum</i> LAB07 e LAB14 do hidrolisado do bagaço de caju utilizando diferentes rotações. Letras diferentes em uma mesma coluna representa resultados estatisticamente diferentes.....	90
Tabela 8	– Concentração e produtividade de ácido láctico obtidas pelas cepas <i>L. plantarum</i> LAB07 e LAB14 usando hidrolisado do bagaço de caju suplementado com diferentes fontes de nitrogênio nas melhores condições estabelecidas (LAB 07: tempo de inóculo 24	100

h, temperatura 30 °C e rotação 100 rpm; LAB 14: tempo de inóculo 20 h, temperatura 30 °C e rotação 100 rpm). Letras diferentes em uma mesma coluna representa resultados estatisticamente diferentes.....

- Tabela 9 – Relação entre custo, concentração e custo da produção de ácido láctico (CPAL) usando o hidrolisado do bagaço de caju sem e suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, e usando meio MRS..... 102
- Tabela 10 – Porcentagem de recuperação de ácido láctico por diferentes solventes na separação do ácido láctico comercial e oriundo do bioprocessamento usando o hidrolisado do bagaço de caju por extração líquido-líquido..... 116
- Tabela 11 – Síntese do polímero PLA catalisada pela enzima lipase B de *Candida antarctica* a 25 °C e 150 rpm por 2 horas em diferentes solventes e usando o ácido láctico oriundo do bioprocessamento..... 119

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos geral e específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Ácido lático	20
2.2	Processo de produção de ácido lático.....	22
2.2.1	<i>Processo de produção de ácido lático por via química.....</i>	<i>23</i>
2.2.2	<i>Processo de produção de ácido lático por via biotecnológica.....</i>	<i>24</i>
2.3	Matérias-primas para a produção de ácido lático.....	27
2.3.1	<i>Caju.....</i>	<i>29</i>
2.3.2	<i>Método de hidrólise.....</i>	<i>30</i>
2.4	Microrganismos utilizados na produção de ácido lático.....	31
2.5	Poliácido lático (PLA)	40
2.6	Processo de produção de poliácido lático.....	41
2.6.1	<i>Processo de produção de poliácido lático por via química.....</i>	<i>42</i>
2.6.2	<i>Processo de produção de poliácido lático por via biotecnológica....</i>	<i>45</i>
2.7	Aspectos econômicos e ambientais.....	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Bagaço de caju.....	49
3.2	Caracterização do bagaço de caju.....	49
3.3	Hidrólise ácida do bagaço de caju.....	49
3.4	Microrganismo.....	50
3.5	Preparação de inóculo.....	50
3.6	Produção de ácido lático em agitador orbital.....	51
3.6.1	<i>Ensaio para determinação do tempo de crescimento do inóculo.....</i>	<i>52</i>
3.6.2	<i>Ensaio para determinação da temperatura ótima.....</i>	<i>52</i>
3.6.3	<i>Ensaio para determinação da rotação ótima.....</i>	<i>52</i>
3.6.4	<i>Ensaio para determinação da melhor fonte de nitrogênio.....</i>	<i>53</i>
3.7	Ensaio de produção de ácido lático em biorreator.....	54
3.8	Parâmetros cinéticos do processo de produção de ácido lático.....	54
3.9	Concentração, extração e separação de ácido lático.....	55
3.10	Determinação do poder rotatório específico.....	56
3.11	Produção de poliácido lático (PLA).....	56

3.12	Métodos analíticos.....	57
3.12.1	<i>Determinação da concentração celular.....</i>	57
3.12.2	<i>Determinação do substrato e do produto.....</i>	58
3.13	Análises estatísticas.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1	Caracterização do bagaço e hidrolisado de caju.....	60
4.2	Estudo da curva de crescimento dos microrganismos em meio sintético.....	63
4.3	Produção de ácido lático em agitador orbital.....	66
4.3.1	<i>Avaliação do tempo de inóculo na produção de ácido lático.....</i>	66
4.3.2	<i>Avaliação da temperatura na produção de ácido lático.....</i>	74
4.3.3	<i>Avaliação da rotação na produção de ácido lático.....</i>	85
4.3.4	<i>Avaliação das fontes de nitrogênio na produção de ácido lático.....</i>	92
4.3.5	<i>Produção de ácido lático em biorreator.....</i>	103
4.4	Concentração, extração e separação de ácido lático.....	112
4.5	Produção enzimática de poliácido lático (PLA).....	118
5	CONCLUSÃO	123
6	PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.....	125
	REFERÊNCIAS	128

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico, composto orgânico ($C_3H_6O_3$) que apresenta isomeria óptica, nas formas dextrógiro e levógiro e também como mistura racêmica -D, -L, pode ser encontrado em diversos alimentos e tecidos, como no leite, nos fluidos e tecidos musculares de seres humanos e animais, ou é um produto intermediário no metabolismo de diversos microrganismos. O ácido láctico é um produto classificado como uma *commodity* com diversas aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticas. Além disso, tem ganhado especial destaque em um segmento promissor no cenário global atual que é a produção de poliácido láctico, um biopolímero com potencial para fabricação e substituição dos plásticos oriundos do petróleo.

A produção de ácido láctico pode ocorrer por via química, porém apresenta altos custos com a aquisição de matérias-primas e produz uma mistura racêmica, necessitando de processos mais complexos para separação dos isômeros, o que eleva custos e aumenta impactos ambientais. Uma alternativa viável a esta rota são os processos biotecnológicos, que, em geral, podem utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima para o processo microbiano, que, por sua vez, pode determinar qual isômero será produzido a partir da seleção do microrganismo, alcançando-se a produção de um ácido láctico enantiomericamente puro. A maioria dos estudos visa a produção do L-ácido láctico, por apresentar uma maior gama de aplicações, seja na indústria de alimentos ou farmacêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018), haja vista que o isômero D, em quantidades elevadas, é nocivo ao organismo humano e pode causar alguns malefícios, como acidose e descalcificação (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Dentre as matérias primas que podem ser utilizadas para produzir ácido láctico pode se destacar resíduos alimentares, sólidos urbanos, resíduos agroindustriais como palha de trigo, palha de milho e bagaço de sisal, entre outros. Esses tipos de biomassa, conhecidos por materiais lignocelulósicos, são majoritariamente compostos por celulose, hemicelulose e lignina e a partir de tratamentos específicos, é possível obter açúcares fermentescíveis para produção do ácido láctico (DIN *et al.*, 2022). Um exemplo de material lignocelulósico que ainda não foi avaliado como matéria-prima na produção de

AL é o bagaço de caju, e este material tem sido estudado pelo Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO) na produção de outros produtos como etanol (CORREIA *et al.*, 2022, ROCHA *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2013), xilitol (MARQUES e ROCHA, 2021; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015) e hidrogênio (SILVA *et al.*, 2018).

O bagaço de caju (BC) é uma matéria-prima lignocelulósica que contém aproximadamente 19% de celulose, 18% de hemicelulose e 33% de lignina (SERPA *et al.*, 2020; MARQUES e ROCHA, 2021), e os polissacarídeos presentes, após hidrólise, liberam o açúcar (glicose) necessário para a produção de ácido láctico. Essa produção pode ser alcançada efetivamente com a utilização de bactérias ácido lácticas (BALs), que são capazes de produzir altas concentrações ácido láctico a partir de diversos substratos.

Devido a problemática ambiental causada pela utilização excessiva de plásticos provenientes do petróleo, há uma elevada demanda pelo desenvolvimento de produtos alternativos que sejam sustentáveis (MILAD *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2021). De acordo com os dados obtidos pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UN Environment Programme (2021)), são descartadas mais de cinco trilhões de sacolas plásticas e um milhão de garrafas plásticas anualmente, em que os produtos plásticos representam 85% do lixo marinho. Esse relatório ressalta também que a pandemia de COVID-19 ocasionou em um grande uso de embalagens plásticas de alimentos, luvas e máscaras descartáveis. No entanto, uma quantidade muito pequena, cerca de 9% a 12%, é reciclada ou incinerada, sendo que aproximadamente 79% têm um descarte incorreto e são destinados a aterros sanitários (KASAVAN *et al.*, 2021). Desta forma, é essencial que se busquem alternativas para a produção e utilização de bioplásticos, que são biodegradáveis e, portanto, reduzirão os impactos ambientais causados com seu descarte. Um biopolímero que vem ganhando bastante destaque no mercado de novas embalagens e plásticos é o poliácido láctico ou ácido polilático (PLA).

Uma das vantagens da produção de PLA reside na possibilidade do uso de enzimas como biocatalisadores, reduzindo o impacto ambiental se comparado ao uso de catalisadores metálicos comumente utilizados (GAO *et al.*, 2011). Contudo é observada a necessidade de mais estudos relacionados a utilização desses biocatalisadores como uma forma de conseguir produzir um

PLA que atenda aos requisitos necessários da legislação ambiental, como menor consumo de energia, menor emissão de gás carbônico (CO₂), menor potencial de aquecimento global e de eutrofização, utilização de energia não renovável e ocupação agrícola do solo (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Desta maneira, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um processo biotecnológico de produção de ácido láctico a partir do hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultivo e avaliar a produção de ácido polilático por via enzimática usando o ácido láctico obtido.

1.1 Objetivos geral e específicos

O objetivo geral do trabalho foi produzir ácido láctico por bioprocessamento fermentativo usando o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultura, avaliando os principais parâmetros que influenciam na produção como idade do inóculo, temperatura, rotação e fonte de nitrogênio. Em seguida investigar a síntese enzimática do poliácido láctico por lipases comerciais de diferentes fontes. Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Avaliar a produção de ácido láctico com o hidrolisado ácido do bagaço de caju por dois diferentes microrganismos (*L.plantarum* LAB07 e *L. plantarum* LAB14);
- Avaliar condições operacionais para produção do ácido em agitador orbital, como: fase de crescimento da cultura de inóculo (tempo de inóculo), temperatura, intensidade de agitação e fonte de nitrogênio;
- Nas melhores condições operacionais obtidas em agitador orbital, avaliar a produção do ácido sem e com controle de pH;
- Avaliar a separação e purificação do ácido láctico produzido a partir do hidrolisado de bagaço de caju;
- Avaliar o isômero formado durante a produção de ácido láctico por polarimetria;
- Avaliar a síntese do polímero PLA por via enzimática utilizando lipases como biocatalisadores a partir de ressonância magnética nuclear (RMN).

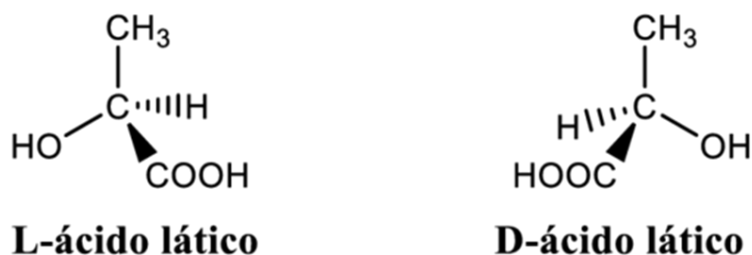
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido láctico

Historicamente, o ácido láctico (AL), 2-hidróxipropanóico ($\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH}$), foi descoberto pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele em 1780, isolando-o de um xarope marrom impuro que continha ácido láctico a partir do leite. No ano de 1789, Lavoisier começou a chamar esse composto do leite de “ácido acídico”. Em 1857, Pasteur constatou que o ácido láctico era um dos metabólitos de alguns microrganismos. Posteriormente, em 1891, Frémy realizou a fermentação, em escala industrial, na qual foi obtido ácido láctico originando assim a primeira produção de ácido láctico industrial dos Estados Unidos (GHAFAR *et al.*, 2014).

Na Figura 1 está representada a estrutura química dos isômeros L e D de ácido láctico.

Figura 1 - Estrutura química dos isômeros L e D ácido láctico.



Por apresentar um carbono quiral em sua estrutura, o ácido láctico pode ser encontrado nas formas isoméricas L e D (OLIVEIRA *et al.*, 2018) e suas estruturas estão representadas na Figura 1. Como concentrações elevadas do isômero D são capazes de gerar inúmeros problema a saúde humana, como acidose ou descalcificação, o isômero L é preferido pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (OLIVEIRA *et al.*, 2018; ES *et al.*, 2018; DE LA TORRE *et al.*, 2019).

A Tabela 1 apresenta as principais propriedades físico-químicas do ácido láctico. Na qual é possível observar a massa molar, os pontos de fusão para os

isômeros L e D e para a mistura racêmica, densidade, viscosidade, pH, acidez, entre outras.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do ácido láctico

Propriedades	Características
Fórmula Química	$C_3H_6O_3$
Massa Molar	90,08 g/mol
Ponto de fusão	L: 28 °C; D: 28 °C; D/L: 16,8 °C
Ponto de ebulição	O racêmico entra em ebulição a 122 °C
Densidade	1,206 g/mL
Viscosidade	5,0 60,0 mPa.s a 25 °C (solução 50-90%)
Tensão superficial	50 - 44 mN/m (solução 50-90%)
pH	< 2,0 a 25 °C
Acidez (pKa)	3,85
Solubilidade na água	Miscível
Calor de combustão	-3,620 cal/g
Aparência	Líquido
Cor	Incolor/amarelo/castanho claro
Odor	Característico

Fonte: Elaborado pelo autor (2022), Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ (2022).

O ácido láctico apresenta as funções orgânicas de ácido carboxílico e de álcool em sua composição. Assim, pode participar de diversas reações químicas, como condensação, esterificação, polimerização, redução e substituição, sendo um produto químico que apresenta um enorme potencial de utilização em diferentes indústrias (PAL *et al.*, 2009). Então, devido a sua grande versatilidade, o AL é considerado uma *commodity* de elevada demanda.

O AL pode ser aplicado como acidulante, intensificador de sabor e conservante, tendo características muito desejáveis em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (WANG *et al.*, 2015). Na indústria de alimentos é utilizado no ajuste de pH de inúmeros produtos, como cervejas, cidras e vinhos,

e com conservante de produtos da indústria dos laticínios. A indústria de alimentos é responsável pelo uso de quase 70% de todo o ácido láctico produzido no mundo, sendo utilizado na fabricação de diferentes produtos, como iogurtes e queijos (MARTINEZ *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2018; ES *et al.*, 2018). O AL também é aplicado como emulsificante (GAO, MA, & XU, 2011) e na indústria farmacêutica e de cosméticos é utilizado para produção de loções para pele e tratamentos dérmicos.

O ácido láctico também é utilizado por indústrias de insumos químicos para produção de produtos químicos oxigenados (propilenoglicol), reguladores de crescimento de plantas e intermediários químicos especiais (OSHIRO *et al.*, 2009; SINGHVI *et al.*, 2010; TASHIRO *et al.*, 2011). Nas indústrias têxteis e farmacêuticas é utilizado na fabricação de solventes verdes (etil, propil, butil e lactatos) (DATTA e HENRY, 2006).

Uma importante aplicação de AL é na fabricação de termoplásticos biodegradáveis como o polímero de ácido láctico (PLA). O PLA pode ser utilizado como matéria-prima para embalagens, espumas e fibras, contudo, especialmente por ser uma tecnologia recente, possui elevados custos com a produção industrial em larga escala (WANG *et al.*, 2016). Por outro lado, devido aos substanciais benefícios relacionados, especialmente a questões de sustentabilidade, tanto o ácido láctico quanto o PLA têm chamado atenção da comunidade científica, que busca a cada dia reduzir os custos de sua produção.

Também, cada vez mais intensamente, busca-se obter produtos de valor agregado a partir de bioprocessos devido a atenção global com os temas relacionados as questões ambientais e de energia, efetivando-se o estabelecimento de processos sustentáveis (ES *et al.*, 2018). Então, devido ao avanço dos processos biotecnológicos, moléculas de cadeias curtas têm sido cada vez mais avaliadas quanto a sua utilização como blocos de construção em diferentes tipos de indústrias (RONZON *et al.*, 2017), a exemplo do AL.

2.2 Processo de produção de ácido láctico

O ácido láctico pode ser obtido por via química e biotecnológica. Durante a produção do ácido láctico pelo método químico, realizada a partir da hidrólise do lactonitrila, há formação de uma mistura racêmica, ou seja, os isômeros D-ácido

lático e L-ácido lático são formados. Já os bioprocessos microbianos apresentam como vantagem produtiva, a obtenção do ácido lático na forma D-ácido lático ou L-ácido lático, de acordo com a enzima vinculada ao processo, ou seja, depende do microrganismo escolhido (OLIVEIRA *et al.*, 2016; BERNARDO *et al.*, 2016; BOONTIM *et al.*, 2016). De acordo com os últimos dados, cerca de 90% de todo ácido lático produzido no mundo, é obtido por via microbiana e em 2021, no mundo todo, foi produzido 1,39 milhões de toneladas de ácido lático que representou 1,3 bilhões de dólares (FERNÁNDEZ, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

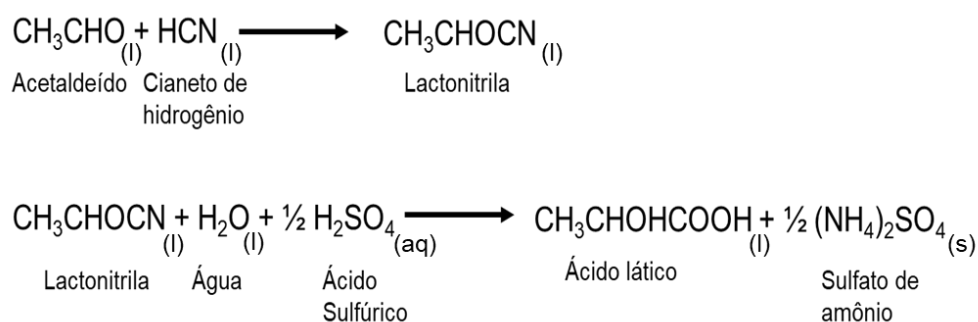
No processo microbiano de produção de ácido lático, utilizam-se bactérias, leveduras ou fungos (PLEISSNER *et al.*, 2015). Em geral, esse processo é realizado em temperaturas mais amenas, com consumo energético reduzido e obtém-se um produto com pureza óptica elevada (ILMEN *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2001).

Em comparação com a produção química, a produção microbiana de AL apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de utilização de recursos renováveis como matéria-prima (BERNARDO *et al.*, 2016), sendo considerado um dos produtos químicos com potencial para ser obtido a partir destas fontes, como biomassa lignocelulósica (WALTON *et al.*, 2010).

2.2.1 Processo de produção de ácido lático por via química

A produção pelo método químico de ácido lático ocorre a partir da lactonitrila ($\text{CH}_3\text{CHO CN}$). Inicialmente, se introduz um catalisador básico em um reator a elevada pressão com cianeto de hidrogênio (HCN) e acetaldéido (CH_3CHO), obtendo-se o lactonitrilo. Em seguida, é realizada uma etapa de destilação para purificar o produto formado e, posteriormente, uma hidrólise ácida, com ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4), assim formando-se o ácido lático (NARAYANAN *et al.*, 2004). Na Figura 2 está representada as equações das reações químicas envolvidas na produção do ácido lático, destacando-se que, além de ser sintetizada uma mistura racêmica, forma-se sulfato de amônio como subproduto quando se utiliza ácido sulfúrico.

Figura 2 – Equação que representa a reação química de produção do ácido láctico a partir do acetaldeído e cianeto de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de Narayanan *et al.*, 2004.

É evidente que uma das desvantagens do uso do método químico, além do elevado custo dos reagentes requeridos, é a produção de uma mistura racêmica do ácido, que requererá maiores gastos com processos de purificação. Outra desvantagem desse processo é a utilização de um catalisadores químicos no processo como zeólitas USY (Ultrastable Y) (JANSSEN *et al.*, 2007), e ácidos de Lewis com estanho e alumínio em seus sítios ativos (HOLM, SARAVANAMURUGAN, TAARNING, 2010). Tal produção ocorre sob condições de elevadas temperaturas (cerca de 100 °C) e altas pressões atmosféricas. Também, ocorre a formação subprodutos indesejados, favorecendo a busca por alternativas mais sustentáveis, como os bioprocessos.

2.2.2 Processo de produção de ácido láctico por via biotecnológica

Devido a possibilidade do uso de matérias-primas oriundas da agroindústria, os métodos biotecnológicos são promissores para a produção de AL, em especial pela possibilidade de redução de custos. Assim, as características que as matérias-primas devem ter para serem aplicadas nestes processos são: não necessidade de purificação, alto grau de conversão, baixo custo, baixo nível de contaminantes, altas taxas de rendimento e produtividade de AL. Adicionalmente, deve-se verificar se existe ou não a formação de subprodutos que interferiram na obtenção do produto de interesse, que esteja disponível em todos os períodos do ano, e se é necessário uso de pré-

tratamentos antes da fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2016; ALVES-FERREIRA *et al.*, 2022).

Em bioprocessos, os métodos operacionais mais utilizados para produção de ácido láctico são batelada, batelada alimentada e contínuo. Para escolher o melhor método a ser utilizado deve-se avaliar as propriedades cinéticas do microrganismo, o substrato utilizado e os aspectos econômicos do processo. O sistema em batelada é o método mais simples de produção, apresenta como vantagens uma maior flexibilidade para responder melhor a mudanças necessárias, economia de escala, maior controle para conseguir ajustar as condições do processo e otimizar a produção, menor investimento inicial e menor risco. Contudo apresenta como desvantagens a possibilidade de inibição por formação de produto, ou seja, levando o aumento da concentração de AL interferir negativamente no crescimento celular, devido principalmente a mudança de pH no meio reacional. A alta concentração de substrato, em alguns casos, também pode reduzir os rendimentos, devido a possíveis inibições (COELHO *et al.*, 2011).

Quando se utiliza o processo contínuo é possível obter altas taxas de produtividade por um período mais longo de operação (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000), contudo devido aos processos contínuos serem mais complexos e mais fáceis de ocorrerem contaminação sua utilização torna-se limitada (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2019). A batelada alimentada, na qual adiciona-se mais substratos durante a fermentação, é um dos processos mais indicados, pois permite-se controlar a concentração de açúcares, na solução garantindo assim que não ocorrerá problemas de inibição por substrato (SOLETTO *et al.*, 2008).

Em relação aos fatores fermentativos, os principais parâmetros que influenciam o crescimento celular, rendimento e produtividade durante a produção de ácido láctico são o pH, as concentrações de nutrientes, substratos e produtos e a temperatura. É reportado na literatura que em baixo pH não ocorre crescimento celular nem produção de ácido láctico. Desta forma, diversos autores (TASHIRO *et al.*, 2011; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011a, b; SHIBATA *et al.*, 2007) mostram que fermentações em batelada com controle de pH pela adição de agentes neutralizantes (como carbonato de cálcio (CaCO₃), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de amônio (NH₄OH)) podem favorecer sua produção.

Como o processo em batelada ocorre em um sistema fechado, a quantidade de nutrientes é limitada à concentração inicial, ou seja, os nutrientes são reduzidos ao longo do bioprocessamento, conduzindo a redução do crescimento celular e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ácido láctico. Altas concentrações de substrato também podem apresentar efeitos inibitórios (DING e TAN, 2006; GATJE e GOTTSCHALK, 1991; OSHIRO *et al.*, 2009). Desta maneira, a produção de ácido láctico pode ser conduzida por batelada alimentada, como citado anteriormente, adicionando-se substratos ao decorrer do tempo de fermentação, alcançando-se maiores concentrações celulares e de ácido láctico (BAI *et al.*, 2004; DING e TAN 2006).

A inibição pela formação do produto é outro problema que pode ocorrer na produção de AL, sendo necessário a separação do meio à medida em que é formado. Estratégias têm sido reportadas na literatura para minimizar esse tipo de inibição, como a extração fermentativa (HANO *et al.*, 1993; HONDA *et al.*, 1995; IYER e LEE, 1999a, b; YABANNAVAVAR e WANG, 1991; YE *et al.*, 1996), eletrodialise (BOYAVVAL *et al.*, 1987; HONGO *et al.*, 1986; KIM e MOON, 2001; MIN-TIAN *et al.*, 2005; NOMURA *et al.*, 1998; VAN NISPEN e JONKER, 1991; VONKTAVEESUK *et al.*, 1994), membrana de nanofiltração e uso de resinas de troca iônica (JEANTET *et al.*, 1996; MONTEAGUDO e ALDAVERO, 1999; SRIVASTAVA *et al.*, 1992; VACCARI *et al.*, 1993). Com a remoção do ácido láctico de maneira contínua do meio de cultura é possível incrementar o rendimento de ácido láctico, superando os processos em batelada (MIN-TIAN *et al.* 2005). Contudo, divergindo a esses ganhos, o fato de ocorrer uma diminuição na taxa de fluxo do permeado e o elevado preço das geralmente membranas utilizadas muitas vezes tornam tal processo inviável. Podem ser utilizadas membranas de eletrodialise monopolar que concentra e purifica o caldo e depois membranas de eletrodialise bipolar que convertem sais de lactato em ácido láctico (RYU *et al.*, 2012). Bernardo *et al.* (2016) utilizaram a membrana HL da GE Osmonics com área de 6,28 cm² no processo de purificação.

Outro parâmetro de fundamental importância em bioprocessos, e que está intrinsecamente relacionada na produção de ácido láctico, é a temperatura, pois relaciona-se aos parâmetros cinéticos de crescimento celular e formação do produto (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011). As temperaturas utilizadas na produção

desse ácido está entre 30 °C e 45 °C, baseando-se nas várias literaturas consultadas.

A produção de ácido láctico por bioprocessos ocasiona a diminuição do pH, haja vista que quanto maior a quantidade de ácido láctico no meio menor será o pH. Com o intuito de manter o pH próximo ao ideal, deve-se adicionar base para elevar o pH. São reportados, especialmente, o uso de hidróxido de cálcio (CaOH), carbonato de cálcio (CaCO₃), hidróxido de amônio (NH₄OH) e hidróxido de sódio (NaOH) (TASHIRO *et al.*, 2011; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011a, b; SHIBATA *et al.*, 2007). Contudo, é observado que quando ocorre a adição de Ca(OH)₂ ocorre a formação de um subproduto, o lactato de cálcio. Deve-se então separar o lactato de cálcio das células por filtração e em seguida purificar por algum processo como adsorção com carvão ativado (BENEVENUTI e PEREIRA Jr, 2016). A separação ocorrerá pela acidificação mediante adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Contudo essa reação gera o sulfato de cálcio (CaSO₄), conhecido como gesso, que é um subproduto considerado um dos maiores empecilhos ambientais relacionados a produção biotecnológica de ácido láctico.

2.3 Matérias-primas para a produção de ácido láctico

Para o processo fermentativo de produção de ácido láctico, as matérias-primas correspondem a mais de 34% do custo total de produção (ÅKERBERG *et al.*, 2000). Como características principais dos materiais a serem usados para produção de AL estão a sua disponibilidade, serem recursos renováveis e economicamente viáveis (JUTURU e WU, 2016). Desta maneira, busca-se cada vez mais fontes alternativas visando se alcançar uma maior eficiência e economia do processo.

Materiais lignocelulósicos apresentam-se como matérias-primas abundantes e de baixo custo e têm sido reportados na literatura devido as suas vastas aplicações industriais na produção de biocombustíveis e biomoléculas de elevado valor agregado. Materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, que com o processo de hidrólise obtém-se carboidratos fermentescíveis necessários para produção de diferentes bioprodutos. (VÁSQUEZ *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2018; MARQUES e ROCHA, 2021).

As principais características que fazem com que se utilizem os materiais lignocelulósicos para processos em larga escala são a sua grande quantidade disponível, seu preço baixo e elevado teor de açúcares, bem como por ser uma matéria-prima renovável (RAHMAN *et al.*, 2011). A celulose e hemicelulose são as frações que se obtém os principais açúcares fermentescíveis (glicose, xilose, arabinose, entre outros), mas estão envoltas pela lignina. Portanto, deve ser realizado algum tipo de pré-tratamento na biomassa, que seja capaz de romper ou remover a lignina e assim conseguir aumentar a digestibilidade destas frações aumentando sua conversão nos açúcares necessários (ROCHA *et al.*, 2014).

A celulose é considerada a principal substância que forma a parede celular dos vegetais, sendo um homopolímero linear formado por monômeros de glicose com alto grau de polimerização, alta cristalinidade e difícil de ser hidrolisado (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). A hemicelulose, diferentemente da celulose, é um heteropolímero, mais fácil de ser hidrolisada, amorfa, apresenta baixo grau de polimerização e após a hidrólise é capaz de liberar no meio pentoses, hexoses e ácido urônico (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). A lignina é a parte da biomassa responsável tanto por sustentar os polímeros como também por atuar de forma a inibir a degradação da celulose e hemicelulose (FENGER, WEGENER, 1989; KUHAD, SINGH, 1993). Juntamente com a celulose e a hemicelulose é responsável pela maior parte da formação do material lignocelulósico e é um composto bastante complexo sendo constituído de compostos fenólicos, álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (LADISCH, 1979; BISARIA, GHOSE, 1981; SINGH, MISHRA, 1995).

Analisando-se fontes alternativas de carbono para produção de ácido láctico, observa-se que os materiais lignocelulósicos (ML) já têm sido largamente utilizados para produção de diferentes produtos químicos em larga escala (ZHOU *et al.*, 2011). Resíduos de alimentos (ESTEBAN e LADERO, 2018), trigo, cevada, milho e melão de açúcar (GHAFAR *et al.* 2014) são exemplos de matérias-primas que também podem ser utilizadas para produção de ácido láctico, bem como resíduos de milho e sementes de algodão, tanto como fontes de carbono e nitrogênio visando assim a redução dos custos de produção (BAI *et al.*, 2016). Também, é reportado na literatura estudos sobre a utilização de resíduos do beneficiamento de madeira em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) (HAMA *et al.*, 2015).

E dentre esses materiais destaca-se o bagaço de caju, um resíduo agroindustrial abundante com valores de celulose e hemicelulose superiores a alguns outros materiais lignocelulósicos e vem sendo reportado na literatura como um substrato utilizado na obtenção de diferentes bioprodutos como etanol, xilitol e hidrogênio (ROCHA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2018; MARQUES JUNIOR e ROCHA, 2021), e que foi estudado nesse trabalho para produção de ácido láctico.

2.3.1 Caju

O caju, da espécie *Anacardium occidentale L.*, é produzido em diversos países ao redor do mundo totalizando uma área agricultável igual a cinco milhões de hectares (SERPA *et al.*, 2020) e uma produção mundial no ano de 2020 igual a 4.180,99 milhões de toneladas de castanha de caju (AGRIEXCHANGE, 2023). No Brasil, a produção de caju em 2021 apresentou uma área igual a 427 mil hectares, ou seja, cerca de 8,5% da produção mundial, e desse total, o estado do Ceará se desta como o maior produtor (IBGE, 2021). O caju é composto de duas partes, a parte carnosa, que representa o pedúnculo (cerca de 90% do caju), é o pseudofruto. Já a outra parte, o fruto, é a castanha do caju, que apresenta grande importância econômica haja vista que boa parte do fruto é exportada.

Entre 10 e 15 toneladas do pseudofruto são produzidas para cada tonelada de caju (DAS e ARORA, 2017), sendo, após extração do suco, produzidos cerca de 15% de bagaço (PADILHA *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2017), evidenciando assim que o bagaço de caju (BC) pode ser considerado um importante resíduo obtido do agronegócio brasileiro (CORREIA *et al.*, 2022; REIS *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2014). Somando-se a este fato, a sua composição química permite que seja considerado como uma potencial matéria-prima alternativa para a obtenção de diferentes produtos de alto valor agregado.

Diversos trabalhos têm se voltado para o uso deste resíduo na produção de diferentes moléculas como, por exemplo, enzimas, biossurfactante, biopolímeros, pigmentos naturais e álcoois, reforçando a possibilidade do uso do BC para obtenção de ácido láctico. Por exemplo, xilitol (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022; MARQUES E ROCHA, 2021; ROCHA *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*,

2015), etanol (RODRIGUES *et al.*, 2016; CORREIA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2011), hidrogênio (SILVA *et al.*, 2018) e enzimas (RODRIGUES *et al.*, 2007). Para tanto, devido à complexidade da estrutura dessa biomassa, são realizados diferentes tratamentos ou hidrólises, que se fazem necessários para obter açúcares para biotransformação.

2.3.2 Métodos de hidrólise

Nos últimos anos, diversos cientistas vêm estudando numerosos métodos capazes de hidrolisar os materiais lignocelulósicos e assim liberar açúcares fermentescíveis (KUMAR *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011). A Tabela 2 apresenta alguns métodos de hidrólise que são reportados na literatura e que são capazes de liberar esses açúcares.

Tabela 2 - Métodos para hidrolisar materiais lignocelulósicos para produção de ácido láctico.

Métodos	Referência
Explosão a vapor	XAVIER, 2011
Hidrólise alcalina	WISCHRAL, <i>et al.</i> , 2019.
Hidrólise enzimática	DE LA TORRE <i>et al.</i> , 2019; CIZEIKIENE <i>et al.</i> 2018
Hidrólise ácida	KIM <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Na hidrólise da biomassa usando o método de explosão a vapor ocorre a descompressão da matéria-prima juntamente com vapor de água saturado rapidamente solubilizando a fração hemicelulósica com um baixo custo-benefício. Em contrapartida, esse método ocorre sob condições desvantajosas pois opera a altas pressões e temperaturas, promovendo a degradação da hemicelulose e da lignina, liberando compostos tóxicos indesejados (CHEN; HAN; XU, 2008, XAVIER, 2011).

O método de hidrólise alcalina consiste em remover a lignina presente na matéria-prima lignocelulósica aumentando assim a digestibilidade da celulose

(SÁNCHEZ e CARDONA, 2008, WISCHRAL, *et al.*, 2019). Porém, como desvantagem, a hemicelulose também é solubilizada e a utilização do hidrolisado torna-se muito difícil pela presença dos compostos oriundos da degradação da lignina (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Já a hidrólise enzimática requer uma etapa anterior para liberar celulose, hemicelulose e lignina. Em seguida, a hidrólise enzimática efetivamente é realizada, com as enzimas, complexo de celulase, bem como as preparações de xilanase, hemicelulase e β -glicosidase para, por fim, se obter o hidrolisado composto por glicose (FITZPATRICK *et al.*, 2010; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; CORREIA, ROCHA E GONÇALVES, 2012; CORREIA *et al.*, 2015; CORREIA *et al.*, 2022). Esse método apresenta como vantagem alta conversão de hidrólise obtendo concentrações maiores de açúcares no meio fermentescível, comparada aos outros métodos, porém como desvantagem tem-se o longo tempo de reação e o alto custo das enzimas (MODENBACH e NOKES, 2013; CIZEIKIENE *et al.* 2018; DE LA TORRE *et al.*, 2019).

Por fim, cita-se a hidrólise ácida, que pode ser realizada tanto com a utilização de ácidos diluídos como com ácidos concentrados. Contudo, o uso de ácido diluído apresenta como vantagem a redução de problemas com corrosão e menores formações de compostos inibidores. Por outro lado, é observado uma menor quantidade de açúcares obtidos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Os principais ácidos utilizados nesse tipo de hidrólise são o ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Normalmente são conduzidas a alta temperatura (121 - 125 °C), podendo ser realizada em autoclave com pressão de 1 atm, porém é um processo de que ocorre por um tempo relativamente curto (0,5 – 1 h) (PING *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; MARQUES e ROCHA, 2021).

2.4 Microrganismos utilizados na produção de ácido láctico

Diversas classes de microrganismos são capazes, por diferentes rotas, de produzir ácido láctico, sejam bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias têm sido os microrganismos mais utilizados para produção de ácido láctico. As bactérias lácticas são descritas como Gram positivas, aeróbias ou aeróbias facultativas, não formadoras de esporos, sendo encontradas na forma

de bastão ou coco, sendo dos gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, entre outras. (KANDLER, 1983). Em relação ao seu metabolismo, podem ser classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas, dependendo da fonte de carbono que utilizam para produção de AL. As bactérias são classificadas como homofermentativas quando produzem apenas o ácido láctico e heterofermentativas quando além dele são capazes de produzir ácido acético (CH₃COOH), etanol (C₂H₅OH) e dióxido de carbono (CO₂) (POT e TSAKALIDOU, 2009; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010). Outra condição característica importante é a exigência nutricional complexa por esses microrganismos, requerendo vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e nitrogênio para seu crescimento (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

BALs apresentam como ponto positivo a alta capacidade de adaptação e uma grande diversidade metabólica, permitindo que consigam viver em diferentes condições ambientais (SALMINEN *et al.*, 2004). É relatado que existem diversos estudos, em torno de 90%, sobre a produção de ácido láctico a partir desses microrganismos, isso ocorre devido a algumas características como: o fato dessas bactérias apresentarem altos valores de rendimento e produtividade de ácido láctico (WANG *et al.*, 2015), bem como o fato dessas bactérias atuarem em uma longa faixa de pH 3,2 a 9,6 e longas faixas de temperaturas 5 a 45 °C (CAPLICE, 1999).

O crescimento das BALs acontece tanto em condições de anaerobiose, pois não necessitam de oxigênio (O₂) para geração de energia, como também em ambiente que apresentem oxigênio. Existem também microrganismos aero tolerantes, devido à presença de peroxidases na sua constituição, resistem aos efeitos do oxigênio e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

Para uso industrial, é requerido que as BALs produzam eficientemente ácido láctico utilizando matérias-primas baratas, que necessitem de poucos nutrientes nitrogenados, proporcionem altos índices de rendimentos e produtividades deste ácido, além de não formarem subprodutos (NARAYANAN *et al.*, 2004), sendo relatado na literatura diferentes BALs com estas características.

Na Tabela 3 estão apresentadas diferentes ML usados por diferentes microrganismos capazes de produzir ácido láctico a partir dos açúcares liberados. É possível constatar que existe uma grande quantidade de microrganismos e matérias-primas a serem usados na produção de AL.

A Tabela 3 também destaca as diferentes condições operacionais nas quais ocorrem a produção de ácido láctico, sendo possível observar que, de acordo com os trabalhos citados, a maior parte da produção de ácido láctico ocorre na faixa de pH do neutro para o ácido, ou seja, entre 5 e 7, enquanto as temperaturas apresentam uma faixa de operação maior que vai desde 30 °C até 55 °C.

Chacon *et al.* (2021) observaram uma produção de ácido láctico com *Bacillus smithii* igual a 5,1 g/L ao operar em condições de pH igual a 5 e temperatura igual a 55 °C. Enquanto que Bernardo *et al.* (2016) relataram obter uma concentração de ácido láctico com *L. rhamnosus* B103 igual a 143,7 g/L no bioprocesso conduzido com um pH igual a 6,2 e temperatura de 37 °C.

Din *et al.* (2022) e Alexandri *et al.* (2022) utilizaram o mesmo microrganismo, *L. coryniformis*, para produção de ácido láctico, contudo utilizaram diferentes matérias-primas, enquanto o primeiro utilizou casca de coco o segundo utilizou polpa de beterraba. A produção a partir da casca de coco foi inferior à da polpa de beterraba, 14,93 g/L e 21,7 g/L, respectivamente, contudo a mesma apresentava uma menor concentração inicial de carboidratos 19,17 g/L e 43,6 g/L, respectivamente, indicando que a maior conversão de substrato em ácido láctico foi obtida a partir da casca de coco.

Foi observado que alguns autores avaliaram o mesmo microrganismo deste estudo, *L. plantarum*. Singh *et al.* (2022) obtiveram produção máxima de ácido láctico igual a 11,08 g/L a partir de uma biomassa lignocelulósica mista. Anagnostopoulou *et al.* (2022) reportaram produção de ácido láctico igual a 23,07 g/L utilizando resíduos alimentares domésticos como matéria-prima na temperatura de 37 °C e pH igual a 6,5. Ngouénam *et al.* (2021) conseguiram 14 g/L a partir de subprodutos do abacaxi nas condições operacionais de 45 °C e com pH igual a 6,6. Desta forma, é possível constatar que o microrganismo, *L. plantarum* é um bom produtor de ácido láctico sendo capaz de utilizar diferentes matérias-primas durante o processo.

Na literatura é citado que as condições operacionais nas quais ocorrem a produção de AL depende muito do microrganismo utilizado, em geral bactérias de ácido láctico atuam em pH na faixa de 5 a 7 e temperaturas entre 30 °C e 45 °C (MUSSATTO *et al.*, 2008; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Principais condições para produção de ácido láctico por diferentes microrganismos de diferentes matérias-primas

Matéria-prima	Microrganismo	Ácido láctico isômero	Condições operacionais			Concentração máxima de ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Referência
			pH	Temperatura (°C)	Concentração inicial de carboidratos (g/L)			
Casca de coco	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> (DSM20004)	D			19,17	14,93		Din et al., 2022
Polpa de beterraba	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> (DSM 20005)	D	5	50	43,6	21,7		Alexandri et al., 2022
Espiga de milho	<i>P. acidilactici</i> XH11	D				61,9		Qiu et al., 2022
Folha de sagu	<i>L. lactis</i> IO-1	L			68	24,02		Ahmad et al., 2022

	<i>R. oryzae</i> NRRL 395	L		30		44	0,13	Rodríguez-Torres et al., 2022
Biomassa lignocelulósica mista (Mistura de palha de arroz e juta na)	<i>L. plantarum</i> LP-9					11,08		Singh et al., 2022
Resíduos alimentares domésticos	<i>L. plantarum</i> BS17 e <i>L. casei</i> BP2		6,5	37		23,07		Anagnostopoulou et al., 2022
Palha de arroz	<i>L. lactis</i> 2369			50		82,2	0,61	Sivaguruna than et al., 2022
Resíduos alimentares	<i>Lactobacillus</i> . <i>sp.</i>		5	35		70		Chenebault et al., 2022

Polpa de tâmara	<i>Bactérias nativas</i>		6			46,2		Ahmad et al., 2022
Resíduos de algodão e café	<i>K. cowanii (B2)</i>		6,5	30		28,14		EI-Sheshtawy et al., 2022
Algas marinhas	<i>L. plantarum</i>		6,8	37	10,10	66,5		Sudhakar e Dharani, 2022
Palha de trigo	<i>P. acidilactici</i>	L	5,5	42–50		107,5	2,69	Zhang et al., 2022
Resíduos sólidos municipais	<i>B. smithii</i>		5	55		5,1		Chacon et al. 2021
Subprodutos de abacaxi	<i>L. plantarum strain 408</i>		6,6	45		14	1,31	Ngouénam et al. 2021

Serragem de eucalipto	<i>C. sp</i>	L	6,5			30		Camesasca et al., 2021
Casca de laranja	<i>L. delbrueckii</i> <i>spp. delbrueckii</i>	D	5,8	40				de la Torre et al., 2019
Bagaço da cana-de-açúcar	<i>B. coagulans</i>	L	6,0	52	62,42	55,99	1,70	Oliveira et al., 2019
Espiga de milho	<i>B. coagulans</i>	L	6,0	50		79,1		Jiang et al., 2019
Borra de café gasta	<i>S. cerevisiae</i>		6,0	30		2,7		Kim et al., 2019
Resíduos da indústria de laticínios	<i>L. rhamnosus</i> B103	L	6,2	37	58,94	143,7	1,18	Bernardo et al., 2016
Farinha de milho hidrolisada	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> Y2-8	D	6,5	37		128,9	1,65	Zhao et al., 2014

Curcuma longa	<i>L. coryniformis</i> ATCC 25600	D	6,0	37		91,6	2,08	Nguyen <i>et al.</i> , 2012
Hidrolisado de alcachofra de Jerusalém	<i>Lc. lactis</i> ATCC19435	L	6,0	30		142	2,85	Shi <i>et al.</i> , 2012
Microalga verde	<i>L. paracasei</i> LA104	L	6,0	37		37,11	1,03	Nguyen <i>et al.</i> , 2012
Palha de milho	<i>L. rhamnosus</i> and <i>L. brevis</i>		5,0	37		20,95	0,58	Cui <i>et al.</i> , 2011
Espiga de milho	<i>L. brevis</i> S3F4		7,0	30	56,9	39,1	0,81	Guo <i>et al.</i> , 2010
Tubérculos de alcachofra de Jerusalém	<i>L. casei</i> G-02	L	7,0	40		141,5	4,7	Ge <i>et al.</i> , 2010
Amido de bolota hidrolisado	<i>L. rhamnosus</i> HG 09	L		42		57,61	1,6	Lu <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>L. lactis</i> IO-1		6,0	37		10,9	0,17	Laopaiboon <i>et al.</i> , 2010

2.5 Políácido láctico (PLA)

O ácido polilático, poliácido láctico ou PLA, é considerado um poliéster termoplástico alifático linear que é naturalmente biodegradável. Desta forma, é um potencial substituto dos polímeros comumente empregados na composição de plásticos não biodegradáveis ou recicláveis, como polietileno (PE), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET) e poliestireno (PS) (CARRASCO *et al.*, 2010). O PLA vem sendo estudado na literatura por ser considerado ecologicamente correto, biocompatível e biodegradável (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

O PLA é citado como um dos biopolímeros pois apresenta uma perspectiva mais favorável de ser utilizado devido as suas propriedades como elasticidade, rigidez, comportamento termoplástico, biocompatibilidade e boa capacidade de moldagem (BUSSA *et al.*, 2019). Apresentando também como características importantes como reciclabilidade, não toxicidade e compostabilidade, o que o torna um material atraente para aplicações biomédicas, medicamentosas e de química verde (VAN de VELDE e KIEKENS, 2002).

O monômero base necessário para produção desse polímero é o ácido láctico. Como já visto, este precursor pode ser produzido a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo, logo sua utilização para produção de PLA acarreta também na diminuição do descarte de resíduos no meio ambiente. Como o ácido láctico apresenta dois isômeros: L- ou -D, as proporções constituintes de cada isômero determinarão as propriedades do poliácido láctico final.

Outra vantagem observada é que o poliácido láctico é naturalmente degradado no solo, em pouco tempo, cerca de oito semanas, devido as condições em que se encontra como calor, umidade, oxigênio presente e microrganismos (SINTIM *et al.*, 2020). E devido a tais propriedades acredita-se que o poliácido láctico venha a substituir a utilização de plásticos ou embalagens de uso único ou descartáveis (YADAV *et al.*, 2021).

2.6 Processo de produção de poliácido láctico

A formação do PLA, representado como um polímero quiral que apresenta átomos de carbono assimétricos com confecção helicoidal, pode ocorrer pela condensação direta de ácidos livres ou a partir da polimerização por abertura de anel dos ésteres ácidos (CHENG *et al.*, 2009).

O processo de formação de PLA deriva de duas etapas, que são: 1) a produção de ácido láctico e 2) síntese do polímero de ácido láctico. Desta forma, a produção do polímero decorre da formação do D/L ácido láctico, pois é a partir das quantidades existentes de cada um desses isômeros na estrutura química do polímero que será possível obter um polímero com diferentes características. Assim sendo, uma das problemáticas que existem na produção do poliácido láctico depende da produção do ácido láctico, o seu precursor, haja vista que se este ácido for obtido por processo de produção química obtém-se uma mistura racêmica, o que tornar o processo de produção de PLA mais custoso devido a necessidade de uma etapa complementar de separação isomérica.

As propriedades estereoquímicas e térmicas são responsáveis por atuar diretamente nas características do poliácido láctico, como na sua cristalinidade. É observado que a estrutura do PLA muda de acordo com a porcentagem dos isômeros (D e L) que o forma, quando o PLA é composto com majoritariamente pelo isômero L (PLLA), em condições superiores a 90%, o polímero é mais cristalino. E que quando essa porcentagem decai, costuma ser amorfo, ou seja, quando a concentração do poliácido láctico formado pelo isômero D for maior que 10% ocorre a formação de um polímero amorfo. O PLA formado majoritariamente pelo isômero D, recebe a nomenclatura PDLA. Também pode ser constatado que outras propriedades como temperatura de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g) são influenciadas pela quantidade do isômero L, ou seja, quanto menor a quantidade de L-ácido láctico, menor serão essas temperaturas. Assim sendo, capacidade térmica, densidade e características mecânicas e reológicas do polímero são dependentes das temperaturas de fusão cristalina e transição vítrea e

consequentemente das quantidades dos isômeros que o formam (AURAS *et al.*, 2010).

Algumas indústrias, como o caso da *Natureworks*, têm produzido o poliácido láctico a partir da polimerização por abertura de anel do intermediário lactídeo para conseguir produzir o polímero (JAMBUNATHAN *et al.*, 2016). Entretanto, pesquisas reportam a necessidade de estudos sobre a produção de PLA, especialmente por rotas que contemplem processos sustentáveis, levando em conta que o processo convencional apresenta como desvantagens o elevado tempo de produção e a utilização de catalisadores metálicos como estanho ou zinco (PANDEY E ASWATH, 2009). A utilização de processos biotecnológicos, a partir do uso de enzimas como biocatalisadores, na produção de PLA, indicam uma redução nos custos de purificação e separação do processo, tornando-o mais limpo. Assim, esta metodologia pode reduzir o tempo de síntese do polímero de 7 para 2 dias, além de apresentar uma temperatura operacional mais baixa (30 °C) (MATSUMURA *et al.*, 1997).

Assim serão expostos os processos de produção de ácido láctico pelo método químico e biológico.

2.6.1 Processo de produção de poliácido láctico por via química

Existem três rotas de produção do poliácido láctico, a condensação por desidratação azeotrópica, a policondensação e a polimerização por abertura de anel, que podem ser utilizadas para produção de PLA a vista que essas rotas são comumente utilizadas para produção de diversos outros polímeros (HU *et al.*, 2016; SILVESTRINI e SANTANA, 2019; PACHECO e BARCELOS, 2021).

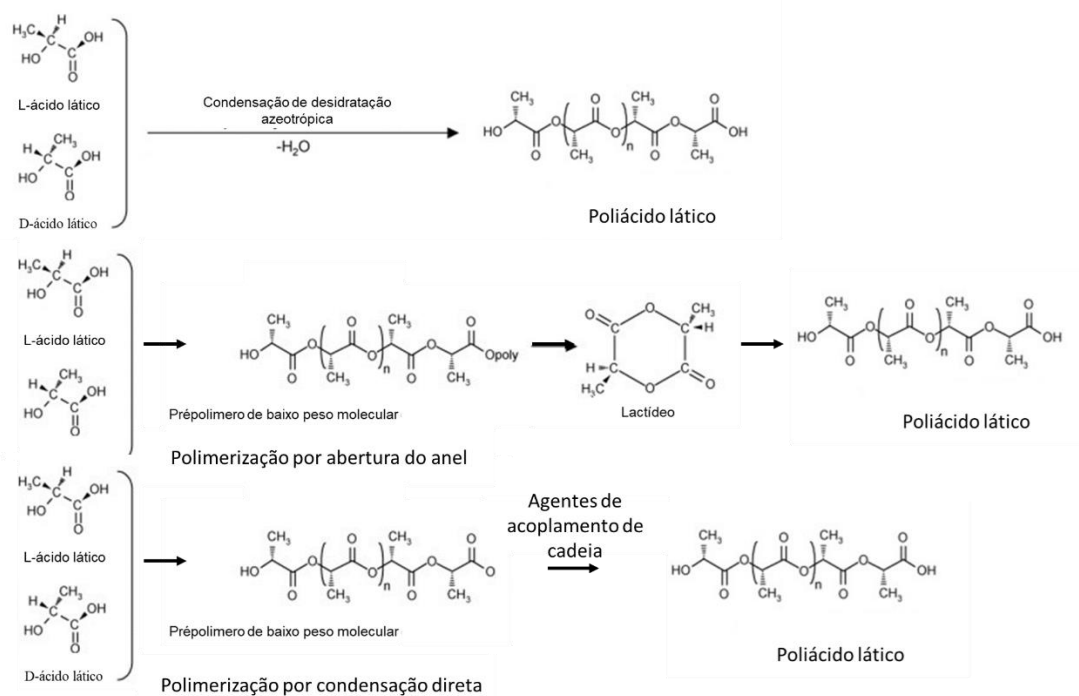
A produção de PLA que ocorre por condensação de desidratação azeotrópica proporciona dificuldades de controle operacional, altos custos e um produto com propriedades mecânicas ruins acabam inviabilizando esse método. Durante essa produção ocorre a remoção água e é formado o poliácido láctico (SILVESTRINI e SANTANA, 2019).

O método de formação de PLA considerado mais tradicional é a partir da polimerização do lactídeo, que é produzido quando ocorre a despolimerização do pré-polímero de baixo peso molecular oriundo da condensação do D/L ácido láctico (YOO *et al.*, 2005; SILVESTRINI e SANTANA, 2019; PACHECO e BARCELOS, 2021). É formado então um polímero de alto peso molecular, a polimerização deve ser realizada em duas etapas, na qual inicialmente ocorre a formação do dímero lactídeo e em seguida a polimerização por abertura do anel. Contudo, pode ocorrer a limitação pela reação de equilíbrio de policondensação proporcionado pela hidrólise das ligações éster. Também podem ocorrer transesterificações que se originam a partir da formação das estruturas em anel como o lactídeo. Todavia essas reações são consideradas reações colaterais e acabam gerando características indesejáveis ao polímero final.

Existe também a possibilidade de ocorrer a produção do polímero a partir da polimerização por condensação direta no qual é formado um pré-polímero de baixo peso molecular (devido à alta viscosidade e a presença de água no meio) e em seguida após a adição de agentes de acoplamento de cadeia ocorre a formação de um polímero de alto peso molecular. Durante essa produção ocorre a reação entre os grupos hidroxila e ácido carboxílico do ácido láctico, que remove água e é formado o poliácido láctico (SILVESTRINI e SANTANA, 2019). Ou seja, a policondensação direta envolve a esterificação dos monômeros, o que só é possível porque os grupos OH e COOH estão presentes na estrutura química do ácido láctico (PACHECO e BARCELOS, 2021).

Na Figura 3 é apresentada esquemas da produção de PLA pelas três rotas possíveis: condensação de desidratação azeotrópica abertura do anel do lactídeo e polimerização por condensação direta.

Figura 3 – Rotas de produção do polímero de ácido láctico (PLA)



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

Desta forma, observando as reações de polimerização é possível observar que sempre irá ocorrer a formação de subprodutos, porém a mesma pode ser controlada com a utilização de diferentes catalisadores (MEHTA *et al.*, 2005). Na literatura são apresentados alguns estudos com o uso de catalisadores como, por exemplo, Singh *et al.* (2018) utilizaram $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para produzir PLA por policondensação direta e Hong *et al.* (2012) utilizaram óxido de zinco durante o processo.

Hu *et al.* (2016) cita que no ano de 1932, Carothers propôs um novo método de polimerização que consistia na abertura do anel. Por esse princípio, inicialmente ocorre a formação de um oligômero de baixo peso molecular. Em seguida é, usando um catalisador, despolimerizado por transesterificação interna em lactato e por fim ocorre a abertura do anel para ocorrer a formação do polímero de ácido láctico com alto peso molecular (GUO *et al.*, 2018). Pelo método de abertura do anel pode-se produzir um polímero com alto peso molecular, o mais utilizado nos dias de hoje pelas indústrias.

Esse processo utiliza catalisadores de metais pesados, como estanho e, por ser um metal pesado, a *Food and Drug Administration* (FDA) limitou a 20 ppm a quantidade de estanho residual em polímeros médicos comumente utilizados. Mesmo que tenham sido estudados diversos métodos para reduzir a quantidade de catalisador utilizado, ainda não se determinou um que fosse considerado viável (SINGH *et al.*, 2018).

A literatura reporta alguns estudos que foram realizados visando aperfeiçoar o método químico. Pandey e Aswath (2009) pesquisaram sobre a utilização de micro-ondas na polimerização de ácido lático com e sem a utilização de catalisadores de estanho. Esses autores observaram que a utilização do catalisador colabora com a etapa de polimerização, contudo não é indispensável para que ocorra a polimerização utilizando micro-ondas. De acordo com os autores, foi possível obter um polímero de alto peso molecular com um menor tempo de reação destacando assim que a utilização de micro-ondas pode ser uma alternativa mais rápida para se produzir esse polímero.

Outro empecilho relacionado à produção do polímero é o longo tempo de cristalização, necessidade de altas temperaturas, e longos ciclos de processamento (YUEAGYEN *et al.*, 2017). Para contornar o problema, são comumente empregados agentes nucleantes inorgânicos que, além de diminuir o tempo, possibilitam um incremento positivo nas características do poliácido lático como mica, montmorilonita, nanotubo de carbono ou substâncias orgânicas, como N,N-etilenobis (estearamida); N,N-etilenobis (12-hidroxiestearamida) ou ftalimida (SHI *et al.*, 2015). A utilização desses compostos apresenta como lado positivo um aumento na rigidez do PLA, porém afeta negativamente a sua ductilidade atribuído a adição de substâncias orgânicas.

2.6.2 Processo de produção de poliácido lático por via biotecnológica

Com o intuito de se estabelecer alternativas para a produção química do polímero, vem sendo realizados estudos relacionados a produção de PLA por rotas biotecnológicas, sem a adição de catalisadores a base de metais pesados. Essa

nova abordagem sugere a utilização de enzimas como catalisadores da reação de polimerização, que atuam na reação de abertura do anel aromático (YADAV *et al.*, 2021). Nesse contexto, as lipases podem ser avaliadas em relação ao seu potencial para esse tipo de reação, como a lipase B de *Candida Antarctica*, lipase AYS de *Candida rugosa*, lipase M de *Mujor javanicus* e lipase PA de *Pseudomonas aeruginosa* (LIU *et al.*, 2020).

A utilização de enzimas, sejam elas imobilizadas ou livres, no processo de produção de PLA proporciona diversas vantagens, como a não utilização de metais pesados, evitando a ocorrência de resíduos tóxicos no produto de interesse, utilizando condições mais amenas no processo e tornando as reações mais seletivas (YADAV *et al.*, 2021; JEON *et al.*, 2013).

A produção de PLA utilizando enzimas como biocatalisadores ocorre em condições mais brandas de temperatura, cerca de 25 °C e 30 °C e o tempo de reação pode durar desde 2 horas até 48 horas de acordo com as condições do processo (MATSUMURA *et al.*, 1997; JEON *et al.*, 2013). Jeon *et al.* (2013) avaliaram a produção de poliácido láctico a partir do lactídeo avaliando a utilização de diversas lipases como lipase A de *Candida antarctica*, lipase B de *Candida antarctica*, lipase de *Canida rugosa*, lipase de *Rhizomucor miehei*, entre outras em condições brandas de 25 °C, contudo apenas a lipase B de *Candida antarctica* foi capaz de produzir o polímero de ácido láctico. Já Yadav *et al.* (2021) estudaram a produção do poliácido láctico por 30 horas de reação também utilizando lipase como biocatalisador na condição de 40 °C.

Todavia, os dados na literatura são escassos quando relacionados a produção de PLA por via enzimática pois boa parte dessas informações são segredos industriais relacionados a patentes.

2.7 Aspectos econômicos e ambientais

O ácido láctico é utilizado para produção do polímero de ácido láctico (PLA), que representa mais de 35% do comércio dos bioplásticos, possui propriedades ecológicas interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade,

elasticidade, entre outras (RAMOT *et al.*, 2016; DJUKIĆ-VUKOVIĆ *et al.*, 2013) e também é uma matéria-prima biodegradável que pode ser obtido a partir de matérias-primas renováveis (AMR, 2015).

Em 2021 foram produzidos cerca de 1,39 milhões de toneladas de ácido láctico e espera-se que em 2029 essa produção atinja valores de 2,65 milhões de toneladas apresentando um crescimento de 6,21% a/a o que equivale, aproximadamente, a um total de 1,3 bilhões de dólares no ano de 2021, tendo em vista que o preço do ácido láctico gira em torno de 1,30 a 2,30 dólares por kg e tal valor vai depender da sua utilização e do preço das suas matérias-primas utilizadas (BIDDY *et al.*, 2016; STATISTA, 2023). Sites como Alibaba relatam que o preço do ácido láctico manteve valores similares aos estudos realizados por Biddy *et al.*, (2016) com o preço do kg variando entre 1 e 2 dólares (ALIBABA, 2022).

Juntamente com o aumento das produções e receitas do ácido láctico está também a do PLA, no qual espera-se para 2028 um total de 1,82 bilhões de dólares, em 2020 o valor total foi igual a 525 milhões de dólares (STATISTA, 2023). Um dos fatores que impulsionam o consumo de produtos verdes como o PLA é a preferência por embalagens economicamente corretas fazendo assim com que cada vez mais as empresas utilizem produtos biodegradáveis. Esses produtos também são conhecidos como embalagens sustentáveis e as principais características desse tipo de produto são ser feito a partir de um material orgânico ou reciclado ou biodegradável, ser produzido a partir de recursos naturais e gerar o menor impacto ambiental após ser descartado. Hoje em dia, o PLA se apresenta como um dos plásticos biodegradáveis mais vantajosos (GROSS, 2002), pois ele proporciona tanto resistência química, quanto resistência ao calor (TANAKA *et al.*, 2006; CASTRO-AGUIRRE *et al.*, 2016), podendo ser utilizado para confecção de embalagens e utensílios plásticos substituindo assim os plásticos utilizados obtidos a partir do petróleo (DATTA *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2015).

A busca por matéria-prima que reduza o custo do ácido láctico e o desenvolvimento por processos mais sustentáveis é importante para atender a demanda do PLA e torna-lo mais atrativo, desta forma esse trabalho visa estudar condições que proporcionem uma produção de ácido láctico a partir de um resíduo

agroindustrial, o bagaço de caju, visando diminuir os custos com matéria-prima e também conseguir produzir o PLA por uma rota mais verde ao utilizar enzimas como biocatalisadores ao invés dos catalisadores metálicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bagaço de caju

O Bagaço de caju (BC), gentilmente fornecido pela Empresa Brasileira de Bebidas e Alimentos S/A (EBBA), foi utilizado como matéria-prima para produção de ácido láctico. O BC foi lavado três vezes com água e prensado para ocorrer a retirada da água. Em seguida o bagaço de caju foi seco em estufa Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 60 °C durante 24 h. Posteriormente, o bagaço foi triturado, em moinho de bolas, e peneirado, para ocorrer à padronização do tamanho, no qual selecionou-se partículas que ficaram retida nas peneiras de 20-80 Mesh (0,25-0,84 mm de diâmetro). Após essas etapas, o material padronizado foi armazenado a temperatura ambiente (25 °C) até ser utilizado.

3.2 Caracterização do bagaço de caju

A caracterização do BC foi realizada para se determinar as quantidades percentuais de celulose, hemicelulose e lignina presente na biomassa e na fração sólida obtida após o tratamento ácido. Para a caracterização utilizou-se a metodologia proposta por Gouveia *et al.* (2009) e os protocolos da NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) NREL/TP-510-4620 (HAMES *et al.*, 2008). A quantidade de extraíveis (ceras e gorduras), sólidos totais e cinzas foi determinada de acordo com os seguintes protocolos, respectivamente: NREL/TP-510-42619 (SLUITER *et al.*, 2008a) e NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b). Para a determinação dos carboidratos e lignina foi usado o protocolo NREL/TP-510-42618 (SLUITER *et al.*, 2008c)

3.3 Hidrólise ácida do bagaço de caju

A hidrólise ácida branda no bagaço de caju foi conduzida de acordo com metodologia proposta por Rocha (2010) e Albuquerque (2014). Na hidrólise usou-

se uma solução de ácido sulfúrico 0,6 mol/L e uma proporção de 20% (m/v) de bagaço de caju sendo o processo conduzido em autoclave nas condições de 121 °C por 30 min. Após isso, ocorreu a separação das fases líquida e sólida por filtração à vácuo.

O hidrolisado teve pH ajustado, numa etapa de detoxificação, com o intuito de eliminar possíveis interferentes do processo fermentativo. Para tanto, o pH foi elevado para 10,0 utilizando-se hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (MARQUES e ROCHA, 2021), e então ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi adicionado para atingir $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$ sendo o adequado para a produção de ácido láctico. O precipitado formado após o processo de detoxificação foi separado por filtração visando utilizar apenas a fase líquida sobrenadante (nomeado de HBC) para produção de ácido láctico.

3.4 Microrganismo

Nesse estudo, para a produção de ácido láctico a partir do hidrolisado do bagaço de caju, foram usados microrganismos da espécie *Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum* LAB07 e *L. plantarum* LAB14. Estas linhagens de bactérias foram isoladas a partir do queijo artesanal e molho de pimenta, respectivamente, oriundas do mercado local de Fortaleza (Ceará, Brasil), pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As cepas foram armazenadas a -80 °C em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS, MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) com 20% de glicerol (v/v) (XIMENES *et al.*, 2019). As cepas utilizadas nesse estudo estão com sua sequência genética depositada no GenBank, apresentando código de acesso FJ05311 para *L. plantarum* LAB07 e FJ05315 para *L. plantarum* LAB14.

3.5 Preparação de inóculo

Para preparo do inóculo, realizou-se a ativação das bactérias em meio ágar MRS que continha 20 g/L glicose, 10 g/L peptona, 10 g/L extrato de carne, 5 g/L extrato de levedura, 1 g/L polisorbato 80 tween, 2 g/L citrato de amônio, 5 g/L

acetato de sódio, 0,10 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês, 2 g/L fosfato de potássio dibásico a pH $6,0 \pm 0,2$, e incubou-se a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Em seguida, realizou-se a ativação, transferindo-se três alçadas de colônia para 50 mL de meio do inóculo MRS. A cultura foi incubada em agitador orbital a 37 °C, 180 rpm por 24 h. Em seguida, foi medida a concentração celular a partir da absorbância (utilizando-se o comprimento de onda de 600 nm) em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S22) e calculou-se a concentração celular a partir das curvas padrões em base de massa seca.

3.6 Produção de ácido láctico em agitador orbital

O hidrolisado do bagaço de caju, ajustado para o pH de 6,0, foi utilizado como meio de cultivo para a produção de AL e antes do processo ele foi esterilizado em autoclave nas condições de 110 °C por 10 minutos. A produção ocorreu em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio, incubados em um agitador orbital (Tecnal – TE 422, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a diferentes temperatura, 150 rpm por 72 h. Amostras foram retiradas em tempos pré definidos (0, 4, 8, 12, 24, 30 48, 54, 72 horas) para quantificar a biomassa e determinar o consumo de açúcares e formação de ácido láctico. Para determinar as melhores condições de produção de ácido láctico, avaliou-se inicialmente a melhor fase de crescimento do microrganismo para inocular o meio de produção, sendo obtido em diferentes tempos de preparação do inóculo (16 h, 20 h e 24 h) e o bioprocesso conduzido a diferentes temperaturas (30 °C, 37 °C e 45 °C) e rotação (100 rpm, 150 rpm, 200 rpm) e a suplementação do hidrolisado do bagaço de caju com fonte de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio e ureia). A concentração de inóculo no início da reação foi de 10% (v/v). Todos os bioprocessos foram realizados em triplicata e foram retiradas amostras em tempos pré-determinados para determinar o consumo de carboidratos, formação de ácido láctico e o crescimento celular.

Após a produção do bioproduto, as células foram separadas do caldo fermentado por centrifugação nas condições de 4500 rpm, 4 °C por 20 minutos. Em

seguida, a fase líquida foi estocada em freezer na temperatura de -20 °C para experimentos posteriores.

Os parâmetros avaliados nos ensaios de produção de ácido láctico são melhores descritos nos subtópicos 3.6.1 a 3.6.4. Também foram avaliados os parâmetros dos processos como produtividade volumétrica (Q_P), as conversões do açúcar consumido em ácido láctico ($Y_{P/S}$), de substrato consumido em biomassa ($Y_{X/S}$) e de ácido láctico em biomassa ($Y_{P/X}$) e o consumo de glicose (S). Tais parâmetros estão melhores descritos no tópico 3.8.

3.6.1 Ensaio para determinação do tempo de crescimento do inóculo

Com o intuito de se determinar qual a melhor fase de crescimento do microrganismo a ser inoculado no meio de produção do AL, avaliou-se tempo de preparação inóculo para cada microrganismo, sendo investigados três diferentes tempos (16 h, 20 h e 24 h). Para este estudo, a produção de AL foi conduzida a 37 °C e sob agitação orbital de 150 rpm por 72 h.

3.6.2 Ensaio para determinação da temperatura ótima

Após determinar qual a melhor fase de crescimento do microrganismo a ser inoculado, avaliou-se qual a melhor temperatura (25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C) para produção de ácido láctico. Os ensaios foram conduzidos em agitador orbital sob a 150 rpm por 72 horas e usando o inóculo obtido no tempo selecionado na etapa anterior.

3.6.3 Ensaio para determinação da rotação ótima

Posteriormente, realizou-se o estudo para verificar a melhor rotação a ser aplicada na produção de AL. As rotações investigadas foram 100 rpm, 150 rpm e 200 rpm e os ensaios foram conduzidos em agitador orbital por 72 horas na melhor temperatura e usando o inóculo obtido no melhor tempo para cada microrganismo.

3.6.4 Ensaio para determinação da melhor fonte de nitrogênio

Em seguida, determinou-se qual melhor fonte de nitrogênio a ser suplementada no hidrolisado do bagaço de caju: extrato de levedura, sulfato de amônio e ureia, para cada microrganismo estudado na produção de AL. Para tanto foram adicionados 5 g/L da fonte de nitrogênio e os experimentos foram conduzidos em agitador orbital por 72 h sob as melhores condições de temperatura e rotação e usando o inóculo selecionado para cada microrganismo.

Após a realização da produção com diferentes fontes de nitrogênio realizou-se um cálculo para determinar se a adição da fonte de nitrogênio estudada impactava positivamente na produção de ácido láctico. Desta forma foram calculados os custos para produção do meio padrão, meio com extrato de levedura, meio com sulfato de amônio e meio com ureia, considerando no meio padrão as quantidades utilizadas de ácido sulfúrico e hidróxido de cálcio. Todos os valores dos insumos foram obtidos a partir do site www.alibaba.com.

O custo para cada fonte de nitrogênio foi calculado de acordo com a quantidade de cada componente e seu valor no mercado e está exemplificado na Equação 1. Na qual foi considerada a quantidade utilizada para 1 L de meio de cultivo.

$$Custo = \sum_{i=1}^n C_i P_i \quad (1)$$

No qual custo é o valor do meio de cultivo exposto em dólar por litro (US\$/L), C_i é a concentração do componente i no meio de cultivo em quilogramas por litro (kg/L) e P_i é o preço do componente i em dólar por quilograma (US\$/kg).

O custo da produção de ácido láctico (CPAL) foi calculado a partir da relação do custo com a produção de ácido láctico, de acordo com a Equação 2.

$$Custo \text{ da produção de ácido láctico (CPAL)} = \frac{Custo}{Produção \text{ de ácido láctico}} \quad (2)$$

No qual CPAL é o valor do custo de produção de ácido láctico em (US\$/g/L), custo é o valor do meio de cultivo calculado na Equação (1) em (US\$/L) e produção de ácido láctico é o valor da produção de ácido láctico naquele meio em (g/L).

3.7 Ensaio de produção de ácido láctico em biorreator

Após a realização dos ensaios em agitador orbital, no qual foram obtidas as melhores condições de fase de crescimento do microrganismo inoculado (tempo de inóculo), temperatura, rotação e fonte de nitrogênio, foi realizada a produção em biorreator de bancada. O biorreator utilizado foi do modelo New Brunswick Bioflo Celligen 115, Eppendorf, que apresenta um volume de 1 L e um volume útil de 800 mL. Durante a bioprodução, avaliou-se também o controle do pH, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) a 5 mol/L. Todos os experimentos ocorreram em triplicata e foram coletadas amostras para quantificar o consumo de carboidratos, a formação dos produtos e a concentração celular no decorrer das 72 horas de reação.

3.8 Parâmetros cinéticos do processo de produção de ácido láctico

A produtividade volumétrica de ácido láctico (Q_p , g/L.h) foi calculada de acordo com a relação entre a produção máxima de ácido láctico ($P_{máx}$, g/L) e o tempo (t , h) em que a mesma foi obtida, de acordo com a Equação 3.

$$Q_p = \frac{P_{máx}}{t} \quad (3)$$

As conversões do açúcar consumido em ácido láctico ($Y_{P/S}$), de substrato consumido em biomassa ($Y_{X/S}$) e de ácido láctico em biomassa ($Y_{P/X}$) foram determinadas de acordo com as Equações 4, 5 e 6, respectivamente, nas quais P_0 e P_f representam as concentrações iniciais e finais de ácido láctico, respectivamente; S_0 e S_f representam as concentrações iniciais e finais de ácido láctico e de glicose, respectivamente; X_0 e X_f as concentrações iniciais e finais de biomassa, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{(S_0 - S_f)} \quad (4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (5)$$

$$Y_{P/X} = \frac{(P_f - P_0)}{(X_f - X_0)} \quad (6)$$

Também, calculou-se o quanto de glicose foi consumido de acordo com a Equação 7.

$$S (\%) = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad (7)$$

3.9 Concentração, extração e separação de ácido láctico

Após a produção de ácido láctico, as células foram separadas do meio por centrifugação a 4500 rpm, 4 °C por 20 minutos. A fase líquida foi estocada para em seguida dar início aos processos de concentração, extração e separação de ácido láctico. Contudo, antes de realizar os estudos de concentração, extração e separação do ácido láctico, foi conduzido um processo de clarificação do meio fermentado para a remoção da cor visando obter um líquido que seja mais claro, pois o hidrolisado do bagaço de caju proporciona ao meio uma cor bastante escura, para tanto adicionou-se carbono ativado NORIT com granulometria de 0,425 mm a 1,7 mm, na proporção de 3% (m/v). Os experimentos foram conduzidos em agitador orbital nas condições de 200 rpm, 30 °C por 2 horas, e em seguida o carbono ativado foi separado por filtração à vácuo.

Após, o meio fermentado e clarificado é concentrado usando um evaporador rotativo (Quimis, Q344B) acoplado a um banho termostaticado (Tecnal, TE-2005). O procedimento ocorre sob condições de baixas pressões, temperaturas e rotações (-600 mmHg, 50 °C e 30 rpm).

Para extração de ácido láctico, avaliou-se diferentes solventes no processo de extração líquido-líquido usando uma proporção de 1:3 hidrolisado: solvente

orgânico. Foram usados os seguintes solventes: 1-butanol, 1-octanol, clorofórmio, hexano e tolueno, seguindo a metodologia proposta por KUMAR *et al.*, (2020). Nesse processo, foram adicionados 5 g de sulfato de amônio (NH_4SO_4) a 10 mL do hidrolisado sob agitação para promover total dissolução, em seguida adicionou-se 30 mL de solvente e essa mistura foi levada para um agitador orbital nas condições de 200 rpm, 30 °C e 2 horas. A seguir, a mistura foi levada para um funil de separação e deixada em repouso até as fases se separarem completamente. Após o processo de separação, foram retiradas amostras para determinar a quantidade de ácido láctico, em ambas as fases, por meio de análise de HPLC.

No processo de quantificar o ácido láctico obtido e a eficiência do processo de separação, cada uma das fases foi centrifugada nas condições de 10000 rpm por 10 minutos e a amostra filtrada antes de ser analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). A metodologia da análise está descrita no Tópico 3.12

3.10 Determinação do poder rotatório específico

Para determinação da isomeria do ácido láctico produzido, Levógiro (L) ou Dextrógiro (D), realizou-se a determinação do poder rotatório específico que ocorreu com a utilização de um polarímetro da marca Polax. Os ensaios foram realizados na temperatura ambiente (25 °C) e utilizou-se uma cubeta de quartzo com 10 cm de percurso óptico. Durante o ensaio foi possível determinar o grau de rotação da luz polarizada e assim definir qual foi o isômero na amostra.

3.11 Produção de poliácido láctico (PLA)

Para os ensaios de produção do poliácido láctico (PLA), foi utilizado o biocatalisador enzimático, lipase B de *Candida antarctica* (CALB), adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). O extrato comercial de CALB apresentou atividade igual a 312,1 U/mL. Durante a produção de PLA foram usados 300 mg de catalisador, 0,3 mmol de ácido láctico produzido, bem como 300 mg de

peneira molecular 5A e 10 mL de diferentes solventes (hexano ou tolueno). As reações ocorreram em agitador orbital a 150 rpm, 25 °C por 2 horas. Após catálise, ocorreu a remoção da peneira molecular por filtração e a amostra foi analisada para determinar a produção de poliácido láctico por meio da técnica de RMN (JEON *et al.*, 2013).

As amostras obtidas na síntese do poliácido láctico (PLA) foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H . As amostras foram solubilizadas em 500 μL de dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO- d_6 , Cambridge Isotope Laboratories) e condicionadas em tubos de 5 mm (Wilmad) e as análises foram conduzidas no equipamento Bruker (Avance DRX 500).

Os espectros obtidos foram processados utilizando o programa VNMRJ TM 4.0 e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados através do sinal do resíduo não deuterado do solvente 2,50 (^1H).

3.12 Métodos analíticos

3.12.1 Determinação da concentração celular

Para se determinar o crescimento microbiano, utilizou-se a turbidez por densidade ótica determinada no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S22). Para tanto fez-se necessário uma curva de calibração em função da concentração celular e da densidade ótica.

Para construção da curva de crescimento, inicialmente os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo o meio MRS, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 15 min, em agitador orbital a 37 °C e 180 rpm por 24 horas. Em seguida, foram repicados em ágar MRS para isolamento de colônias, que após o crescimento celular, foram transferidas para 100 mL de meio MRS e mantido sob agitação por 26 horas a 37 °C e 180 rpm.

Posteriormente, centrifugou-se o meio de cultura a 4500 rpm por 10 min e a massa de células precipitada foi lavada utilizando-se água destilada estéril. Em seguida, centrifugou-se novamente por 10 min a 4500 rpm, sendo este processo

repetido três vezes com o intuito de conseguir retirar todo o meio de cultura impregnado nas células.

Em seguida, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril à massa de células e homogeneizou-se para obter a suspensão estoque. Em seguida, retirou-se 2 mL e adicionou-se em cadinhos previamente tarados e incubou-se em estufa nas condições de 100 °C por 24 h e após pesado até peso constante, tal procedimento foi realizado em triplicata. Com essa massa seca obtida determinou-se a concentração da suspensão. Por fim, realizou-se diluições a partir da suspensão e elaborou-se um gráfico determinando-se a relação entre a massa seca (g/L) e a absorbância a 600 nm. Este procedimento, também foi realizado determinando o número de células viáveis na suspensão e a correlação com a absorbância. Com estas curvas, foi possível determinar a massa seca e o número de células viáveis em todos os bioprocessos realizados. As células viáveis foram determinadas a partir da adição de 0,1 mL de inoculo com 0,3 mL de azul de metileno e a contagem foi realizada em microscópio (Olympus) utilizando a câmara de Neubauer. Como o tamanho das células dos microrganismos dificultava a visualização utilizou-se lentes objetivas com aumento de 40 e 100 vezes e o número de células por mL foi obtido de acordo com a Equação 8.

$$N^{\circ} \text{ de células por mL} = \frac{(N^{\circ} \text{ total de células})}{(N^{\circ} \text{ de células por quadrante})} * \text{fator de diluição} * 10000 \quad (8)$$

Na qual o fator de diluição representa em quantas vezes a amostra foi diluída e o 10000 está relacionado com o volume da câmara de Neubauer.

Durante a realização dos bioprocessos eram coletadas amostras, medida a absorbância no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro e a concentração celular determinada utilizando as curvas padrões realizadas.

3.12.2 Determinação do substrato e do produto

A concentração dos açúcares (glicose e xilose) obtidos das análises de caracterização da composição do bagaço de caju (celulose, hemicelulose e lignina)

e que compõem o meio de cultura utilizado na bioprodução, dos ácidos e compostos furfurados obtidos na análise de caracterização do bagaço de caju e a concentração do ácido láctico proveniente do processo microbiano foram medidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um sistema Thermo Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com um detector de índice de refração e com uma coluna Supelco 610 H. A solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 0,1% v/v preparada com Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizada como fase móvel com vazão de 0,5 mL/min e a análise conduzida a 30 °C. O volume de injeção das amostras foi padronizado em 20 μ L e os picos foram comparados com o tempo de retenção dos padrões previamente definidos dos constituintes de interesse identificados.

3.13 Análises estatísticas

Determinou-se os parâmetros estáticos dos dados oriundos dos processos microbianos a partir dos testes de Análise de Variância (ANOVA) usando um intervalo de confiança igual a 95%, ou seja, $p < 0,05$. Realizou-se também análises como o Teste de *Tukey* para avaliar as diferenças significativas entre os parâmetros analisados (tempo de inóculo, temperatura, rotação, fonte de nitrogênio e produção em biorreator), com o intuito de obter valores necessários para orientar de maneira estatística o estudo. Essas análises foram realizadas utilizando os programas ORIGIN 9.0, Excel 2013 e Minitab 17.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do bagaço e hidrolisado de caju

Inicialmente analisou-se a composição química do bagaço de caju, matéria-prima utilizada para produção de ácido láctico, determinando as quantidades dos principais componentes que compõem tal matriz lignocelulósica.

A composição do bagaço de caju, antes e após o pré-tratamento, está apresentada na Tabela 4. O bagaço de caju apresentou em sua composição $19,7 \pm 0,1\%$ m/m de celulose, $19,2 \pm 0,2\%$ m/m de hemicelulose, $33,4 \pm 1,7\%$ m/m de lignina total, $6,4 \pm 0,2\%$ m/m de extraíveis e $1,5 \pm 0,0\%$ m/m de cinzas. Essa composição está de acordo com outros estudos do grupo de pesquisa, nos quais foram feitas também a caracterização do bagaço de caju. Correia et al., (2022) obtiveram na composição de celulose, hemicelulose e lignina iguais a 20,91%, 10,17% e 35,26%, respectivamente (CORREIA *et al.*,2022). Rocha et al., (2010) obtiveram 20,54%, 16,33%, 33,62%, de celulose, hemicelulose e lignina (ROCHA et al., 2010) ao utilizar bagaço de caju para produção de outros bioprodutos.

Tabela 4 - Caracterização química percentual do bagaço de caju antes e após a hidrólise com H_2SO_4 0,6 mol/L e quantidade mássica recuperada de cada componente partindo de 100 g de bagaço de caju (valores apresentados entre parênteses).

Bagaço de Caju	Massa (g)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extraíveis (%)	Cinzas (%)
Antes da hidrólise	100	$19,7 \pm 0,1$ (19,7 g)	$19,2 \pm 0,2$ (19,2 g)	$33,4 \pm 1,7$ (33,4 g)	$6,4 \pm 0,2$ (6,4 g)	$1,5 \pm 0,0$ (1,5 g)
Depois da hidrólise	58,1	$19,3 \pm 0,1$ (10,8 g)	$4,5 \pm 0,0$ (2,5 g)	$54,8 \pm 0,1$ (30,8 g)	$22,5 \pm 0,2$ (12,7 g)	$2,3 \pm 0,0$ (1,3 g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento realizado com H_2SO_4 foi capaz de solubilizar 89% de hemicelulose (Tabela 4), o que potencializa a produção de pentoses, como xilose e

arabinose, e dissacarídeos que dão origem à glicose, favorecendo os bioprocessos envolvidos (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Durante a hidrólise ácida branda do bagaço de caju com ácido sulfúrico 0,6 mol/L foi constatada uma diminuição da massa de bagaço seco, como é mostrado na Tabela 4. Partindo-se inicialmente de 100 g do bagaço de caju, obteve-se 58,1 g de bagaço após a hidrólise. Essa diminuição da massa acontece devido ao processo de hidrólise das ligações presentes nas moléculas de celulose e hemicelulose, resultado em carboidratos como, por exemplo, glicose e xilose, que são solubilizados na solução. Foi apontada também a diminuição do volume de solução, pois partindo-se de um volume base igual a 500 mL chegou-se ao final do processo a um volume de 342,5 mL que ocorre devido a evaporação da solução durante o processo de hidrólise e a perda de volume durante o processo de separação da fração sólida e líquida.

Em relação a celulose e hemicelulose, é possível observar um decréscimo das suas massas em torno de 8,9 g e 16,7 g, respectivamente. Para lignina e cinzas foi observado uma baixa diminuição igual a 2,6 g e 0,2 g, respectivamente, e os extraíveis apresentaram um aumento da sua massa de 6,3 g. Essa mudança ocorre devido a degradação de parte da matriz lignocelulósica durante a hidrólise ácida branda, liberando compostos no meio. Esses compostos são açúcares oriundos dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e compostos fenólicos e outros compostos da lignina. Ao ocorrer a degradação da matriz lignocelulósica, a mesma se torna mais fácil de ser extraída pela utilização de solventes, no caso etanol, como foi observado o aumento na quantidade de extraíveis. Esses resultados estão condizentes com outros estudos da literatura que relatam comportamento similares após realização de hidrólise ácida em uma biomassa lignocelulósica (KUMAR *et al.*, 2018; JÖNSSON e MARTÍN, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

A diminuição da massa da hemicelulose decorre da atuação do ácido sulfúrico na molécula, pois esse tipo de pré-tratamento é capaz de degradar facilmente esta molécula, que representa um composto com baixo peso molecular na forma de um heteropolímero amorfo. O agente causador do ataque a biomassa, e liberação dos açúcares, são os íons H_3O^+ , que agem no interior da mesma para

ocorrer a hidrólise, e quanto maior a porcentagem de sólido, menor é a eficácia. Assim, deve existir um equilíbrio entre a quantidade de biomassa e a quantidade de solução ácida para conseguir concentrações adequadas de íons H_3O^+ para realizar uma hidrólise efetiva (ROCHA *et al.*, 2014).

Já a celulose, por exemplo, é um homopolímero cristalino de alto peso molecular sendo mais difícil de ser degradada a partir da hidrólise ácida. A lignina também foi um pouco degradada, e isso pode também ser percebido devido a detecção de alguns compostos presentes no meio hidrolisado que são oriundos da lignina, como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, que podem ser inibidores para alguns microrganismos. Os teores de lignina, extraíveis e cinzas, expostos na Tabela 4, apresentaram aumento de 64,2%, 251,6% e 53,3%, respectivamente. Esse resultado também indica a possibilidade de utilização do bagaço de caju após pré-tratamento para obtenção de lignina, que nos últimos anos tem atraído mais atenção devido ao seu potencial de aplicação em diversos setores, como alimentício, cosmético, farmacêutico, químico e têxtil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2019; SERPA *et al.*, 2020; SERPA *et al.*, 2021).

O aumento da quantidade de extraíveis é observado pois tal etapa de extração ocorre a partir da utilização de etanol e após a hidrólise ácida foi constatada que devido a modificação na estrutura do material, os compostos solúveis em etanol se tornaram mais suscetíveis a extração com esse solvente. E em relação a porcentagem, ao diminui-se uma fração, para manter o todo, outra fração (em porcentagem) pode aumentar. Por fim, não foi observada uma grande variação da massa das cinzas.

O hidrolisado ácido obtido continha glicose e xilose nas concentrações de $39,9 \pm 3,6$ g/L e $28,0 \pm 2,5$ g/L, respectivamente. Parte dessa glicose é oriunda da hemicelulose, composta de pentoses, hexoses e ácidos urônicos, a outra parte, por volta de 18,9 g/L, é obtida a partir da hidrólise da celulose, a qual teve sua massa reduzida em torno de 8,5 g após a hidrólise com ácido sulfúrico.

Nesse estudo foi observado que o hidrolisado do bagaço de caju, antes do tratamento com hidróxido de cálcio para ajuste de pH, proporcionou a formação de 2,05 g/L de ácido acético e 0,07 g/L de ácido fórmico, valores próximos aos

relatados por Albuquerque *et al.* (2015), que quantificaram 1,79 g/L de ácido acético e 0,08 g/L de ácido fórmico na hidrólise do bagaço de caju utilizando ácido diluído. Após o ajuste de pH, foi observada a diminuição da concentração de ácido acético e ácido fórmico para 1,95 g/L e 0,05 g/L, respectivamente. Tal redução ocorreu devido ao processo de ajuste de pH ser também um processo de desintoxicação, pois ao adicionar a base, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ocorre uma reação ácido-base, diminuindo assim a quantidade de tais ácidos, formando um precipitado. Segundo dados da literatura, durante a etapa de hidrólise ocorre a liberação de substâncias que podem influenciar o metabolismo celular (ALVES-FERREIRA *et al.*, 2022), sendo as mais reportadas ácido acético, ácido fórmico, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos. Contudo, normalmente são realizados processos de desintoxicação antes do bioprocessamento como o hidróxido de cálcio que além de ajustar o pH proporciona também a detoxificação do meio, já a utilização de carbono ativado que além de remover tais compostos também ocasiona na clarificação do meio (ARMINDA *et al.*, 2021).

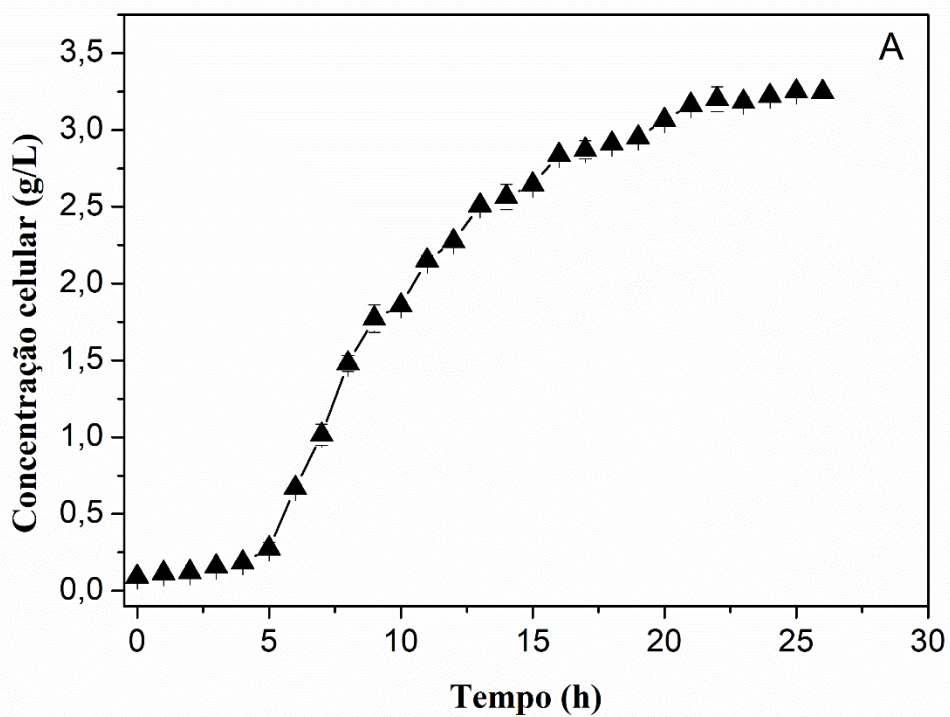
Desta forma, a composição do hidrolisado do bagaço de caju, em relação a glicose e xilose e a baixa concentração de compostos que podem interferir no metabolismo microbiano, faz com que este hidrolisado possa vir a ser um meio de cultivo para a produção de ácido lático, o que será avaliado nos próximos tópicos.

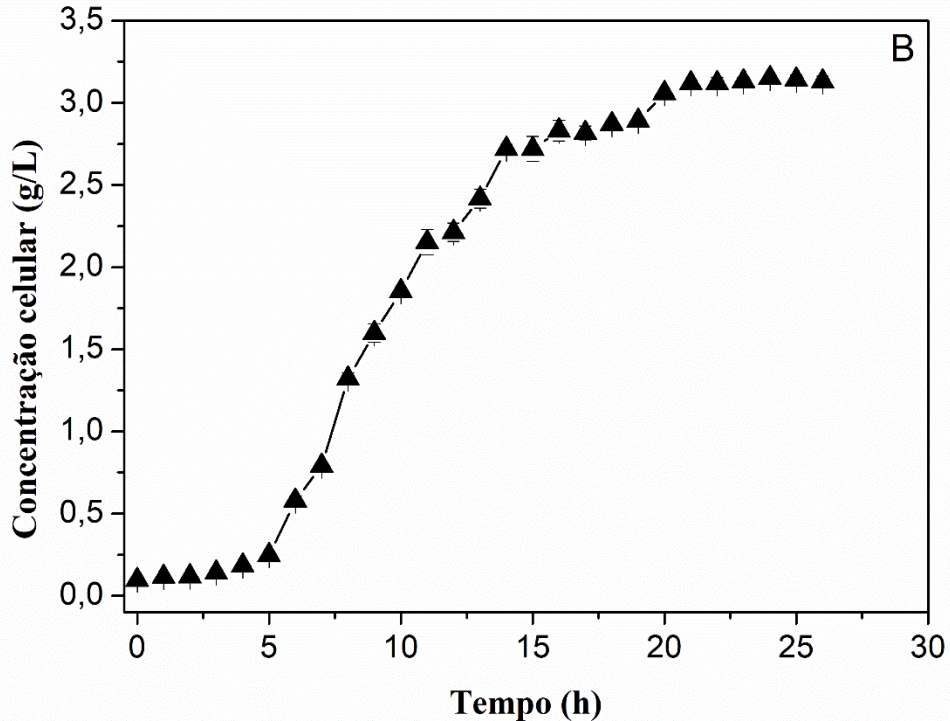
4.2 Estudo da curva de crescimento dos microrganismos em meio sintético

Inicialmente, realizou-se um estudo do crescimento celular dos dois microrganismos selecionados, *L. plantarum* LAB 07 e *L. plantarum* LAB 14, em meio sintético MRS (Man, Rogosa, Sharp), que continha 20 g/L glicose, 10 g/L peptona, 10 g/L extrato de carne, 5 g/L extrato de levedura, 1 g/L polisorbato 80 tween, 2 g/L citrato de amônio, 5 g/L acetato de sódio, 0,10 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês e 2 g/L fosfato de potássio dibásico a $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$. Esse estudo ocorreu em agitador orbital nas condições de 37 °C, 150 rpm por 26 horas para avaliar as fases de crescimento dos microrganismos, o comportamento da cinética

de crescimento das duas cepas e o estado fisiológico. Tais perfis de crescimento estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Perfil de crescimento dos microrganismos *Lactobacillus plantarum*, cepas LAB 07 (A) e LAB 14 (B), em meio Man, Rogosa, Sharp (MRS), em agitador orbital sob as condições de 37 °C e 150 rpm.





Fonte: Elaborado pelo autor.

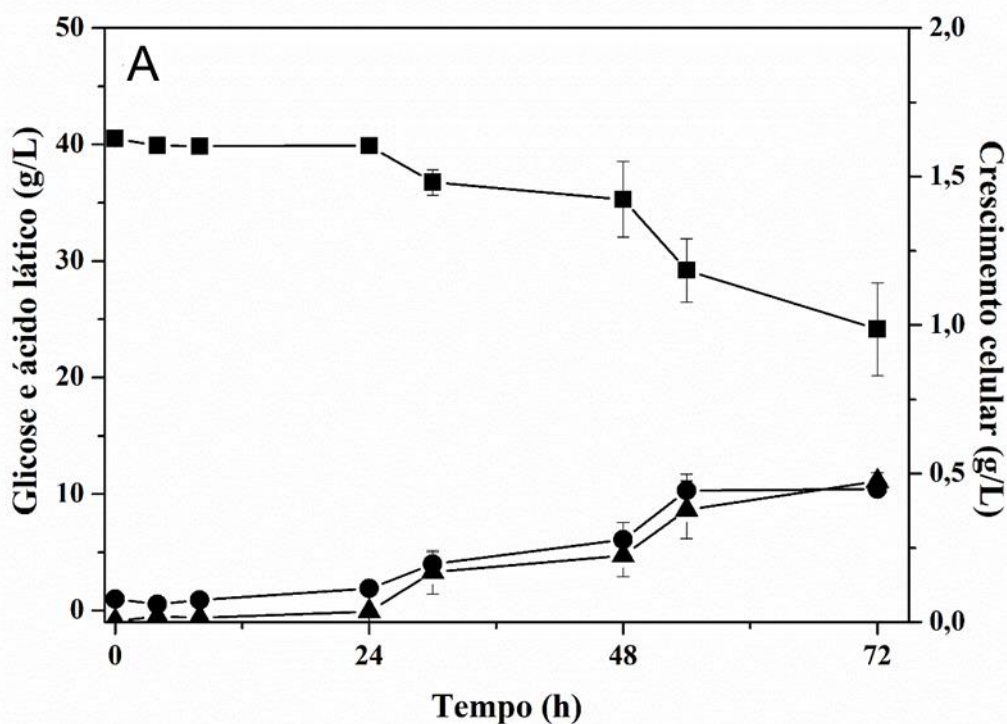
Ambas as cepas, LAB 07 e LAB 14, apresentam fase lag similar e com duração de 4 horas (Figura 4). Após a fase lag é observada a fase log que dura até às 21 h e em seguida é observada a fase estacionária, que durou no intervalo de 21 h a 26 h. As cepas apresentaram crescimento similar, com concentrações máximas de células iguais a 3,2 g/L e 3,1 g/L para LAB 07 e LAB 14, respectivamente. A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a LAB 07 e LAB 14 foram iguais a 0,36 h⁻¹ e 0,31 h⁻¹, respectivamente. O meio de cultivo (MRS) é muito mais complexo do que hidrolisado do bagaço de caju, que será utilizado na produção de ácido láctico, desta forma esta etapa do estudo é importante para saber em qual estado fisiológico estarão as células ao serem inoculadas no meio de produção do ácido de interesse. Como as cepas apresentaram resultados similares, ambas podem ser utilizadas nos ensaios da produção de ácido láctico.

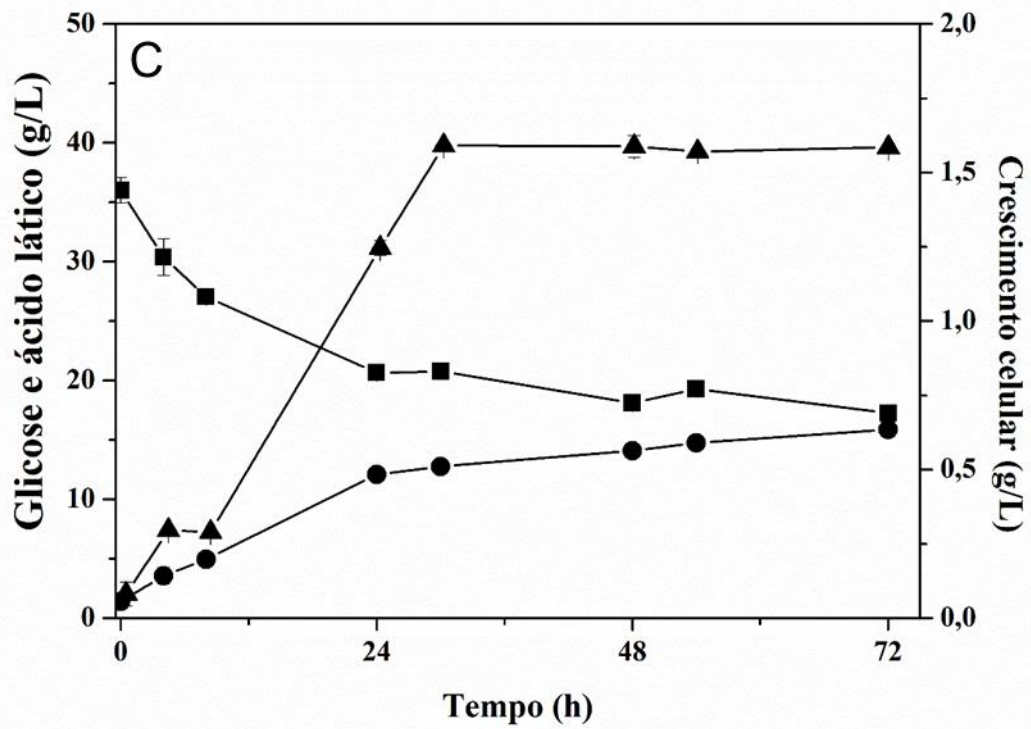
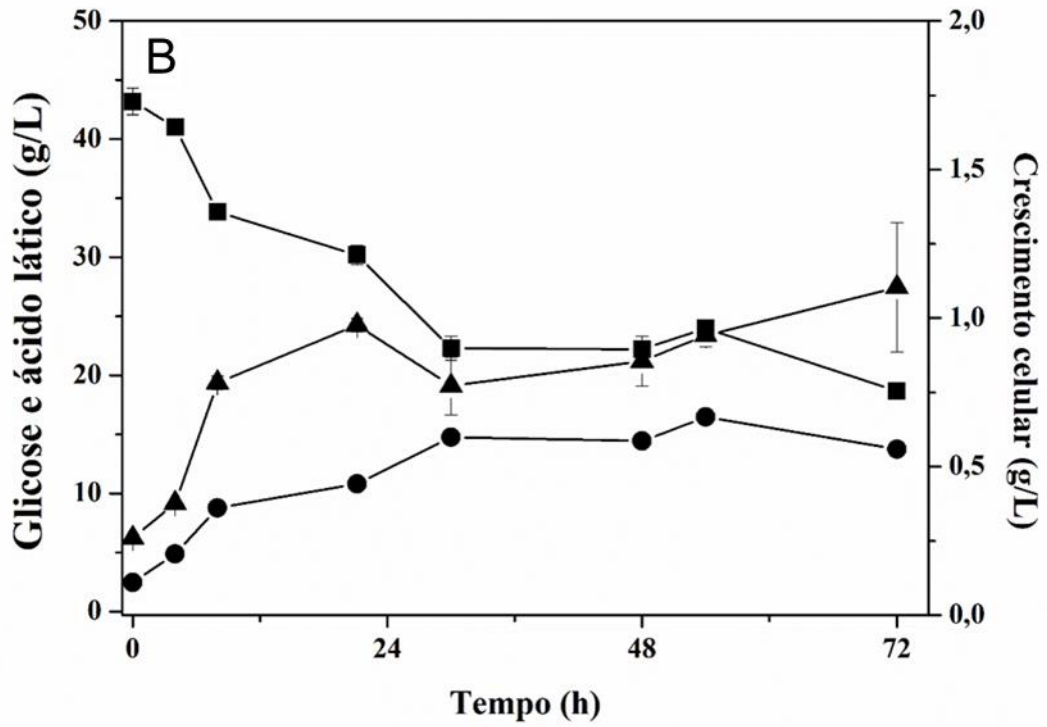
4.3 Produção de ácido lático em agitador orbital

4.3.1 Avaliação do tempo de inóculo na produção de ácido lático

Inicialmente, investigou-se a influência da fase de crescimento do microrganismo inoculado, avaliando-se o tempo de preparação do inóculo, no processo de produção de ácido lático por ambas as cepas (LAB07 e LAB14), usando o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultivo. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

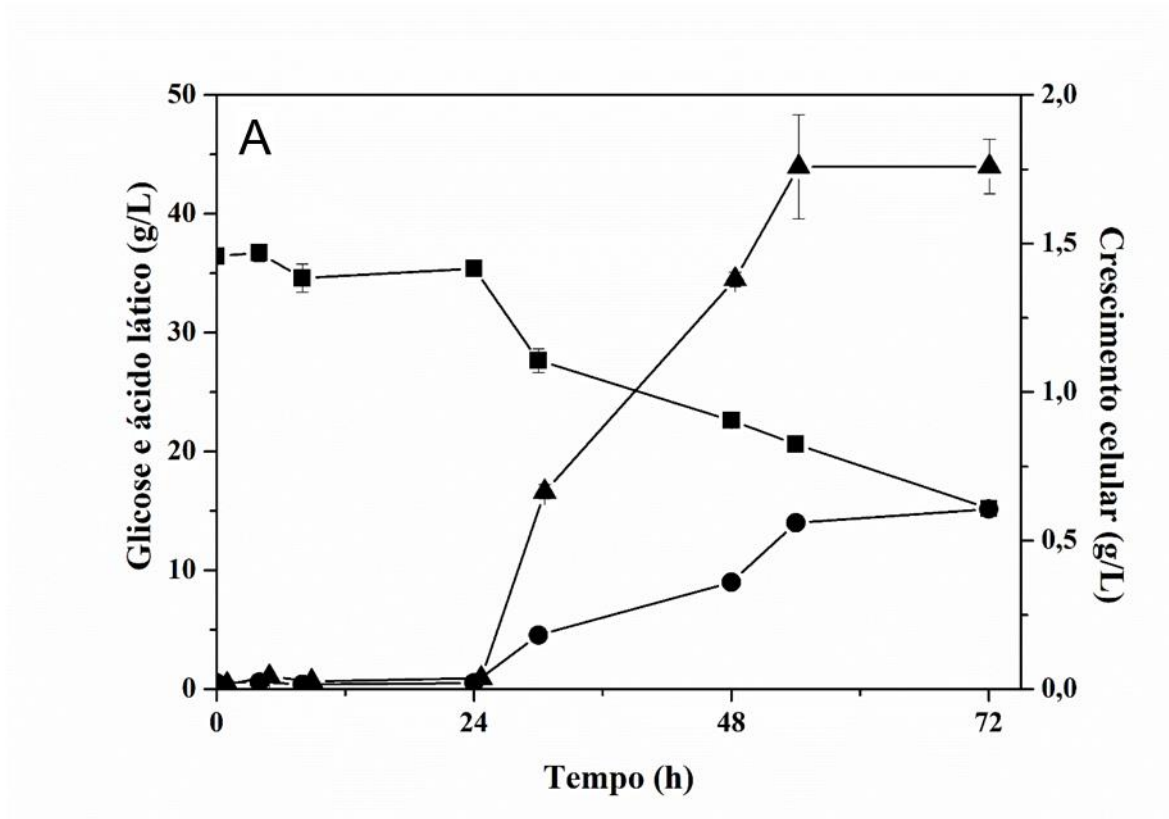
Figura 5 – Perfil do crescimento celular (▲), concentrações de glicose (■) e ácido lático (●) durante o bioprocesso a 37 °C e 150 rpm usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos em diferentes tempos de inóculo: (A) 16 horas (fase de desaceleração do crescimento), (B) 20 horas (fase de desaceleração do crescimento), e (C) 24 horas (fase estacionária do crescimento).

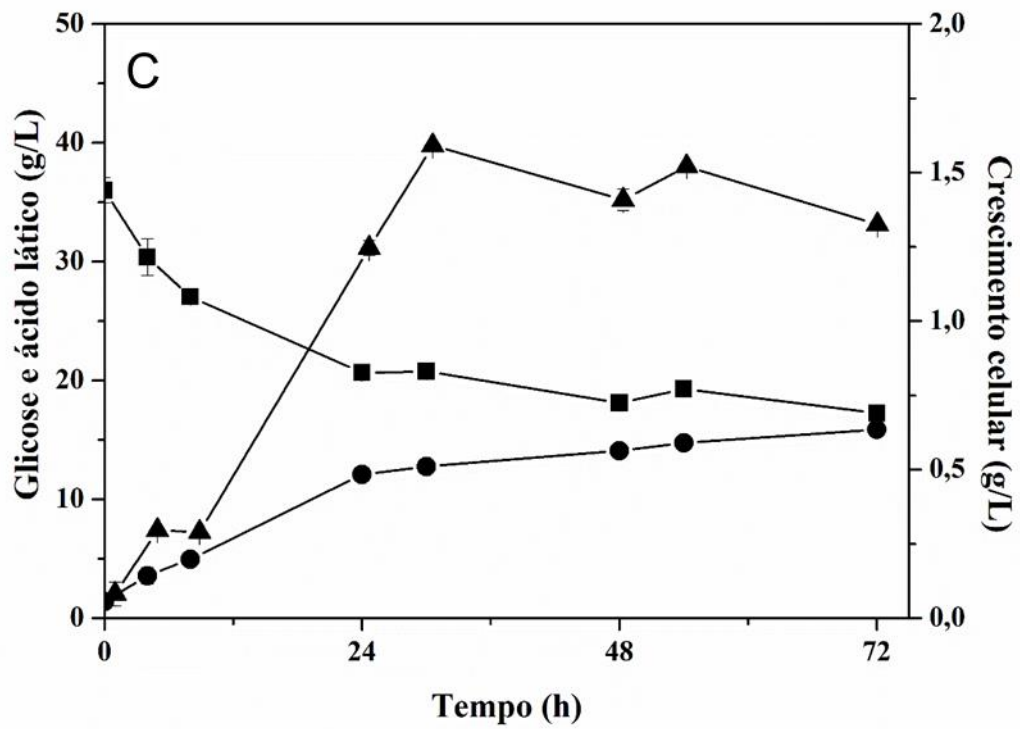
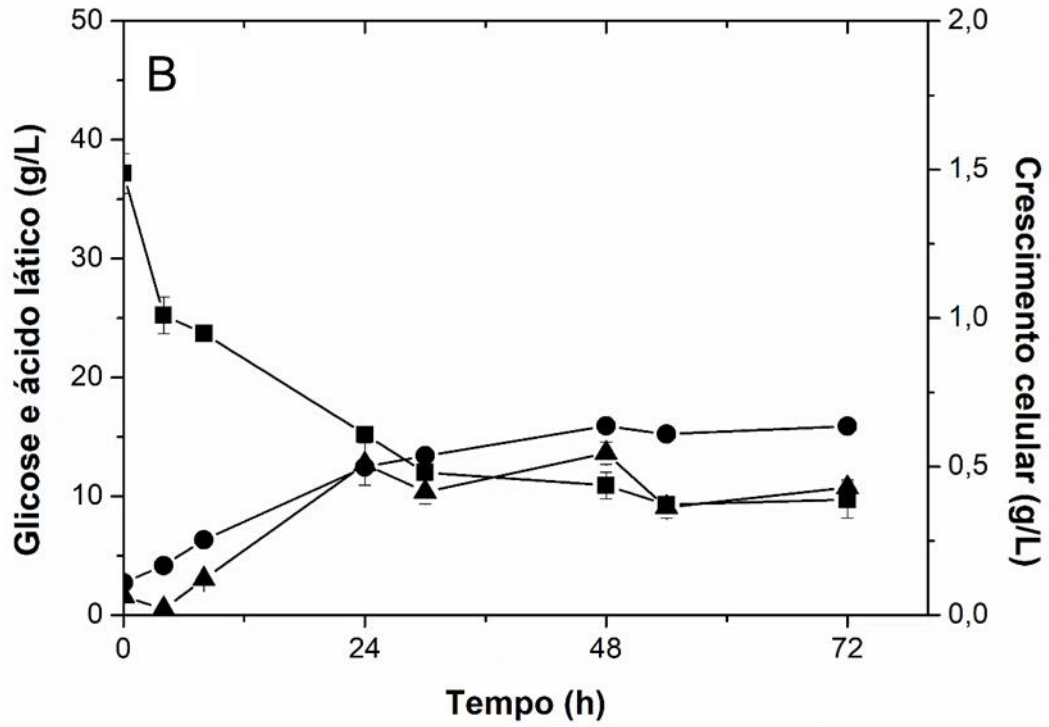




Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Perfil do crescimento celular (▲), das concentrações de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 37 °C e 150 rpm usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos em diferentes tempos de inóculo: (A) 16 horas (fase de desaceleração do crescimento), (B) 20 horas (fase de desaceleração do crescimento), e (C) 24 horas (fase estacionária do crescimento).





Fonte: Elaborado pelo autor.

Em nenhuma das condições avaliadas, a glicose foi totalmente consumida pela cepa LAB07, apresentando valores de conversão iguais a 39,51%, 60,53% e 52,09%, para os tempos de inóculo de 16 h (fase de crescimento), 20 h (fase de desaceleração) e 24 h (início da fase estacionária), respectivamente. Apesar do tempo de inóculo ser diferente, a concentração inicial das células foi padronizada, e ambas as cepas consumiram a glicose presente no hidrolisado do bagaço de caju. A glicose é o principal açúcar utilizado por cepas da bactéria *Lactobacillus* para produzir ácido láctico em um processo conhecido como homofermentação. No entanto, a xilose não foi assimilada pelo microrganismo, portanto esses dados não foram apresentados nos resultados cinéticos dos processos.

No processo usando o inóculo obtido por 20 h, em que a cultura está na fase de desaceleração do crescimento, ocorreu o maior crescimento celular e resultou em 15,9 g/L ácido láctico, não sendo a maior produção obtida do ácido de interesse. A maior produção foi alcançada no processo inoculado com a cultura obtida no início da fase estacionária em 24 h, obtendo 16,5 g/L de ácido láctico. O processo usando o inóculo com o menor tempo, 16 h ou fase de crescimento, apresentou uma produção de ácido láctico de 10,4 g/L. Um fato que vale a pena de ser acentuado é que os valores de produção máxima de ácido láctico ($P_{m\acute{a}x}$) foram registrados com 72 horas de fermentação e que com o tempo de inóculo de 24 horas foi o que obteve os maiores valores de Q_P (produtividade) e de $P_{m\acute{a}x}$ (produção máxima), como pode ser observado na Tabela 5.

Em relação as células obtidas com 24 h de inóculo (a qual estava na fase estacionária de crescimento), foi observada uma concentração celular de 1,6 g/L. Já nos processos com crescimento do inóculo por 20 h (fase de desaceleração) ou 16 h (fase log), os valores de biomassa alcançados foram de apenas 0,95 g/L e 0,44 g/L, respectivamente. O maior tempo de preparo do inóculo, que proporcionalmente ao microrganismo atinge a fase estacionária de crescimento, foi benéfico para acelerar o crescimento do microrganismo no processo de produção de AL usando o HBC.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos, produção, rendimento e produtividade do ácido láctico usando as cepas *L. plantarum* LAB07 e LAB14 e o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultura, inoculados com culturas obtidas em diferentes tempos de crescimento. Letras diferentes em uma mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes.

Tempo de crescimento do inóculo (h)	<i>L. plantarum</i> LAB07					<i>L. plantarum</i> LAB14				
	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	P_{MAX}	Q_P	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	P_{MAX}	Q_P
	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/L)	(g/(L.h))	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/L)	(g/(L.h))
16	0,03 ^a	12,0 ^a	0,70 ^a	10,4 ^a	0,15 ^a	0,06 ^a	12,2 ^a	0,70 ^a	15,1 ^a	0,21 ^a
20	0,03 ^a	12,2 ^a	0,59 ^b	15,9 ^b	0,31 ^b	0,02 ^b	13,1 ^b	0,91 ^b	15,9 ^b	0,33 ^b
24	0,07 ^b	13,6 ^b	0,85 ^c	16,5 ^c	0,22 ^a	0,02 ^b	12,1 ^a	0,60 ^a	15,9 ^b	0,22 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor.

O rendimento de células com base no consumo de glicose, $Y_{X/S}$, foi igual para os processos usando os inóculos obtidos com 16 h e 20 h, obtendo 0,03 g_{célula}/g_{glicose}, porém o valor de $Y_{X/S}$ foi 0,07 g/g para o processo usando o inóculo de obtido com 24 h (Tabela 5). O fato anterior também é observado ao ser analisado os valores do parâmetro $Y_{P/X}$ no qual tem-se os resultados próximos de 12,0 g/g e 12,2 g/g para os processos inoculado com a cultura obtida com 16 h (fase de crescimento) e 20 h (fase de desaceleração do crescimento), respectivamente, e novamente o maior valor observado foi no processo usando o inóculo obtido com 24 h (início da fase estacionária), com valor de $Y_{X/P}$ igual a 13,6 g/g.

Este mesmo comportamento foi observado para o rendimento de ácido láctico baseado no consumo de glicose, $Y_{P/S}$, obtendo um rendimento de 0,85 g_{AL}/g_{glicose} para o processo usando o inóculo obtido com 24 horas (Tabela 5).

A maior produtividade volumétrica de ácido láctico, Q_P , foi obtida no processo usando o inóculo de 20 h com um valor de 0,31 g/(L.h), seguido pelo processo usando o inóculo de 24 h, que apresentou valor de 0,22 g/(L.h) e por fim no processo usando o inóculo de 16 h com uma produtividade de 0,14 g/(L.h).

Comportamento similar foi observado para a cepa LAB14 analisando os resultados obtidos dos processos inoculados com culturas obtidas por diferentes tempos (Figuras 6 A, B e C). Em nenhum dos processos o açúcar, glicose, foi

completamente consumido pela cepa LAB14, com porcentagem de consumo iguais a 59,26%, 64,21% e 66,92%, para os processos usando o inóculo obtido com 16 h (fase de crescimento), 20 h (fase de desaceleração) e 24 h (início da fase estacionária), respectivamente. Estes resultados estão apresentados na Tabela 7. O maior consumo foi alcançado usando o inóculo obtido com 24 h e tal valor é bastante próximo ao consumo usando o inóculo de 20 h, sendo estes valores significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (Tabela 7).

A cepa LAB 14 apresentou o maior crescimento celular usando o inóculo obtido com 16 h, obtendo 1,30 g/L de células, seguido do processo usando o inóculo de 24 h com 0,57 g/L de células e por fim obteve-se o menor crescimento celular usando o inóculo de 20 h com uma concentração celular de 0,43 g/L. Desta maneira, foi possível observar que com um menor tempo de inóculo, cuja a cultura estava na fase de desaceleração de crescimento (16 h), foi possível obter uma maior concentração final de biomassa, comparado quando utiliza-se uma cultura em fase estacionária de crescimento (20 h e 24 h). Nesse estudo foi observado que a maior concentração celular não ocorreu juntamente com o maior consumo de glicose, indicando que parte da glicose consumida, no estudo com maior consumo, tenha sido utilizada para manutenção celular e formação de ácido lático.

Ao contrário do que ocorre com a concentração celular, o tempo de inóculo não influenciou na produção de ácido lático. As concentrações máximas (P_{max}) de AL foram 15,1 g/L, 15,9 g/L e 15,9 g/L obtidas nos processos usando o inóculo obtido com 16 h, 20 h e 24 h, respectivamente. Entretanto, a eficiência do bioprocessamento em termos de produtividade (Q_P) foi influenciada pela fase de crescimento, sendo a maior produtividade (0,33 g/L.h) obtida no processo usando o inóculo obtido com 20 h, no qual o microrganismo encontra-se na fase de desaceleração do crescimento (Tabela 7).

Analisando os rendimentos obtidos pela bactéria *L. plantarum* LAB14, observa-se que o rendimento de células com base no consumo de substrato ($Y_{X/S}$) foram iguais nos processos inoculados com a cultura obtida com 20 h ou 24 h, obtendo 0,02 g_{células}/g_{glicose}. No entanto, o maior rendimento $Y_{X/S}$ (0,06 g_{célula}/g_{glicose}) foi obtido no processo usando o inóculo obtido com 16 h (Tabela 5). Esse

comportamento foi semelhante ao observado para o rendimento de $Y_{P/X}$, obtendo 12,2 g/g, 13,1 g/g e 12,1 g/g, para os processos usando o inóculo de 16 h, 20 h e 24 h, respectivamente (Tabela 5).

Já para os rendimentos de produto com base no consumo de glicose ($Y_{P/S}$), observou-se que o processo inoculado com a cultura obtida com 20 h propiciou o maior $Y_{P/S}$ (0,91 g/g) seguido pelo processo conduzido com o inóculo de 16 h (0,70 g/g) e o menor rendimento obtido no processo usando o inóculo de 24 h (0,60 g/g), vide Tabela 7.

Queiroz (2021) estudou a produção de ácido láctico pelos mesmos microrganismos avaliados neste estudo, *L. plantarum* LAB07 e LAB14, porém usando o soro de leite como fonte de carbono. As concentrações de ácido láctico obtidas pela cepa LAB07 foram 13,1 g/L, 8,5 g/L e 11,2 g/L para os tempos de inóculo de 16 h, 20 h e 24 h, respectivamente, e para a cepa LAB14 obteve-se 10,4 g/L, 10,6 g/L e 9,3 g/L usando o inóculo obtido com 16 h, 20 h e 24 h, respectivamente (Queiroz, 2021). Para ambas as cepas estudadas (LAB07 e LAB14), Queiroz (2021) obteve a maior produção de ácido láctico com o tempo de 16 h, tempo no qual o microrganismo se encontrava na fase de crescimento. Essas concentrações são inferiores as obtidas usando o bagaço de caju como fonte de carbono.

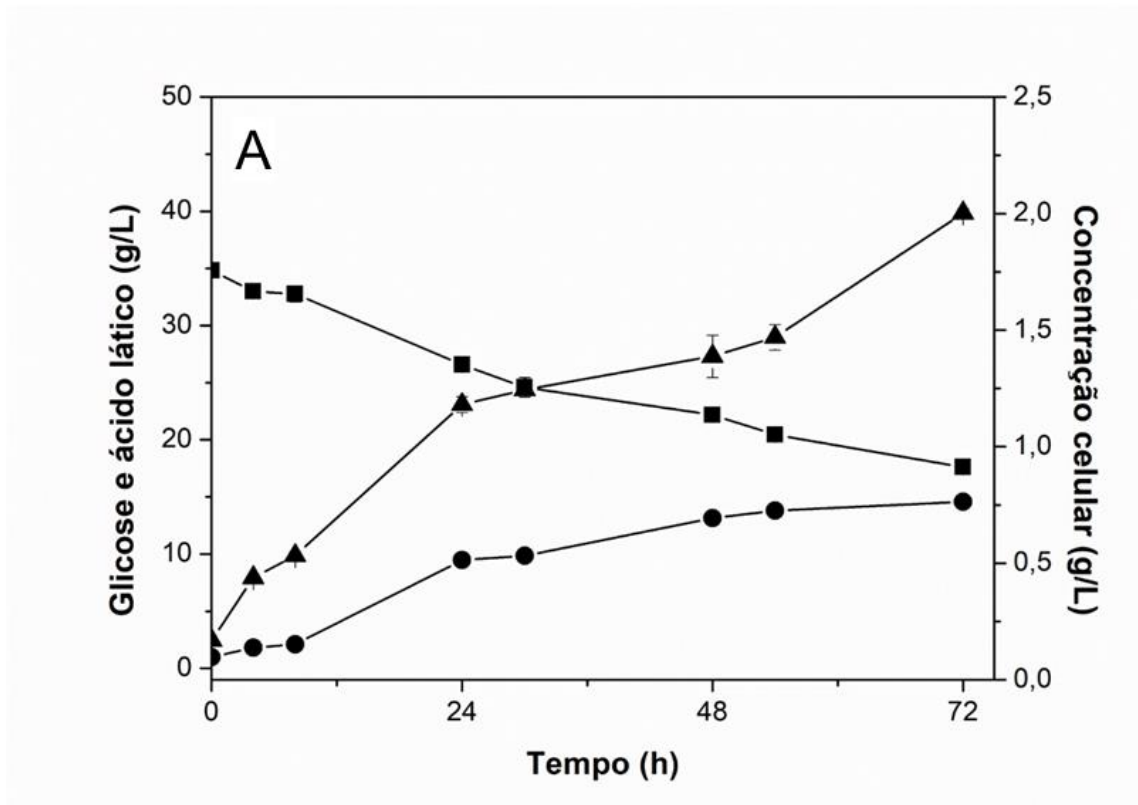
A partir de análises estatísticas, usando teste de Tukey com um nível de significância igual a 95%, verificou-se que para a cepa LAB 07, o tempo de inóculo no qual se obteve a maior produção de ácido láctico foi igual a 24 h (início da fase estacionária), enquanto que para a cepa LAB14 foi de 20 h (fase de desaceleração do crescimento). Deve-se constatar que mesmo utilizando apenas hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) no processo de desintoxicação, foi possível obter altos valores de concentração de ácido láctico usando o hidrolisado do bagaço de caju, destacando dessa forma uma economia de custo e de tempo nessa etapa para formulação do meio reacional. E mesmo com a presença de alguns compostos, como ácido acético e ácido fórmico. No hidrolisado, ambas as cepas conseguiram produzir o ácido láctico em quantidades elevadas se comparados os resultados obtidos por Queiroz (2021). Então, visando aumentar esta produção, outras variáveis foram avaliadas como a

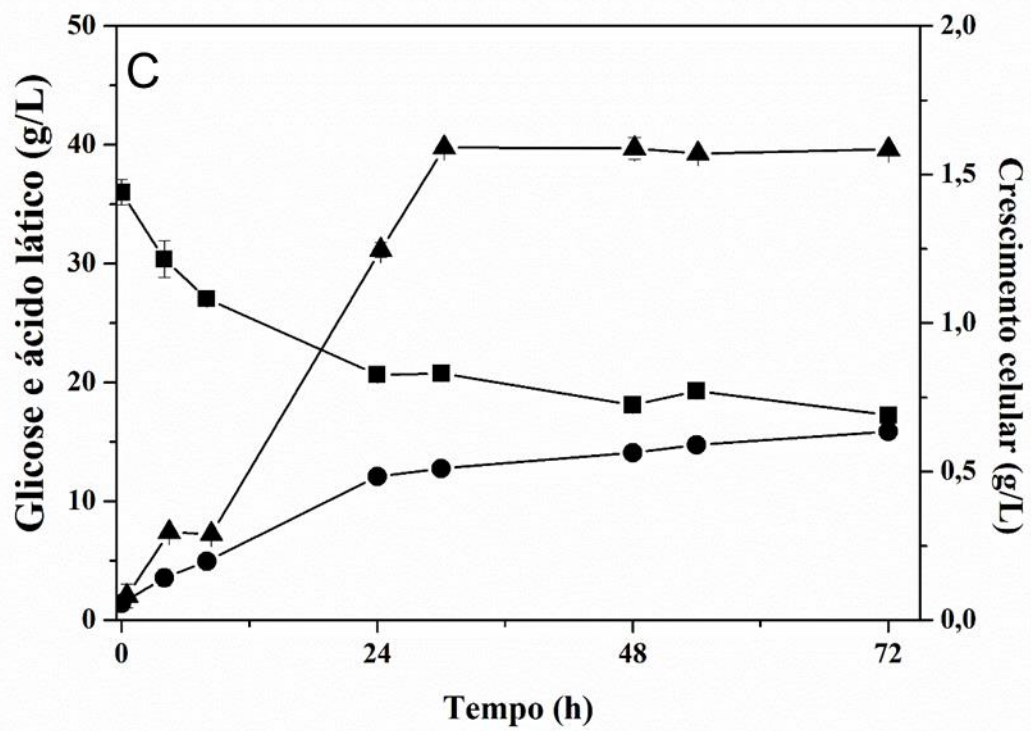
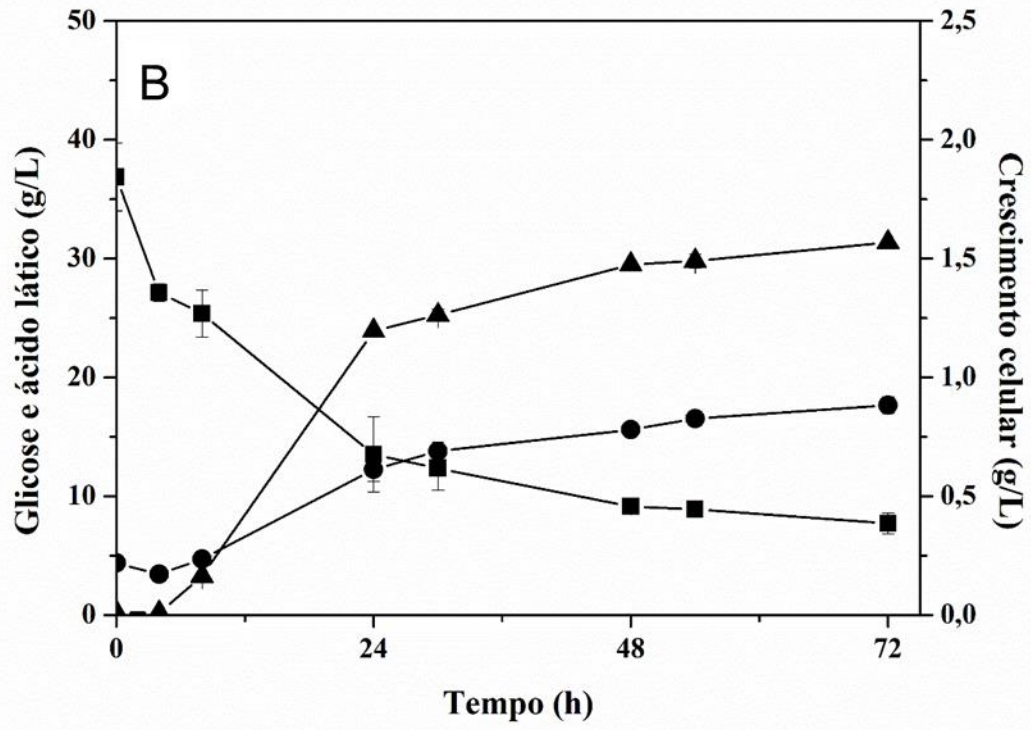
temperatura, mantendo-se o tempo de obtenção do inóculo em 24 h (fase estacionária) para a LAB07 e 20 h (fase de desaceleração do crescimento) para a LAB14.

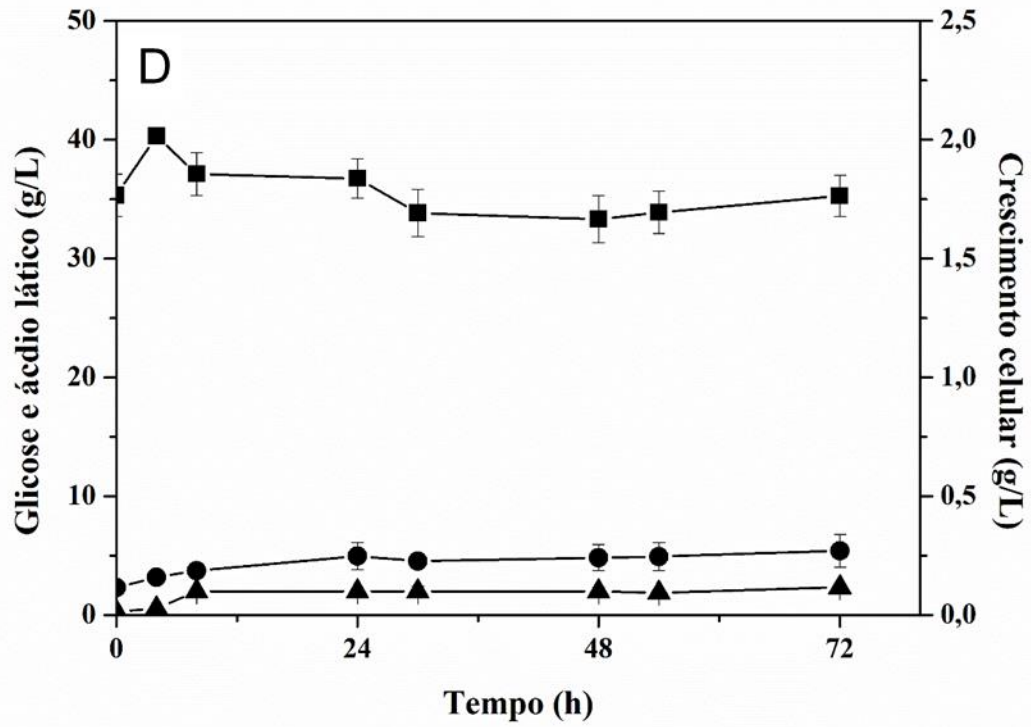
4.3.2 Avaliação da temperatura na produção de ácido láctico

Partindo-se dos melhores resultados da análise da fase de crescimento dos microrganismos a ser inoculado no meio de produção, avaliou-se a influência da temperatura realizando ensaios a 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C e os resultados podem ser observados nas Figuras 7 e 8 para *L. plantarum* LAB07 e LAB14, respectivamente.

Figura 7 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 150 rpm e diferentes temperaturas (25 °C (A), 30 °C (B), 37 °C (C) e 45 °C (D)) usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 24 h.

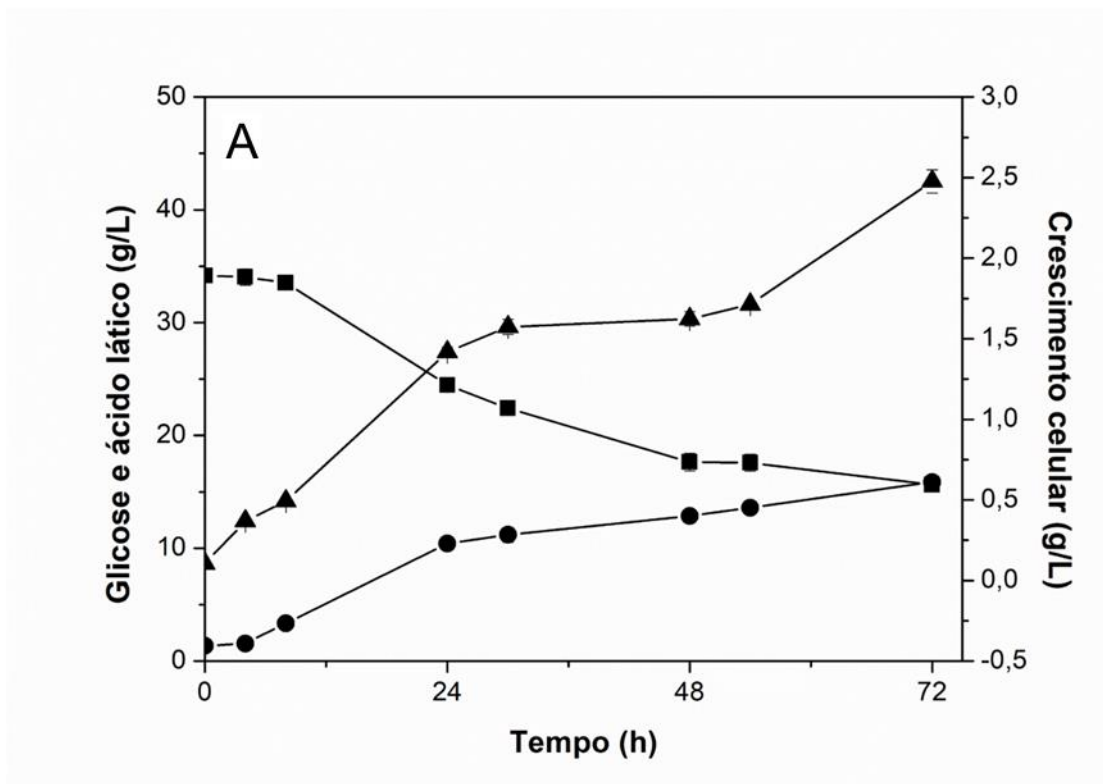


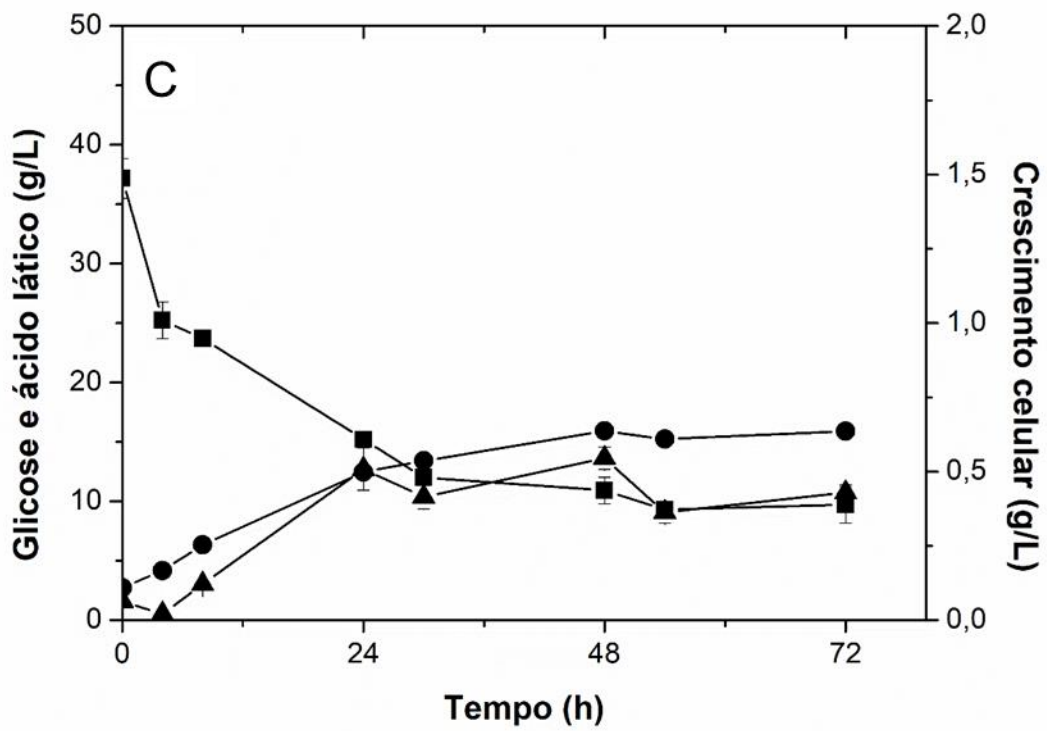
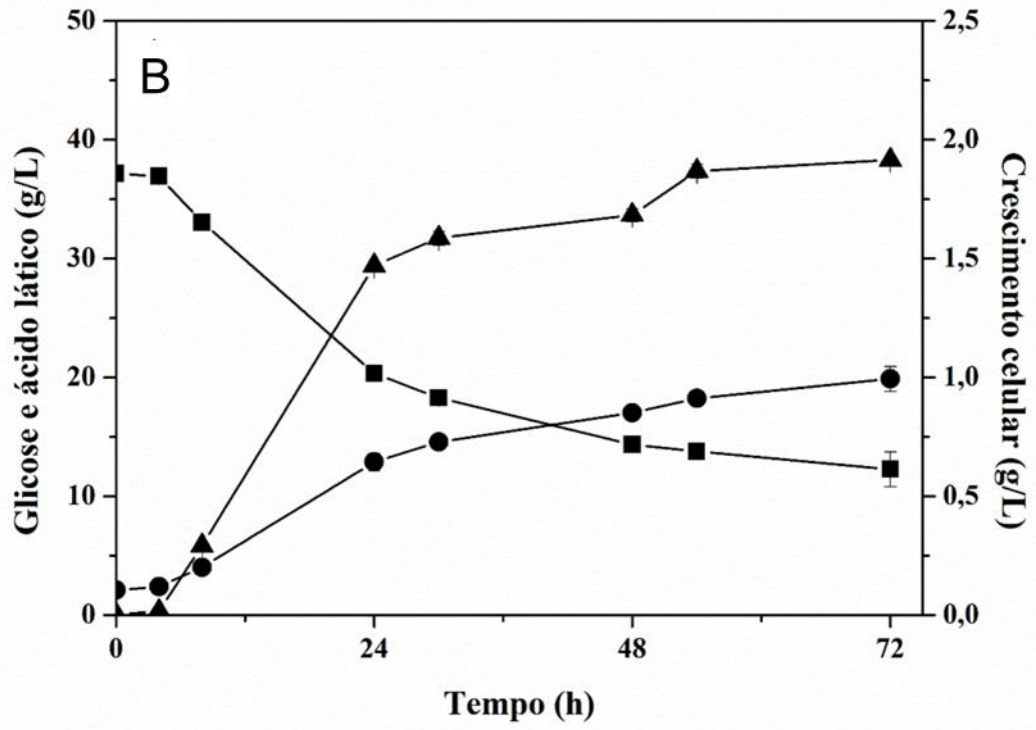


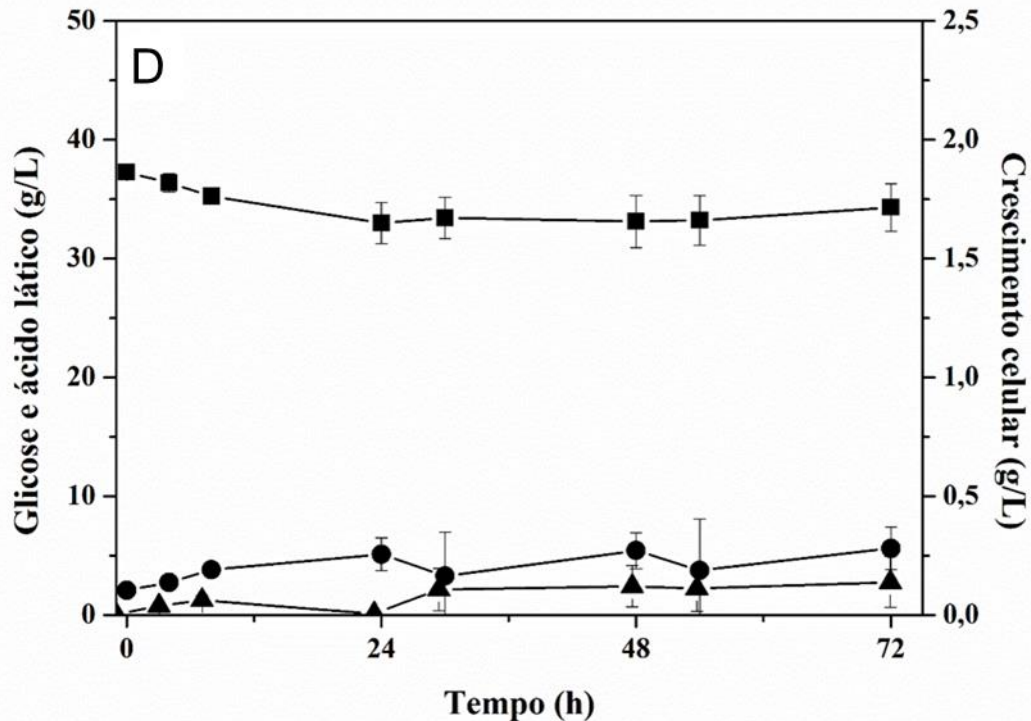


Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 150 rpm e diferentes temperaturas (25 °C (A), 30 °C (B), 37 °C (C) e 45 °C (D)) usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 20 h.







Fonte: Elaborado pelo autor.

As bactérias de ácido láctico normalmente atuam em uma ampla faixa de temperatura, 20 °C – 45 °C, sendo um fator primordial e de grande influência no processo produtivo. Nas temperaturas analisadas (25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C), a produção de ácido láctico é afetada negativamente com o aumento da temperatura, pois ocasiona a redução da atividade enzimática responsável pela conversão metabólica de substrato (glicose) em produto (ácido láctico).

Neste estudo, o microrganismo avaliado, *L. plantarum*, é uma bactéria homofermentativa capaz de converter apenas glicose em ácido láctico no qual uma molécula de glicose forma duas de ácido láctico. Esse metabolismo ocorre através da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), e as principais enzimas envolvidas são glicose-6P isomerase (EC 5.3.1.9), 6-fosfofrutoquinase (EC. 2.7.1.11) e frutose bifosfato aldolase (EC 4.2.1.13) (EITEMAN e RAMALINGAM, 2015). Essas enzimas, quando originárias de microrganismos silvestres, ou seja, aqueles que não

sofreram modificações genéticas, têm sua atividade ótima em torno de 30 °C (SANFÉLIX-HAYWOOD *et al.*, 2011).

Em nenhuma das temperaturas avaliadas, a glicose foi completamente metabolizada, apresentando valores de consumo de glicose iguais a 46,63%, 79,09%, 52,09% e 0,13% nos processos conduzidos a 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C, respectivamente, indicando uma maior assimilação deste carboidrato a 30 °C e que a 45 °C praticamente não houve consumo. Esse resultado, como esperado, influenciou no crescimento celular em que a maior concentração de células (1,57 g/L) foi obtida a 30 °C com 72 h de processo, enquanto a 45 °C obteve-se apenas 0,12 g/L de células (Figuras, 7 B e 7 D).

A máxima concentração de ácido láctico obtida pela cepa LAB07 a diferentes temperaturas foi de 14,6 g/L, 17,7 g/L, 15,9 g/L e 5,4 g/L para as temperaturas de 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C, respectivamente, como apresentado nas Figuras 7 A, 7 B, 7 C e 7 D.

Os rendimentos $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ foram calculados para a cepa LAB07 e estão apresentados na Tabela 8, contudo, devido à baixa produção de ácido láctico, baixo consumo de glicose e baixo crescimento celular não foi possível calcular tais parâmetros para a temperatura de 45 °C. Os rendimentos de células com base no consumo de substrato ($Y_{X/S}$) obtidos a 25 °C, 30 °C e 37 °C foram 0,12 g/g, 0,06 g/g e 0,07 g/g, respectivamente. No processo conduzido a 45 °C, o valor de $Y_{X/S}$ foi insignificante o que indica que pouco substrato foi metabolizado influenciando a reprodução celular durante o processo, como observado na Figura 7 D.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos, produção, rendimento e produtividade de ácido láctico obtidos pelas cepas *L. plantarum* LAB07 e LAB14 a diferentes temperaturas e usando o hidrolisado do bagaço de caju como meio de cultura. Letras diferentes em uma mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes.

Temperatura (°C)	<i>L. plantarum</i> LAB07					<i>L. plantarum</i> LAB14				
	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	P_{MAX}	Q_P	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	P_{MAX}	Q_P
	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/L)	(g/(L.h))	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/L)	(g/(L.h))
25	0,12 ^a	7,41 ^a	0,88 ^a	14,6 ^a	0,20 ^a	0,13 ^a	6,03 ^a	0,77 ^a	15,9 ^a	0,22 ^a
30	0,06 ^b	8,52 ^a	0,64 ^b	17,7 ^b	0,25 ^a	0,08 ^a	9,32 ^b	0,80 ^a	19,9 ^b	0,28 ^a
37	0,07 ^b	11,6 ^b	0,85 ^a	15,9 ^c	0,22 ^a	0,02 ^b	13,1 ^c	0,91 ^b	15,9 ^a	0,21 ^a
45	-	-	-	5,4 ^d	0,08 ^b	-	-	-	5,6 ^c	0,08 ^b

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que os valores de $Y_{P/X}$ referentes as temperaturas de 25 °C, 30 °C e 37 °C foram iguais a 7,41 g/g, 8,52 g/g e 11,6 g/g respectivamente (Tabela 6). No processo conduzido a 25 °C é obtido o menor valor de $Y_{P/X}$, pois nessa temperatura é observado o maior valor de crescimento celular (2 g/L), já a 30 °C é apontado um valor de $Y_{P/X}$ que se encontra entre os valores apresentados pois ocorreu, nessa temperatura, tanto o maior crescimento celular quanto a maior produção de ácido láctico. Por fim na temperatura de 37 °C, é obtido o maior valor de $Y_{P/X}$, pois foi observado nessa temperatura o menor valor de crescimento celular.

O menor valor de $Y_{P/S}$ (0,64 g/g) foi obtido a 30 °C, indicando que nessa temperatura ocorreu tanto a maior produção de ácido láctico, como também ocorreu o maior consumo de substrato. O rendimento $Y_{P/S}$ na temperatura de 37 °C foi 0,85 g/g, indicando que quase todo substrato consumido foi convertido em produto. O maior valor obtido do rendimento $Y_{P/S}$ (0,88 g/g) foi no processo conduzido a 25 °C. Por fim, na temperatura de 45 °C não houve a conversão de substrato em produto, pois a bactéria não consumiu a glicose.

As produtividades (Q_P) obtidas foram próximas nos bioprocessos realizados a 25 °C, 30 °C e 37 °C, 0,20 g/L.h, 0,25 g/L.h e 0,22 g/L.h, respectivamente (Tabela 6), corroborando com os valores próximos de concentração de ácido láctico obtidos nestas temperaturas (Figuras 7A, 7B e 7C). No entanto, o processo a 45 °C

apresentou a menor produtividade, 0,08 g/L.h, devido à baixa produção de ácido láctico (Figura 7D). Mesmo não havendo consumo de açúcar a baixa produção e consequentemente a baixa produtividade de ácido láctico a 45 °C foi observada já que o meio de inóculo apresentava produção de AL.

Os ensaios realizados com a cepa LAB14, o comportamento dos resultados com a temperatura foram semelhantes aos obtidos pela cepa LAB07. *L. plantarum* LAB14 também não consumiu toda a glicose durante as 72 horas de processo, consumindo 54,26%, 66,97%, 64,21% e 7,91% nos processos conduzidos a 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C, respectivamente, em que o consumo foi similar a 30 °C e 37 °C. Uma possível justificativa para o baixo consumo de glicose é decorrente da diminuição do metabolismo celular que é causada pela modificação do pH durante o processo, pois não ocorreu o consumo completo devido a questão da acidez do meio gerada pela formação de ácido láctico o que acaba ocasionando uma inibição pelo produto (SINGHVI, ZENDO e SONOMOTO, 2018).

As concentrações de células obtidas após 72 horas de reação foram 2,00 g/L para a temperatura de 25 °C, 1,92 g/L a 30 °C, 1,32 g/L a 37 °C e 0,14 g/L a 45 °C, demonstrando que a temperatura influenciou o crescimento celular, devido a redução da atividade catalítica das enzimas envolvidas na conversão metabólica do substrato, na reprodução celular e na produção do ácido láctico (KIZZIE-HAYFORD *et al.*, 2021).

Para a produção de ácido láctico por LAB 14 foram obtidas concentrações iguais a 15,9 g/L 19,9 g/L, 15,9 g/L e 5,62 g/L para os processos conduzidos a 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C, respectivamente, reforçando um melhor metabolismo celular a 30 °C.

Os resultados obtidos na avaliação da temperatura de produção do ácido láctico estão condizentes com os observados na literatura. Souza *et al.* (2017), ao analisarem a influência da temperatura na produção de ácido láctico pelo microrganismo a *L. lactis*, constataram que a produção obtida na temperatura acima de 40 °C era irrelevante quando comparada a obtida a 30 °C ou 37 °C. Zhang e Vadlani (2015) utilizaram um processo de cofermentação de *L. bravis* e *L. plantarum* para produzir ácido láctico a partir de biomassa lignocelulósica (casca de milho

hidrolisada) a 37 °C, alcançando uma produção de 24,3 g/L de ácido láctico por cepa *L. plantarum*, resultado maior do que o obtido nesse estudo que foi de 17,7 g/L para a LAB07 e 19,9 g/L para a LAB14.

Por outro lado, tais estudos variam de microrganismo para microrganismo. De la Torre *et al.* (2019) conseguiram uma maior produção de ácido láctico a partir do hidrolisado de casca de laranja na temperatura de 40 °C por *L. delbrueckii*.

A mesma espécie avaliada neste estudo, *L. plantarum*, foi reportada para produzir ácido láctico usando hidrolisados de outras biomassas, por exemplo, Nagarajan *et al.* (2022) utilizaram hidrolisados de algas marinhas e o processo foi conduzido a 30 °C. Tu *et al.* (2019) avaliaram hidrolisado de palha de arroz integral como meio de cultura e conduziram o processo a 37 °C. Além disso, outros estudos citam que a temperatura influenciou a produção do tipo de isômero do ácido láctico. Åkerberg *et al.* (1998) relatam que em processos produtivos utilizando a bactéria *Lactococcus lactis ssp.* A partir da glicose com temperatura acima de 30 °C é mais propício a formação de D-ácido láctico e Choonut *et al.* (2016) reportaram que para *L. plantarum* temperaturas por volta de 37 °C, produz os isômeros D e L ácido láctico.

Nesse estudo, após a utilização do polarímetro, foi constada que em todas as temperaturas estudadas, 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C, e para ambas as cepas de *L. plantarum*, LAB07 e LAB14, ocorreu a formação do isômero L-ácido láctico sendo observada uma variação na sua rotação específica entre 1 e 8 graus dependendo da concentração da solução analisada. Este resultado é muito interessante pois em altas concentrações o D-ácido láctico pode gerar problemas para a saúde humana, como acidose ou descalcificação, assim o isômero L é preferido pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (de la Torre *et al.*, 2019, Oliveira *et al.*, 2019, Eş *et al.*, 2018).

Então, de forma geral, foi observado que tanto para a LAB 07 quanto para a LAB 14, o aumento da temperatura foi desvantajoso para produção de ácido láctico, e de acordo com as análises estatísticas, constatou-se que para ambas as cepas a melhor temperatura para se conduzir o bioprocessamento é a temperatura de 30 °C. Essa temperatura, além de favorecer uma maior produção e produtividade de ácido láctico, pode ocasionar uma economia de custos por não necessitar de mais energia para

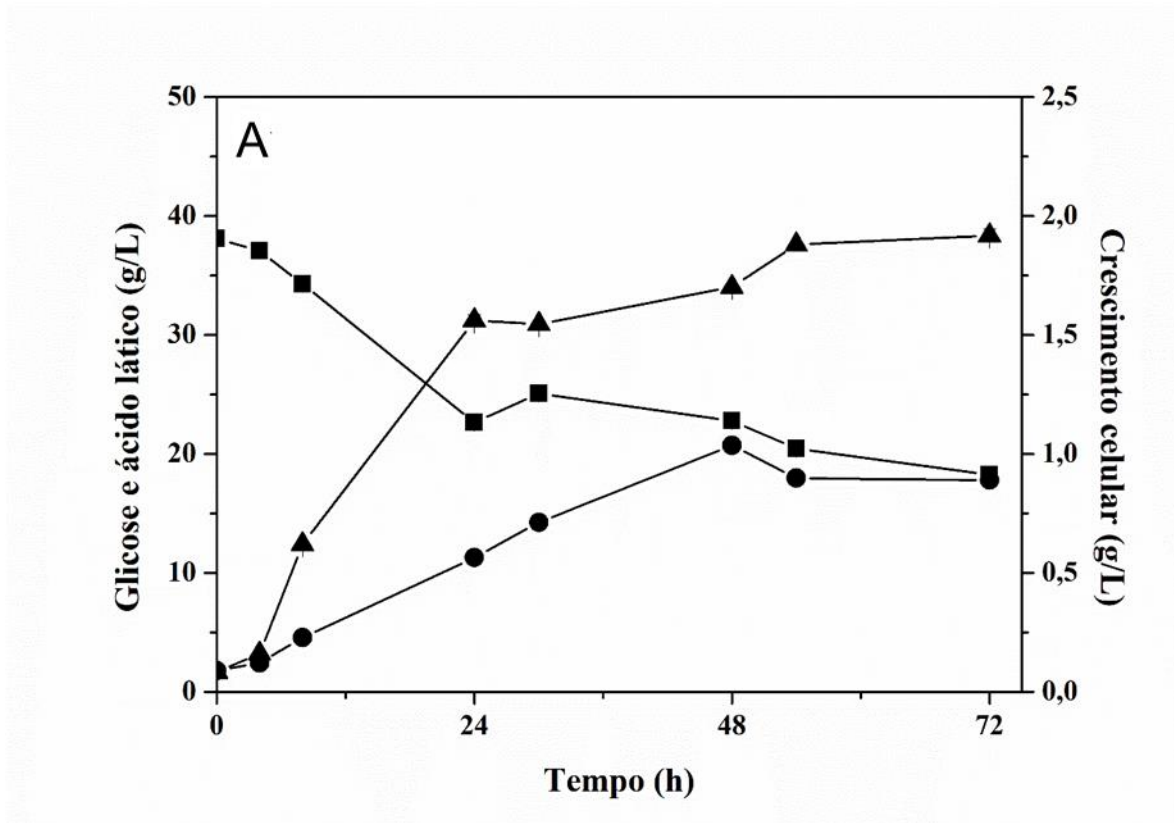
manter o processo em temperaturas mais elevadas. Consta na literatura alguns estudos de produção de ácido láctico com *L. plantarum* conduzidos a 30 °C, por exemplo, Marzo *et al.* (2020) estudaram a produção de AL por uma linhagem de *L. plantarum* a partir da fermentação do hidrolisado de polpa de beterraba, atingindo $P_{m\acute{a}x}$ de 6,55 g/L e Q_P de 0,05 g/L.h, obtendo uma produção de AL 63% menor que a obtida no presente estudo, embora o meio de cultura contenha maior concentração de açúcares redutores (~64 g/L). Queiroz (2021), em seus estudos com a *L. plantarum* a 30 °C, reportou produção máxima de ácido láctico iguais a 11,17 g/L e 11,34 g/L com as cepas LAB07 e LAB14, respectivamente, utilizando soro de leite como fonte de carbono.

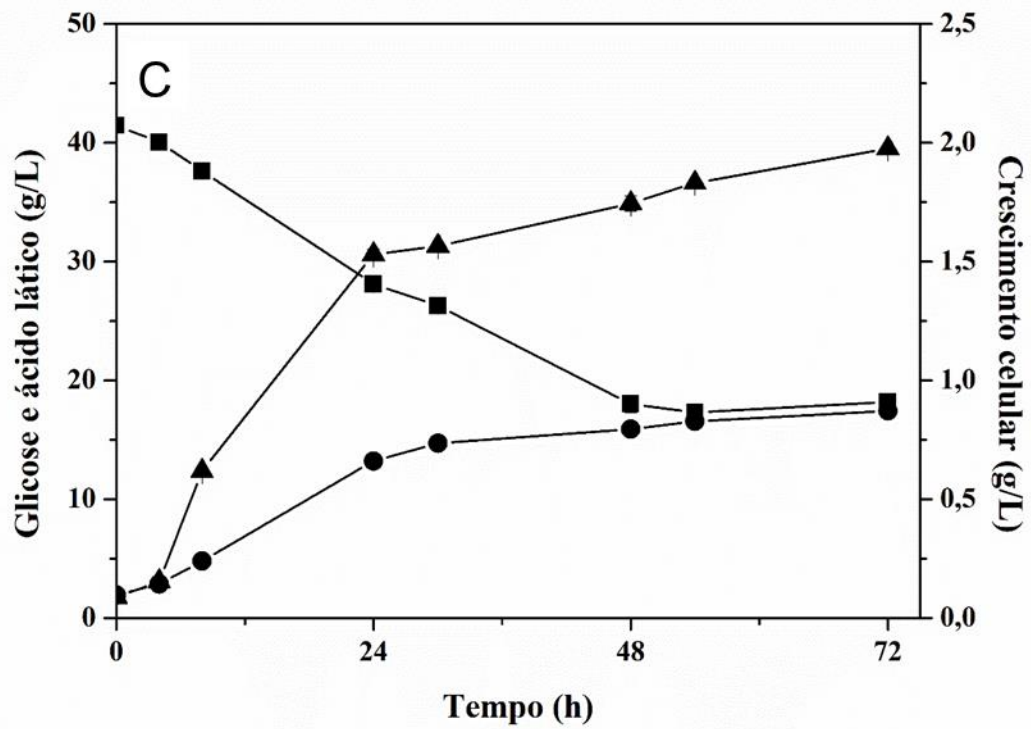
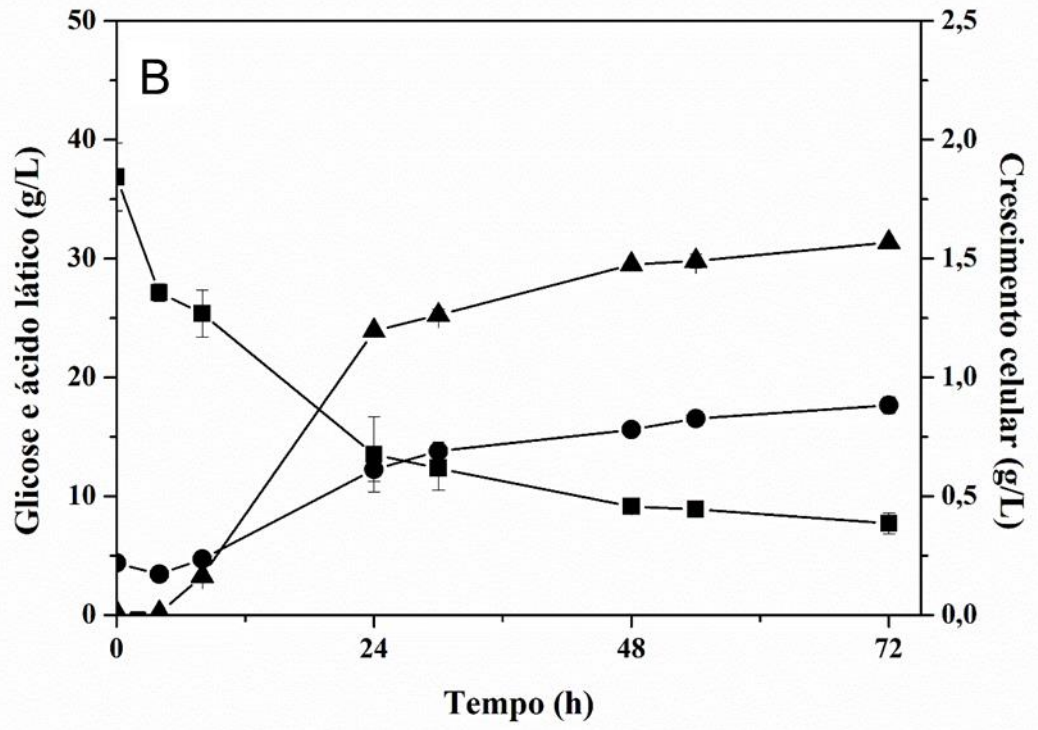
E por fim, após analisar a melhor fase de crescimento do microrganismo inoculado no meio de produção e a melhor temperatura para se conduzir o bioprocessamento, fez-se necessário também determinar qual seria a melhor rotação. Desta maneira, foram realizados ensaios conduzidos com três rotações diferentes.

4.3.3 Avaliação da rotação na produção de ácido láctico

Após a realização das análises de influência de temperatura no qual foi selecionado, para ambos os microrganismos (LAB07 e LAB14), a temperatura de 30 °C, estudou-se a influência da rotação na bioprodução de ácido láctico por estas bactérias. Para tanto, foram realizados experimentos com três diferentes rotações 100, 150 e 200 rpm e os resultados estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

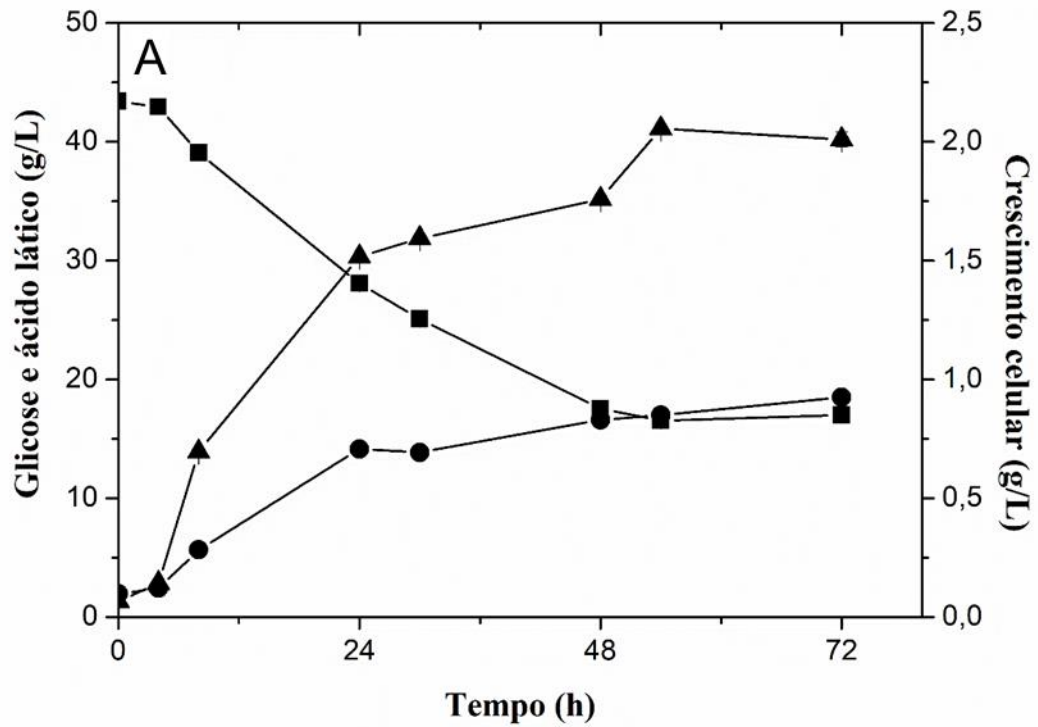
Figura 9 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 30 °C e diferentes agitações (100 rpm (A), 150 rpm (B) e 200 rpm (C)) usando *L. plantarum* LAB07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 24 h.

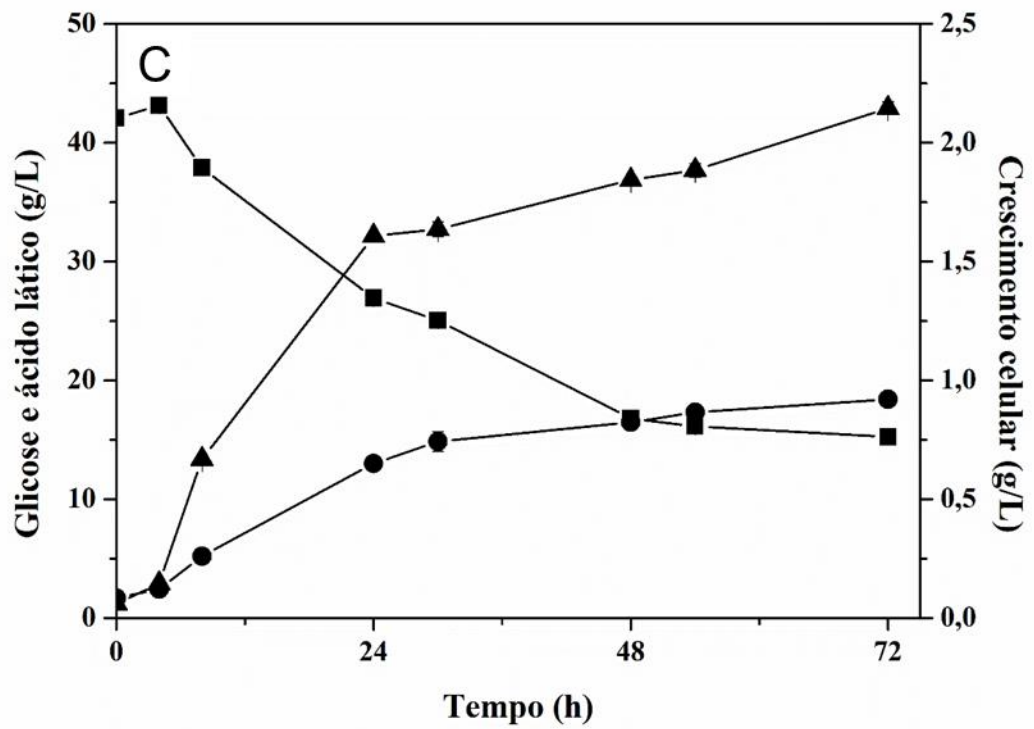
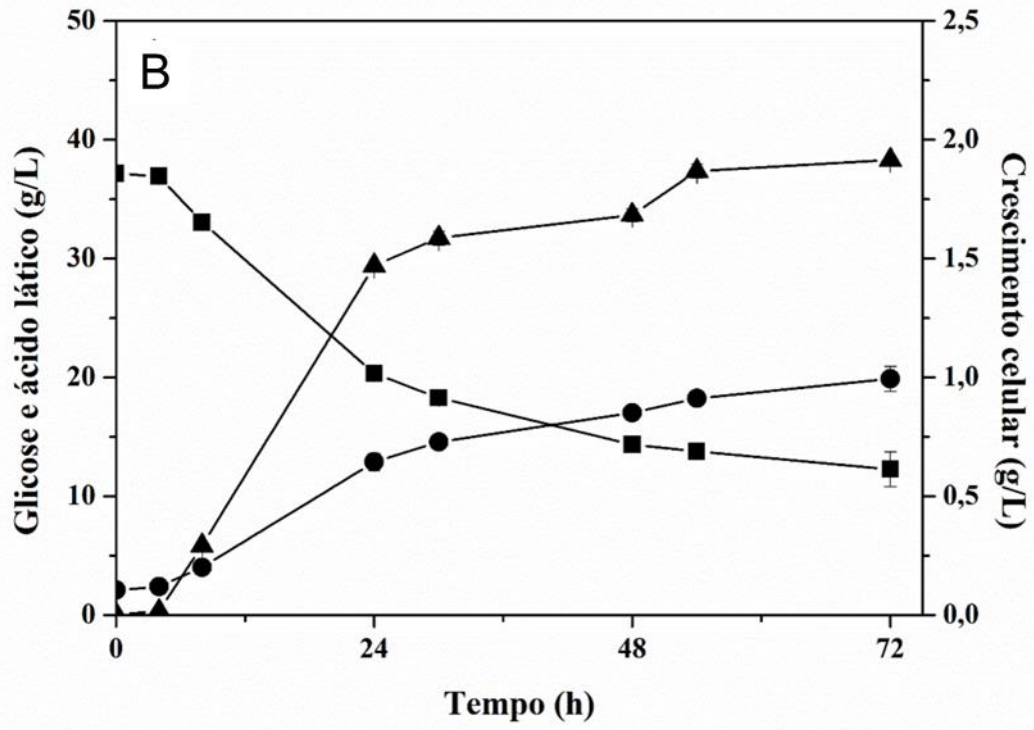




Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 30 °C e diferentes agitações (100 rpm (A), 150 rpm (B) e 200 rpm (C)) usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju inoculado por microrganismos obtidos com 20 h.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os resultados obtidos com a cepa LAB07, observou-se que não houve diferença expressiva para o consumo de glicose nos processos conduzidos nas três rotações estudadas 100, 150 e 200 rpm, obtendo 52%, 52% e 56%, respectivamente, e que não houve consumo de xilose. No estudo realizado com a rotação de 200 rpm foi verificado o maior crescimento celular 2 g/L, contudo a maior produção de ácido láctico foi observada na menor rotação, 100 rpm, obtendo um $P_{\text{máx}}$ de 20,7 g/L. Nos processos conduzidos a 150 rpm e 200 rpm as concentrações máximas de ácido láctico obtidas foram 17,7 g/L e 17,4 g/L, respectivamente. Na Tabela 7 é possível observar melhor os valores dos parâmetros cinéticos, produtividade e $P_{\text{máx}}$ para os resultados obtidos com diferentes rotações para ambas as cepas (LAB07 e LAB14).

Tabela 7 – Fatores de conversão, produção, rendimento e produtividade de ácido láctico pelas cepas *L. plantarum* LAB07 e LAB14 do hidrolisado do bagaço de caju utilizando diferentes rotações. Letras diferentes em uma mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes.

Rotação (rpm)	<i>L. plantarum</i> LAB07					<i>L. plantarum</i> LAB14				
	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	P_{MAX} (g/L)	Q_P (g/(L.h))	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	P_{MAX} (g/L)	Q_P (g/(L.h))
100	0,09 ^a	8,7 ^a	0,81 ^a	20,7 ^a	0,43 ^a	0,07 ^a	8,5 ^a	0,63 ^a	18,5 ^a	0,26 ^a
150	0,03 ^b	13,6 ^b	0,34 ^b	17,7 ^b	0,25 ^b	0,08 ^a	13,1 ^b	0,80 ^b	19,9 ^a	0,28 ^a
200	0,08 ^a	8,2 ^a	0,66 ^c	17,4 ^b	0,24 ^b	0,08 ^a	8,0 ^a	0,62 ^a	18,4 ^a	0,26 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor.

No estudo utilizando a cepa LAB 14, também não se observou o consumo total de glicose, como ocorreu na LAB07, porém o consumo foi maior, 61%, 62% e 63% para as rotações de 100, 150 e 200 rpm, respectivamente. A maior produção de ácido láctico foi obtido a 150 rpm, contudo não houve diferença estatística significativa se comparada a uma menor rotação (100 rpm), mesmo comportamento apresentado pela cepa LAB07. Esse comportamento é explicado pelo tipo de metabolismo da bactéria *L. plantarum*.

L. plantarum e boa parte das bactérias lácticas são capazes de crescer sem a presença de oxigênio e produzir ácido láctico pela via Embden-Meyerhof-Parnas

(EMP). Apesar dos processos serem conduzido sem aeração, a transferência de oxigênio no reator é favorecida pelo processo de agitação, e em condições aeróbicas esses microrganismos podem catabolizar o piruvato, sintetizando o acetato pela enzima acetato quinase com a produção de ATP (HICKEY *et al.*, 1983). O acúmulo de acetato em vez de lactato pode ter um efeito benéfico na célula, garantindo a homeostase do pH e a sobrevivência durante o crescimento da fase estacionária (TSENG *et al.*, 1991), mas diminui a produção de ácido lático.

Desta forma o meio não foi aerado, pois uma concentração elevada de oxigênio dissolvido pode interferir no crescimento celular e na produção de ácido lático de alguns microrganismos (SOUZA *et al.*, 2017). Então, uma menor agitação favoreceu a produção do ácido de interesse, sendo que se faz necessário agitar para ter uma melhor homogeneidade no meio reacional, melhorar a fluidodinâmica do processo e manter as mesmas condições em qualquer parte do reator.

Mesmo que em 150 rpm tenha sido observada uma produção um pouco superior de ácido lático em relação a 100 rpm, após a realização do Teste de Tukey com nível de significância igual a 5%, foi percebido que não houve diferença significativa para produção de ácido lático nestas rotações. Desta forma, constatou-se que a rotação de 100 rpm foi considerada a mais eficiente para o bioprocessamento, pois além de consumir menos energia, provoca menos danos as células dos microrganismos durante a bioprodução.

É reportado na literatura que alguns microrganismos consomem tanto a glicose quanto a xilose, conseguindo assim produzir mais ácido lático, logo aumentando a eficiência do processo (ALVES-FERREIRA *et al.*, 2022; MA *et al.*, 2016). Tais microrganismos conseguem utilizar a xilose como fonte de carbono por duas rotas, pela Via da Pentose Fosfato (PPP) e pela Via Fosfocetolase (PKP) (SUN *et al.*, 2021). O fato do metabolismo das cepas de *L. plantarum* LAB07 e LAB14 ser homofermentativo, ou seja, só conseguirem converter glicose em ácido lático, resultou no meio uma quantidade significativa de xilose, pois tais microrganismos não conseguem metabolizar pentoses. De la Torre *et al.* (2019) explicam que tal metabolismo, das bactérias lácticas homofermentativas, ocorre pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), também chamada de via glicolítica. Nesse estudo

observou-se que a glicose não foi inteiramente consumida devido ao fato de o aumento da concentração de ácido láctico provocar a diminuição do pH e a redução do crescimento celular.

Comparando os diversos estudos relatados na literatura com o uso de resíduos lignocelulósicos, esse estudo apresentou altos valores de concentrações de ácido láctico ao utilizar o hidrolisado do bagaço de caju como matéria-prima e os microrganismos LAB 07 e LAB 14, mesmo sem consumir xilose. Por exemplo, a produção de ácido láctico a partir do hidrolisado da borra de café, usando uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, forneceu 2,7 g/L de ácido láctico (KIM *et al.*, 2019). Nos experimentos relatado por Cizeikiene *et al.* (2018), o hidrolisado enzimático da palha de trigo e a combinação de várias cepas do gênero *Lactobacillus* foram utilizadas no processo para produzir ácido láctico e uma concentração máxima de 4,94 g/L foi alcançada. A utilização do melão de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de ácido láctico por uma linhagem de *L. rhamnosus* proporcionou uma produção de ácido láctico de 16,5 g/L (SENEDESE *et al.*, 2015). O hidrolisado de cana-de-açúcar também foi utilizado como meio de cultura para a produção de ácido láctico por uma cepa de *L. lactis*, obtendo uma concentração de 10,9 g/L (LAOPAIBOON *et al.*, 2010).

Desta forma, devido ao hidrolisado ser deficiente em fontes de nitrogênio, faz-se necessária um estudo sobre como a suplementação pode ser analisada visando aumentar mais ainda a produção de ácido láctico, sendo os ensaios realizados na rotação escolhida de 100 rpm.

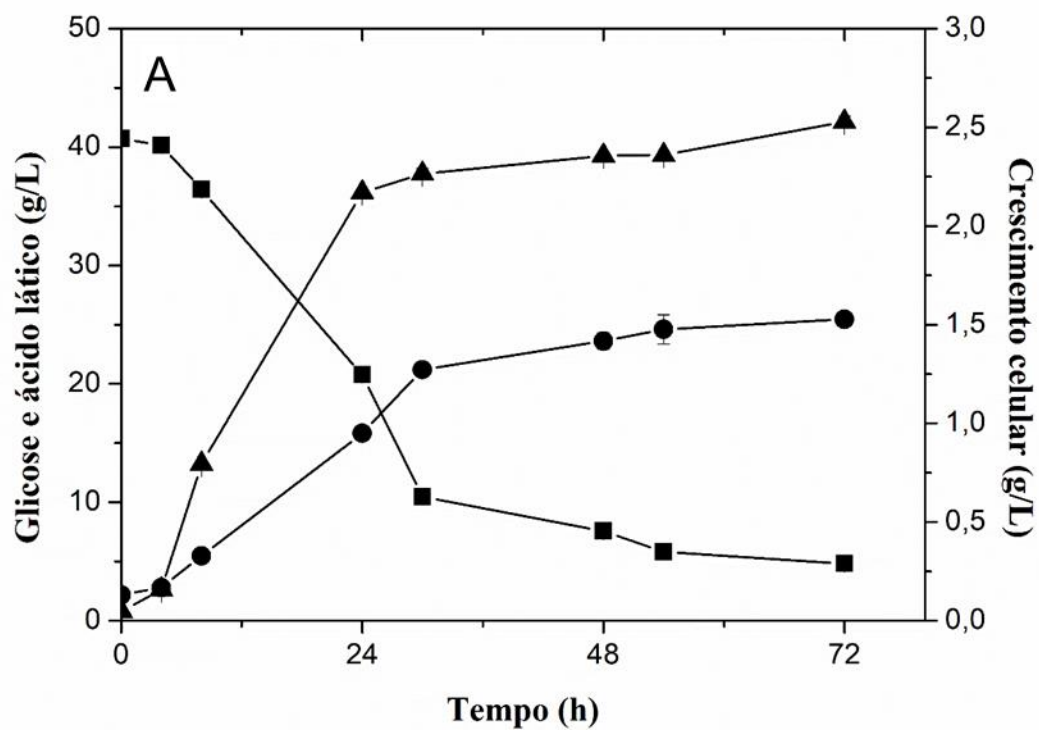
4.3.4 Avaliação das fontes de nitrogênio na produção de ácido láctico

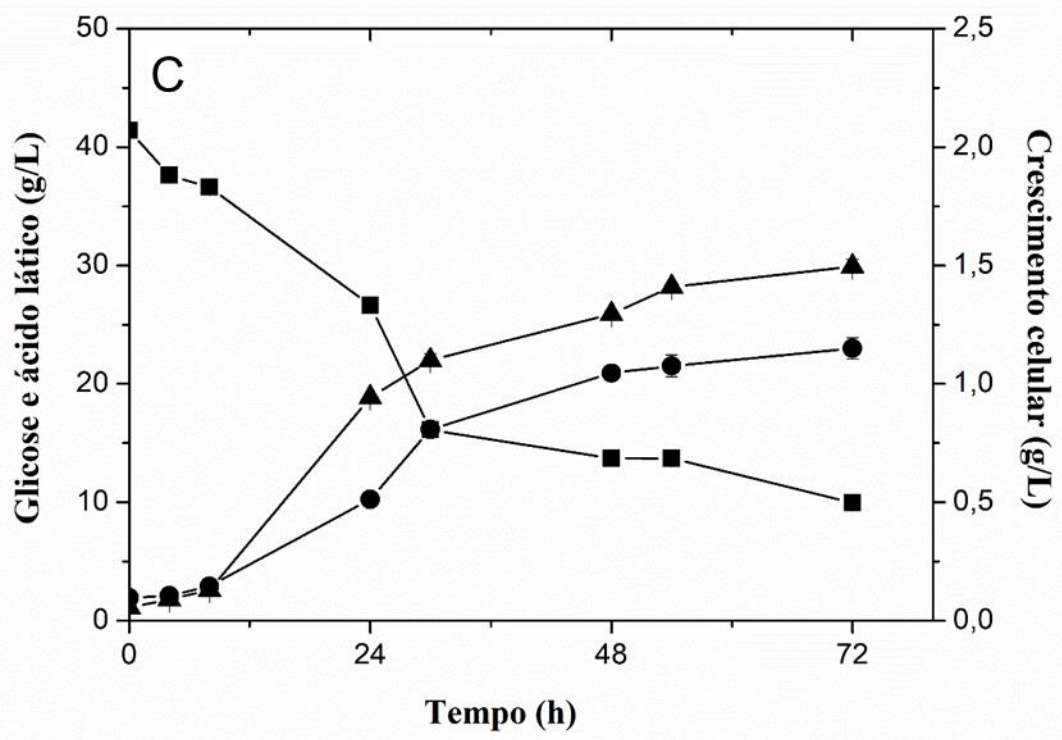
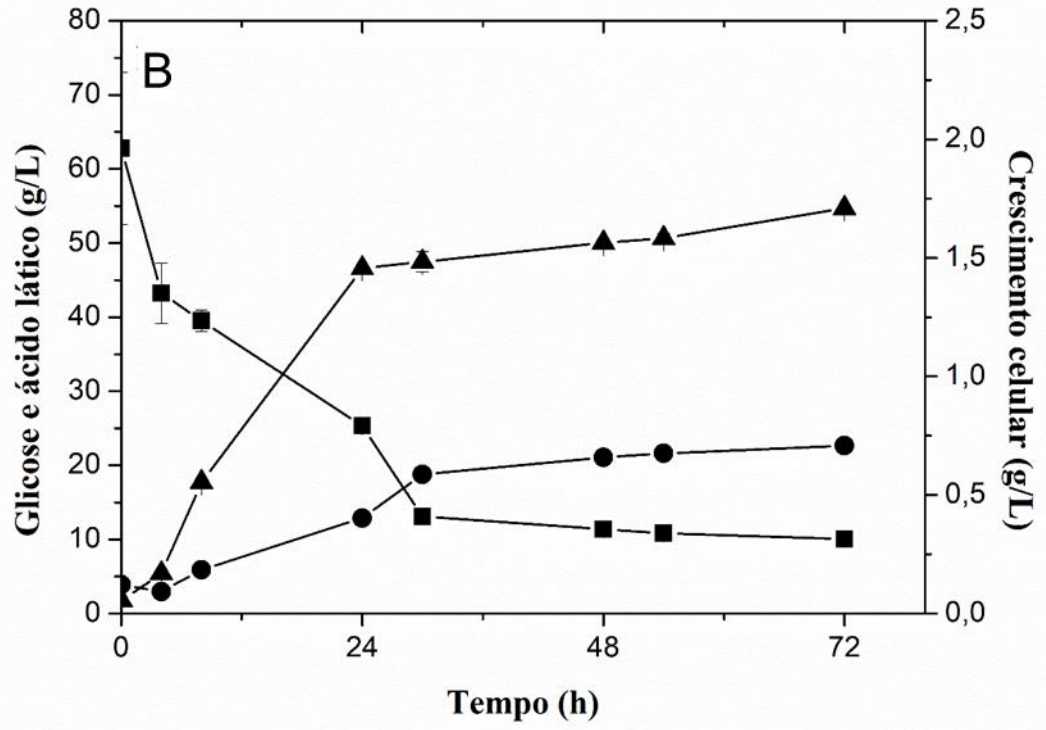
Após a determinação da melhor rotação (100 rpm) para ambas as cepas LAB07 e LAB 14, fez-se necessário um estudo sobre a utilização de fontes de nitrogênio. Existem diferentes tipos de fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas, desde substâncias orgânicas como sementes, extrato de levedura e peptona como, também, substâncias inorgânicas, por exemplo, nitrato de amônio e sulfato de amônio (THAKUR *et al.*, 2019). Além de uma fonte de carbono, as BALS

também precisam de uma fonte de nitrogênio e uma grande variedade de vitaminas e minerais para manter o crescimento celular e a produção de ácido láctico, sendo reportado que as BALs estão normalmente associadas a meios de cultura ricos em nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2018). É observado na literatura diversos estudos sobre a adição de fontes de nitrogênio em resíduos visando um aumento na concentração de ácido láctico (OVERBECK *et al.*, 2016; IZAGUIRRE *et al.*, 2019; THAKUR *et al.* 2019; MICHALCZYK *et al.*, 2021). A fonte de nitrogênio mais citada na literatura em processos que envolvem a fermentação láctica tem sido o extrato de levedura, contudo o uso dessa fonte pode afetar economicamente o processo, dificultando sua utilização a nível industrial (ALTAF *et al.*, 2007; PEJIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, avaliou-se a influência da suplementação do hidrolisado do bagaço de caju com fontes de nitrogênio na produção de ácido láctico pelas cepas LAB07 e LAB14. Os resultados dos ensaios usando o HBC suplementado com 5 g/L das fontes de nitrogênio, extrato de levedura, sulfato de amônio e ureia, estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

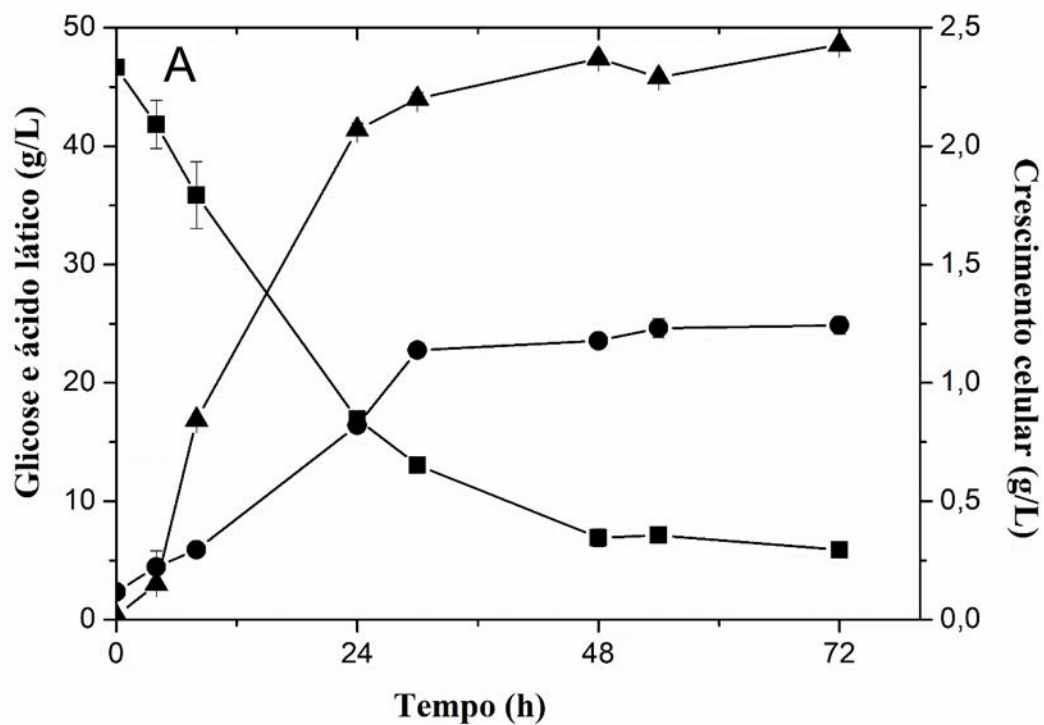
Figura 11 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 30 °C e 100 rpm usando *L. plantarum* LAB 07 e o meio hidrolisado do bagaço de caju, inoculado por microrganismos obtidos com 24 h, e suplementando com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 5 g/L: extrato de levedura (A), sulfato de amônio (B) e Ureia (C).

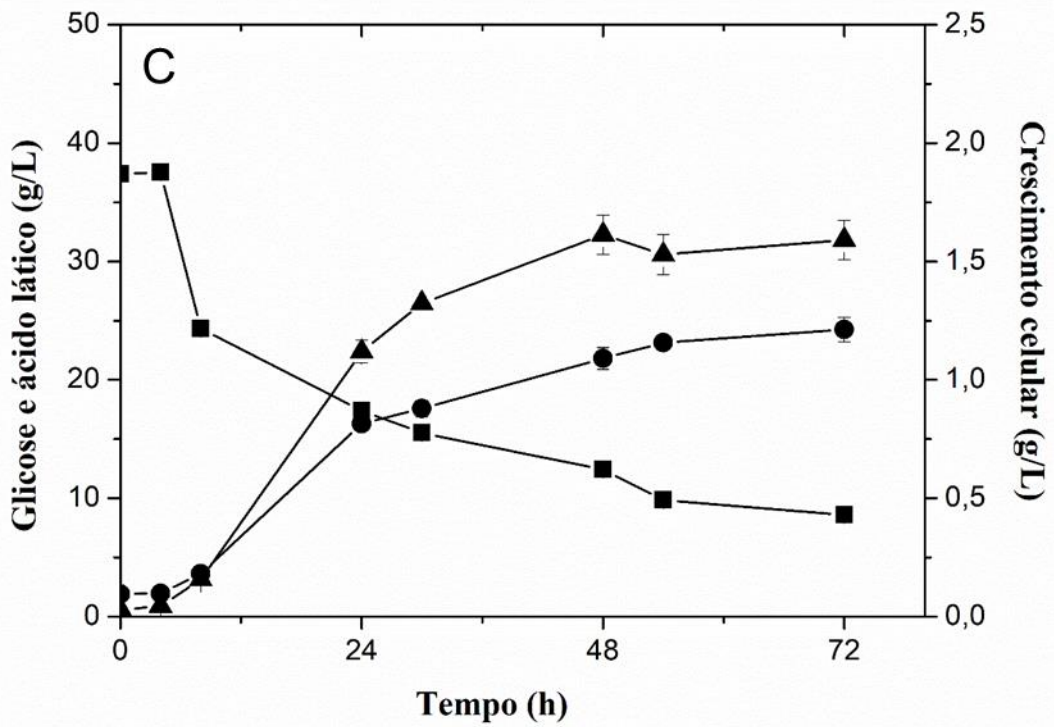
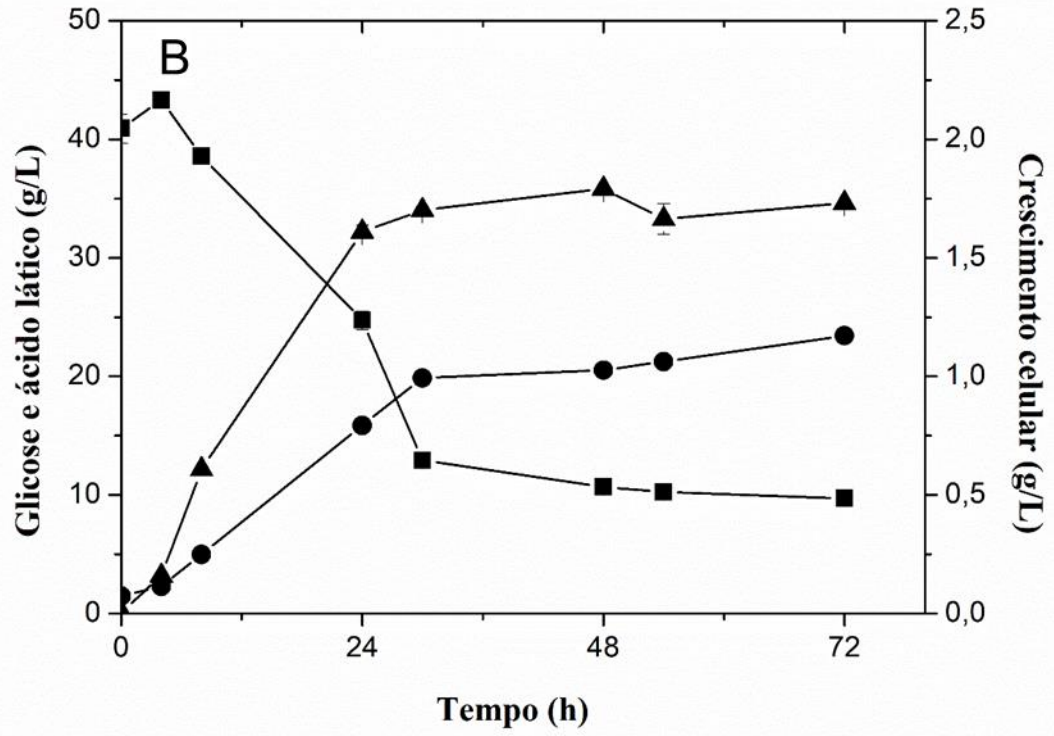




Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Perfil das concentrações celular (▲), de glicose (■) e ácido láctico (●) durante o bioprocesso a 30 °C e 100 rpm usando *L. plantarum* LAB14 e o meio hidrolisado do bagaço de caju, inoculado por microrganismos obtidos com 20 h, e suplementando com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 5 g/L: extrato de levedura (A), sulfato de amônio (B) e Ureia (C).





Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados expostos nas Figura 11 A, B e C, a adição de fontes de nitrogênio nos experimentos realizados com hidrolisado bagaço de caju e a cepa LAB 07 resultou num incremento na produção de ácido láctico. A maior produção do ácido de interesse ocorreu no meio suplementado com extrato de levedura, obtendo 25,3 g/L. O extrato de levedura é um meio mais rico em nutrientes, composto por diversas proteínas e aminoácidos, que podem ter favorecido a produção do ácido láctico. Nos meios suplementados com ureia e sulfato de amônio a concentração de ácido láctico produzida foi de 24,3 g/L 22,6 g/L, respectivamente, indicando que o microrganismo produzia mais no meio com fontes de nitrogênio de origem orgânica do que com inorgânica.

Utilizando a cepa LAB 14, também foi observado um incremento na produção de ácido láctico ao adicionar fontes de nitrogênio (Figura 12). Foi constatado que a maior produção de ácido láctico ocorreu também no meio suplementado com extrato de levedura, seguido de ureia e por fim sulfato de amônio, com concentrações iguais a 24,0 g/L, 24,3 g/L e 23,4 g/L, respectivamente. O meio MRS apresenta uma quantidade de nitrogênio igual a 3,45 g e uma relação C/N igual a 2,32. O meio estudado contendo ureia apresenta 1,16 g de nitrogênio e uma relação C/N igual a 13,68, o sulfato de amônio apresenta 0,53 g e relação C/N igual a 30,10, por fim o meio com extrato de levedura apresenta 0,75 g de nitrogênio e a relação C/N igual a 21,26. Todos esses cálculos foram realizados considerando 5 g/L de fonte de nitrogênio. Desta forma, como extrato de levedura e ureia apresentaram maiores quantidades de nitrogênio e uma maior relação C/N foram o que apresentaram também maior produção de ácido láctico indicando a importância da adição de nitrogênio ao meio.

A Tabela 8 fornece os valores $P_{\text{máx}}$ e da produtividade obtidos por ambas as cepas nos ensaios sem (controle) e com suplementação de fontes de nitrogênio. Foi possível concluir que o controle apresentou uma menor produtividade se comparado aos ensaios realizados com fonte de nitrogênio, a produção de ácido láctico com essas fontes foi também superior apresentando valores de 24,3 g/L ao

utilizar ureia enquanto com controle obteve 20,7 g/L em estudos realizados com a cepa LAB 07, indicando um aumento de 17,4%.

Já com a cepa LAB 14 a ureia apresentou os maiores valores tanto de $P_{\text{máx}}$ (24,3 g/L) quanto de produtividade (0,34 g/(L.h)), quando comparados com o controle (sem fonte de nitrogênio). Contudo ao analisar a produção de ácido láctico para ambas as cepas é possível observar que as concentrações deste ácido obtidas no meio suplementado com extrato de levedura ou ureia apresentaram valores estatisticamente iguais com nível de significância de 95% (Tabela 8).

A adição de quaisquer fontes de nitrogênio em ambos os microrganismos resultou num aumento significativo da concentração de ácido láctico ao ser comparado com o bioprocesso conduzido sem a adição dessa fonte.

Observando os dados de produção para a cepa LAB 07, foi possível constatar que a suplementação com fontes de nitrogênio ocasionou no aumento da concentração de ácido láctico igual a 22,2% para o extrato de levedura, 9,4% para o sulfato de amônio e 17,4% para a ureia. Os melhores resultados foram obtidos com extrato de levedura e ureia, não apresentando uma diferença significativa, com um nível de significância de 95%.

A produção de ácido láctico pela cepa LAB 14 também apresentou um incremento igual a 34,6% para o extrato de levedura, 26,5% para o sulfato de amônio e 31,4% para a ureia ao suplementar o meio com fontes de nitrogênio. Observou-se que as três fontes analisadas apresentaram valores estatisticamente semelhantes de acordo com o Teste de Tukey com 95% de significância.

Thakur *et al.* (2019) estudaram a produção de ácido láctico a partir de resíduos agroindustriais suplementados com licor de maceração de milho (CSL) como fonte de nitrogênio. Eles também observaram que a suplementação com 25 mL/L ou 2% (m/m) aumentou a produção de ácido láctico. Os aminoácidos também são relatados como fontes promissoras de nitrogênio para a produção de ácido láctico (OVERBECK *et al.*, 2016), porém são mais caros para serem utilizados em um bioprocessos.

Tabela 8 - Concentração e produtividade de ácido láctico obtidas pelas cepas *L. plantarum* LAB07 e LAB14 usando hidrolisado do bagaço de caju suplementado com diferentes fontes de nitrogênio nas melhores condições estabelecidas (LAB 07: tempo de inóculo 24 h, temperatura 30 °C e rotação 100 rpm; LAB 14: tempo de inóculo 20 h, temperatura 30 °C e rotação 100 rpm). Letras diferentes em uma mesma coluna representa resultados estatisticamente diferentes.

Microrganismo	Fonte de nitrogênio	P_{max} (g/L)	Q_P (g/(L.h))
<i>L. plantarum</i> LAB07	Controle	20,7 ± 0,1 ^a	0,28 ^a
	Extrato de levedura	25,3 ± 0,4 ^b	0,35 ^b
	Sulfato de amônio	22,6 ± 0,4 ^c	0,31 ^c
	Ureia	24,3 ± 1,0 ^{b,c}	0,34 ^{b,c}
<i>L. plantarum</i> LAB14	Controle	18,5 ± 0,3 ^a	0,26 ^a
	Extrato de levedura	24,9 ± 0,7 ^b	0,35 ^b
	Sulfato de amônio	23,4 ± 0,3 ^b	0,33 ^b
	Ureia	24,3 ± 1,0 ^b	0,34 ^b

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para uma melhor avaliação da suplementação do hidrolisado do bagaço de caju com uma fonte de nitrogênio, foi realizada uma análise de custo para verificar o impacto econômico na adição de fonte de nitrogênio na formulação do meio de cultura.

O custo para obter o hidrolisado do bagaço de caju sem a suplementação com fonte de nitrogênio foi calculado usando os custos da matéria-prima (bagaço de caju) e dos insumos, ácido sulfúrico e de hidróxido de cálcio, utilizados na hidrólise do bagaço de caju e no ajuste do pH do hidrolisado, respectivamente. Para os demais meios de cultura foi adicionado o custo com a fonte de nitrogênio. Os cálculos foram realizados para obter 1 litro de meio de cultura. Não foram incluídas questões como custo energético dos equipamentos pois este seria o mesmo para

todos os estudos e o foco era avaliar apenas as fontes de nitrogênio, sendo determinados apenas os custos com os componentes da formulação do meio de cultura.

O custo para obter o hidrolisado do bagaço de caju (HBC) sem suplementação com fonte de nitrogênio foi 0,62 US\$/L, e os custos do HBC suplementado com ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura foram 0,65 US\$/L, 0,68 US\$/L e 1,47 US\$/L, respectivamente. O custo para produzir um litro do meio MRS foi 5,06 US\$/L. Devido ao meio MRS ser bastante complexo, sendo formulado com diversos insumos desde fontes de nitrogênio, a sais e açúcares, o mesmo apresenta o maior valor de custo dentre os meios estudados.

Desta forma, ao realizar uma comparação entre o meio MRS e o HBC, percebe-se a importância da utilização de materiais lignocelulósicos, no caso o bagaço de caju, como substratos renováveis para a produção de bioprodutos. Baseado nos resultados já apresentados, constatou-se que o hidrolisado desse resíduo da agroindústria pode ser utilizado como fonte de nutrientes para a produção de ácido láctico e ainda apresenta um menor custo comparado a um dos meios complexos formulados mais citados na literatura para a obtenção do ácido de interesse.

Como mostrado na Tabela 9, em relação a adição de fontes de nitrogênio ao HBC, tem-se que a adição de extrato de levedura é a fonte de nitrogênio que mais encarece o processo de produção de ácido láctico. E ao analisar o custo da produção de ácido láctico (CPAL) percebe-se que para a cepa LAB07 apenas a ureia apresentou CPAL inferior ao HBC, indicando que é viável economicamente a adição da mesma na produção de ácido láctico no qual o CPAL da ureia foi de 0,027 US\$/g e o custo HBC igual a 0,030 US\$/g. Já com a cepa LAB14 tanto ureia como sulfato de amônio apresentaram valores menores que o custo do HBC, contudo novamente a ureia apresentou o menor valor, CPAL HBC foi igual a 0,033 US\$/g, CPAL do sulfato de amônio foi de 0,029 US\$/g e o CPAL de ureia foi de 0,027 US\$/g.

Tabela 9 – Relação entre custo, concentração e custo da produção de ácido láctico (CPAL) usando o hidrolisado do bagaço de caju sem e suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, e usando meio MRS.

Microrganismo	Meio	Custo (U\$/L)	Concentração de AL (g/L)	Custo Produção Ácido Láctico (CPAL) (U\$/g)
<i>L. plantarum</i> LAB07	MRS	5,06	20,8	0,243
	HBC	0,62	20,7	0,030
	HBC + Extrato de levedura	1,47	25,3	0,058
	HBC + Sulfato de amônio	0,68	22,6	0,030
	HBC + Ureia	0,65	24,3	0,027
	MRS	5,06	19,58	0,258
	Padrão	0,62	18,5	0,033
<i>L. plantarum</i> LAB14	BC +	1,47	24,9	0,059
	BC + Extrato de levedura	0,68	23,4	0,029
	Sulfato de amônio			
	BC + Ureia	0,65	24,3	0,027

Fonte: Elaborado pelo autor.

Desta forma, tem-se que o a adição de ureia como fonte de nitrogênio representa um investimento de apenas 0,03 U\$/L e sua utilização ocasiona uma melhoria na produção de ácido láctico gerando um incremento de produção de 3,6

g/L com a cepa LAB07 e 5,8 g/L com a LAB14, bem como o uso da ureia como fonte de nitrogênio reduz o custo de produção de ácido láctico quando se comparado ao custo de produção sem sua adição.

Desta forma tem-se que a ureia foi a fonte de nitrogênio avaliada considerada a melhor, tanto a partir dos dados estatísticos como economicamente aja visto que sua utilização apresenta um retorno econômico em relação a produção de ácido láctico.

A utilização de HBC + ureia apresentou uma redução nos custos com o meio de 89% com a cepa LAB07 e de 90% com a cepa LAB14, ao serem comparados com o custo envolvido na produção usando o meio MRS. Ou seja, a utilização de ureia ao invés do extrato de levedura resulta numa diminuição dos custos do processo e consegue-se obter concentrações similares de ácido láctico.

Assim selecionou-se a ureia como melhor fonte de nitrogênio devido a produtividade e economicidade ao realizar as análises em ambas as cepas LAB07 e LAB14. E após selecionar a ureia como melhor fonte de nitrogênio para ambas as cepas LAB 07 e LAB 14 e visando uma maior produção de ácido láctico, realizou-se estudos em um biorreator avaliando a influência do controle de pH.

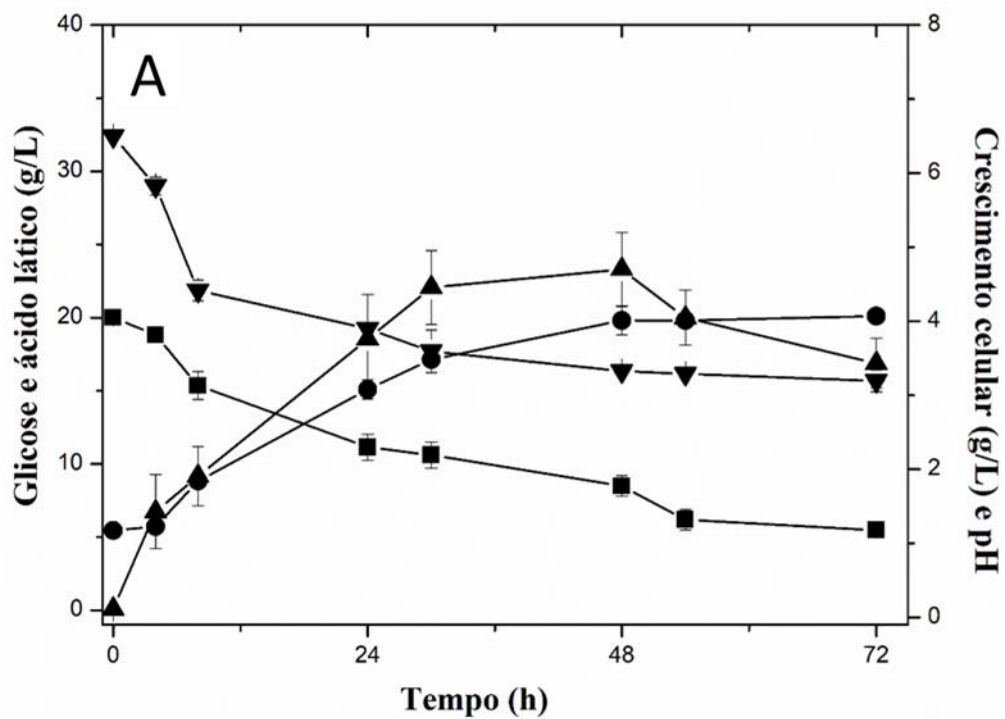
4.3.5 Produção de ácido láctico em biorreator

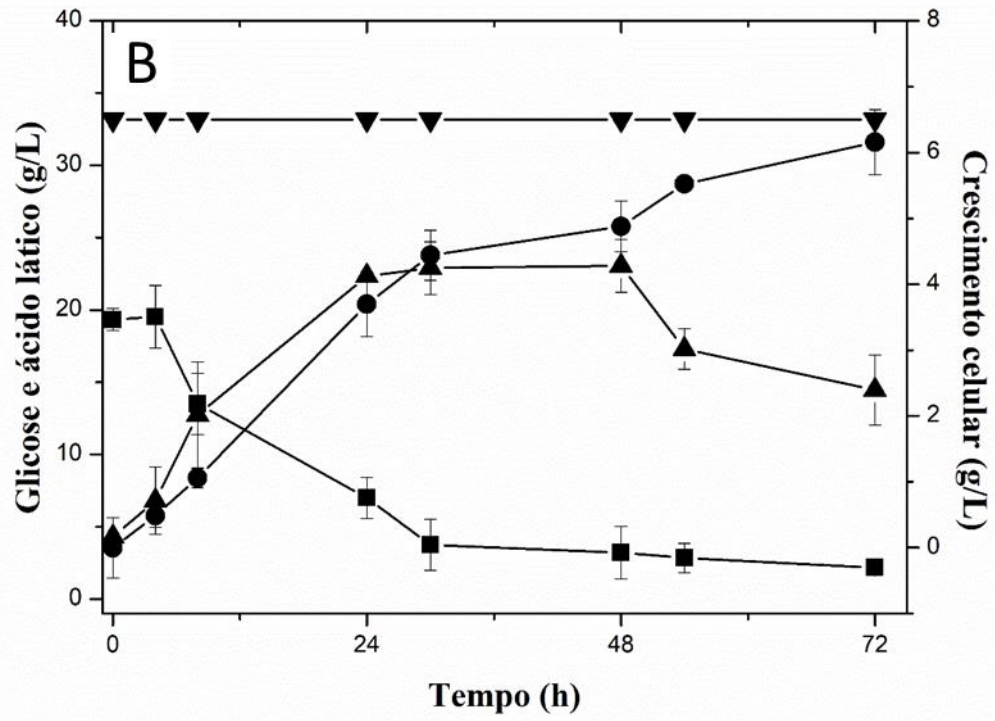
A produção de ácido láctico usando o HBC suplementado com ureia foi conduzido em um biorreator para avaliar a influência do controle do pH durante o processo. Os resultados dessa etapa do estudo estão apresentados nas Figuras 13 e 14 para as cepas LAB07 e LAB14, respectivamente. No ensaio utilizando a cepa LAB07, as condições operacionais realizadas foram: idade de inóculo 24 h, 30 °C, 100 rpm e 5 g/L de ureia como fonte de nitrogênio. Já no ensaio utilizando a cepa LAB14 utilizou-se as seguintes condições: idade de inóculo 20 h, 30 °C, 100 rpm e 5 g/L de ureia como fonte de nitrogênio.

O controle de pH realizado visava fixar o pH do meio reacional em torno de 6,0 sendo considerado o pH ótimo para o crescimento dos microrganismos avaliados para a produção de ácido láctico. Ngouénam *et al.* (2021), Sudhakar e

Dharani, (2022) e Anagnostopoulou *et al.*, (2022) estudaram a produção de ácido láctico utilizando o mesmo microrganismo desse estudo (*L. plantarum*) e realizaram as bioproduções com pHs iguais a 6,6, 6,8 e 6,5, respectivamente.

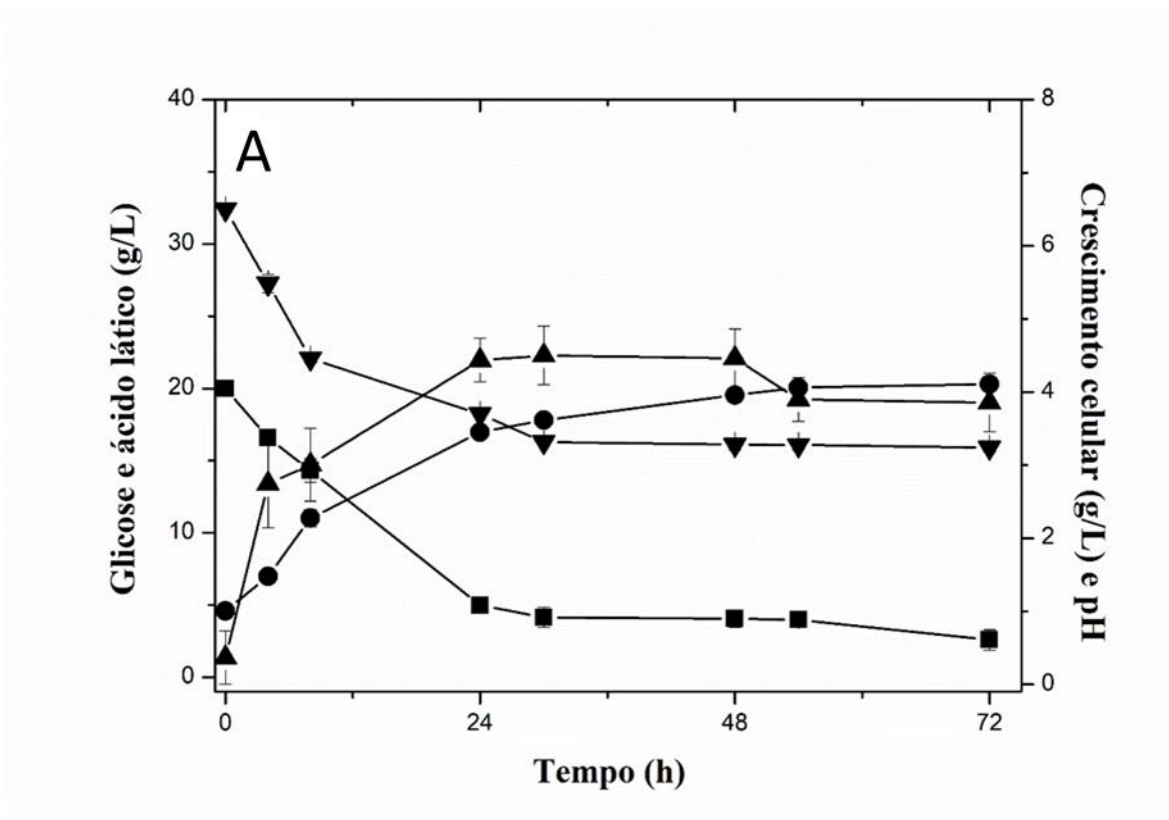
Figura 13 – Influência do controle de pH na produção de ácido láctico por *L. plantarum* LAB 07 do hidrolisado do bagaço de caju suplementado com ureia. Condições de processo: sem controle de pH (A) e com controle de pH (B) a 30 °C e 100 rpm e inóculo cultivado por 24 h. Concentrações de células (▲), glicose (■), ácido láctico (●) e pH (▼).

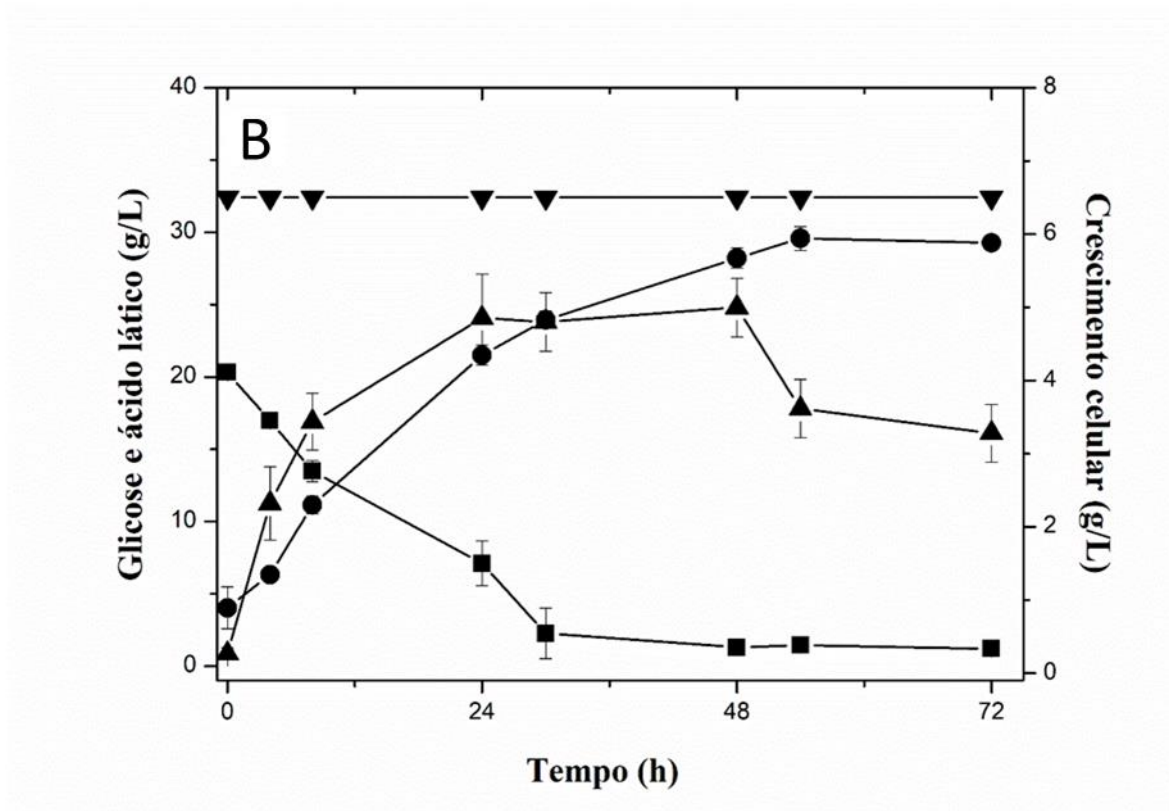




Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Influência do controle de pH na produção de ácido láctico por *L. plantarum* LAB 14 usando o hidrolisado do bagaço de caju suplementado com ureia. Condições de processo: sem controle de pH (A) e com controle de pH (B) a 30 °C e 100 rpm e inóculo cultivado por 20 h. Concentrações de células (▲), glicose (■), ácido láctico (●) e pH (▼).





Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente avaliado os resultados obtidos para a cepa LAB07, observa-se que em nenhum dos processos (sem e com controle de pH) a glicose foi totalmente consumida (Figuras 13 A e 13 B), porém o ensaio com controle de pH, apresentou o maior consumo de glicose, cerca de 88,8% enquanto o estudo sem controle do pH, o consumo deste carboidrato foi 72,7%. Já em relação ao crescimento celular, ambos os estudos apresentaram curvas similares retratando um pico no meio do processo e uma queda de concentração ao final. No ensaio com controle de pH foi observado no tempo de 72 horas um /crescimento celular de 2,4 g/L, enquanto no sem controle de pH foi igual a 3,3 g/L. Nos ensaio sem controle de pH, foi observado que no tempo de 72 horas foi obtida uma concentração de ácido láctico igual a 20,1 g/L enquanto que no ensaio com controle de pH a concentração de ácido láctico produzido foi igual a 31,6 g/L, indicando que ao operar o reator com controle de pH foi possível obter um incremento de 57,2% na produção com a cepa LAB07. Indicando assim que a produção de ácido láctico foi favorecida com o ajuste de pH

enquanto que o estudo sem ajuste de pH ocorreu o favorecimento da formação de novas células.

Semelhante com o que ocorreu para a cepa LAB07, também não ocorreu o completo consumo da glicose no processo usado a cepa LAB14, sem e com controle de pH (Figuras 14 A e 14 B). No ensaio com controle de pH observou-se um consumo de 94% e sem controle de pH igual a 87,1%. Em relação ao crescimento celular, ambos os processos apresentaram curvas similares e concentrações celulares próximas, 3,8 g/L e 3,3 g/L nos estudos realizados sem e com controle de pH no tempo de 72 horas, respectivamente. Como já esperado, o bioprocesso realizado com controle de pH apresentou a maior produção do ácido de interesse, cerca de 29,58 g/L, enquanto sem controle de pH obteve-se 20,31 g/L, ou seja um aumento de 45,6% na produção. Com isso foi possível observar que a adição de base para manter o pH do meio ajustado, para ambas as cepas *L. plantarum* LAB07 e LAB 14, promoveu uma maior conversão do substrato em produto do que em crescimento celular.

A produção de ácido láctico ocasiona a diminuição do pH no meio reacional o que provoca, em alguns casos, a inibição do microrganismo pelo produto, pois em condições de pH baixo é observado alguns problemas como uma diminuição na produção de enzimas, no crescimento celular e no transporte de nutrientes para as células do microrganismo, e também é constatado uma falha na produção de proteínas e no RNA (KLOVRYCHEV *et al.*, 1979).

Comportamento semelhante foi reportado por outros estudos, por exemplo, Mussato *et al.* (2008) avaliaram a produção de ácido láctico a partir de hidrolisados de resíduos de cervejaria e reportaram uma concentração de 13 g/L de ácido láctico sem controlar o pH e 35,54 g/L ao controlar o pH. Esses autores também observaram que ao atingir pH igual a 4,2 não ocorria mais formação do bioproduto de interesse.

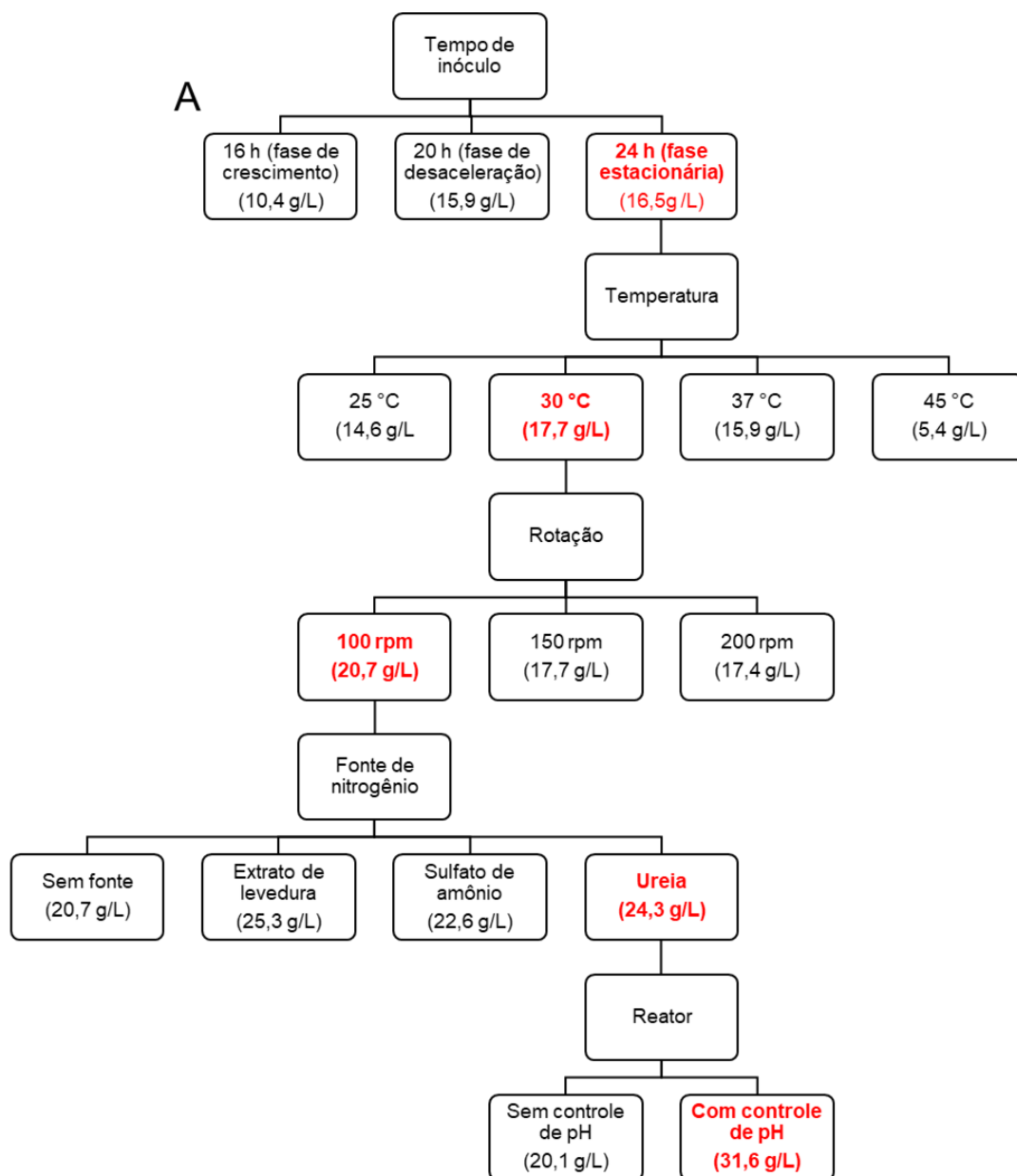
A importância do estudo acerca do controle do pH na bioprodução de ácido láctico existe pois o mesmo pode interferir tanto no crescimento celular como na formação do produto de interesse (SOUZA *et al.*, 2017). Uma mudança, queda, de pH muito acentuada pode provocar rompimento da membrana celular do

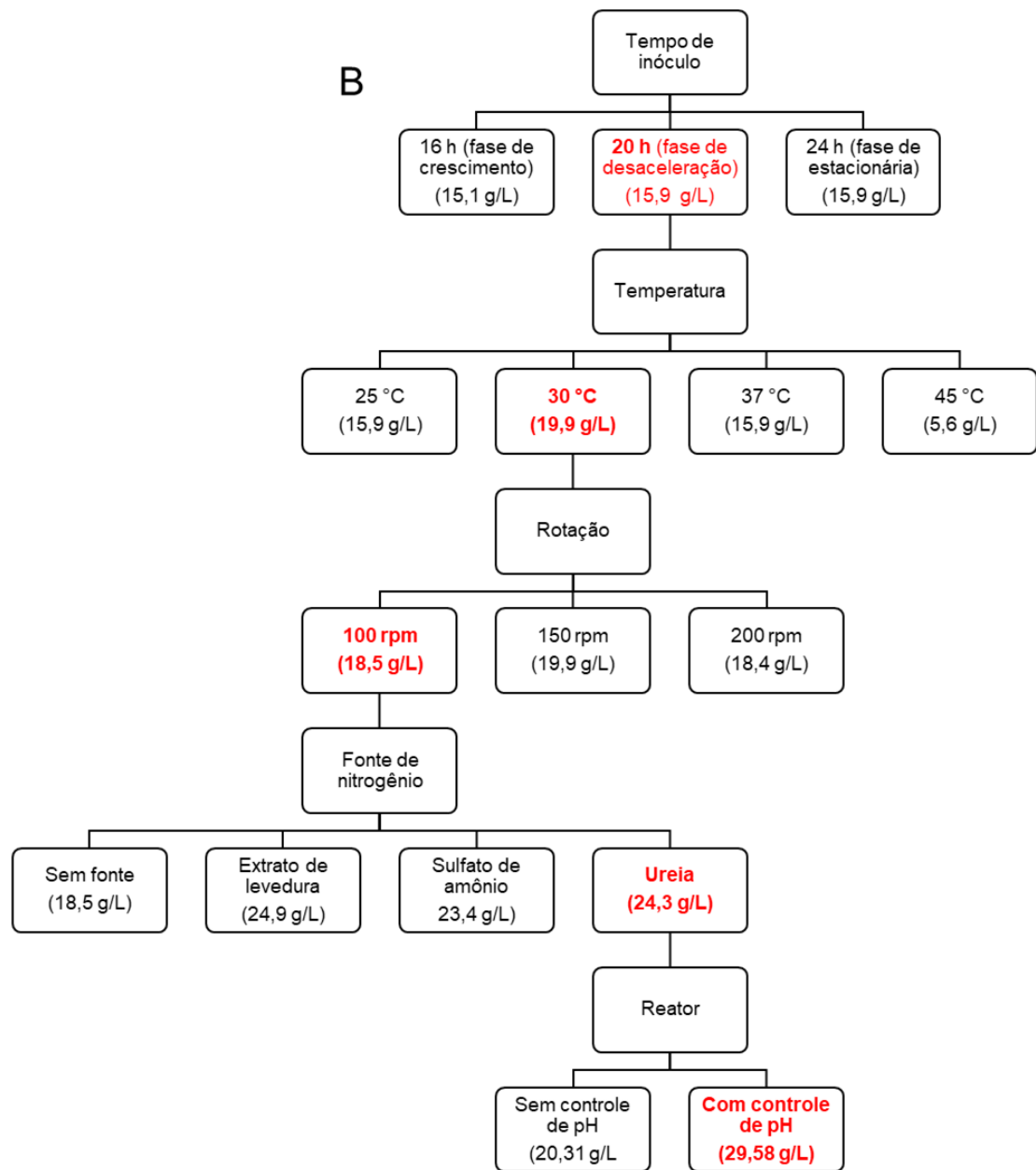
microrganismo pelo acúmulo da concentração de ácido intracelular ocasionando inibição do metabolismo celular pela alta concentração de ácido lático produzido (ABDEL-RAHMAN e SONOMOTO, 2016).

Logo pode-se observar que o bioprocesso realizado com a utilização de um biorreator com controle de pH favoreceu a produção de ácido lático para ambas as cepas no qual foi observado um incremento de 57,2% com a LAB07 e 45,6% com a LAB14.

Na Figura 15 estão representados os fluxogramas dos bioprocessos para esclarecer melhor as condições operacionais estudadas e os melhores resultados estão grifados em vermelho.

Figura 15 – Fluxograma do estudo de parâmetros do processo de produção de ácido láctico a partir do bagaço de caju como fonte de carbono utilizando o microrganismo *L. plantarum* cepa LAB07 (A) e cepa LAB14 (B). As melhores condições foram destacadas em vermelho, com a concentração de ácido láctico obtida expressa entre parênteses, e foram mantidas fixas nos estudos posteriores.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesse sentido, a melhor produção de ácido láctico por *L. plantarum* LAB07 ocorreu com o processo conduzido em bioreator com controle de pH a 30 °C, 100 rpm e usando o hidrolisado de bagaço de caju suplementado com ureia como fonte de nitrogênio, sendo o meio inoculado com um microrganismo no início da fase estacionária obtido com 24 horas (Figura 15 A). E a melhor produção de ácido láctico

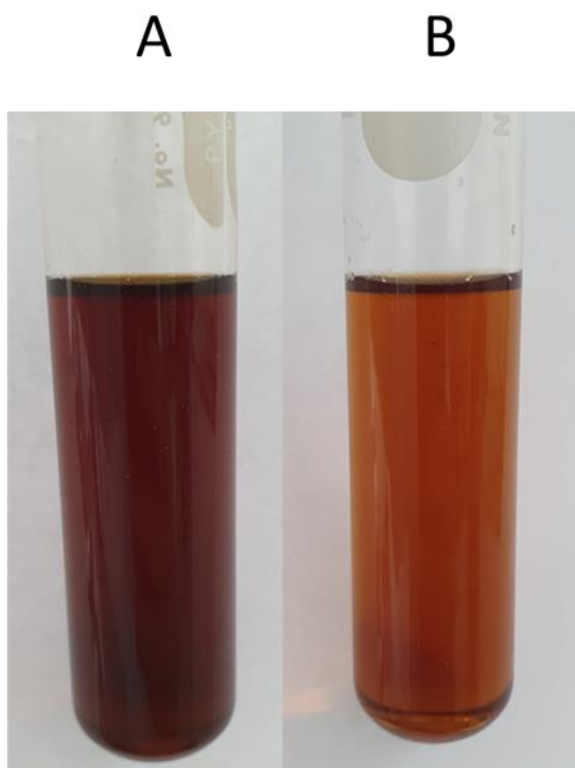
por *L. plantarum* LAB14 ocorreu nas mesmas condições para *L. plantarum* LAB07, porém o meio de cultura deve ser inoculado com o microrganismos na fase de desaceleração obtido com 20 horas (Figura 15 B).

Mesmo que os microrganismos estudados tenham sido isolados de diferentes fontes (molho de pimenta (LAB07) e queijo (LAB14)) e também tenham sido inoculadas no meio HBC, para a produção de ácido láctico, em diferentes fase de crescimento durante a fase estacionaria 24 h (LAB07) e na fase de desaceleração 20 h (LAB14), ambas produziram quantidades similares de ácido láctico a LAB07 apresentou uma produção de 31,6 g/L de ácido láctico enquanto com a LAB14 foi obtido 29,6 g/L, indicando assim que as duas cepas são propícias para a utilização da síntese deste bioproduto.

4.4 Concentração, extração e separação de ácido láctico

Após a produção de ácido láctico em biorreator, controlado o pH durante o processo, realizou-se a clarificação do meio fermentado utilizando carbono ativado, na qual foi observada uma mudança visual na coloração do meio após a clarificação (ver Figura 16), indicando a remoção de compostos que proporcionavam coloração escura ao meio como, por exemplo, compostos aromáticos, 5- hidroximetilfurfural (HMF) e furfural oriundos da hidrólise do bagaço de caju.

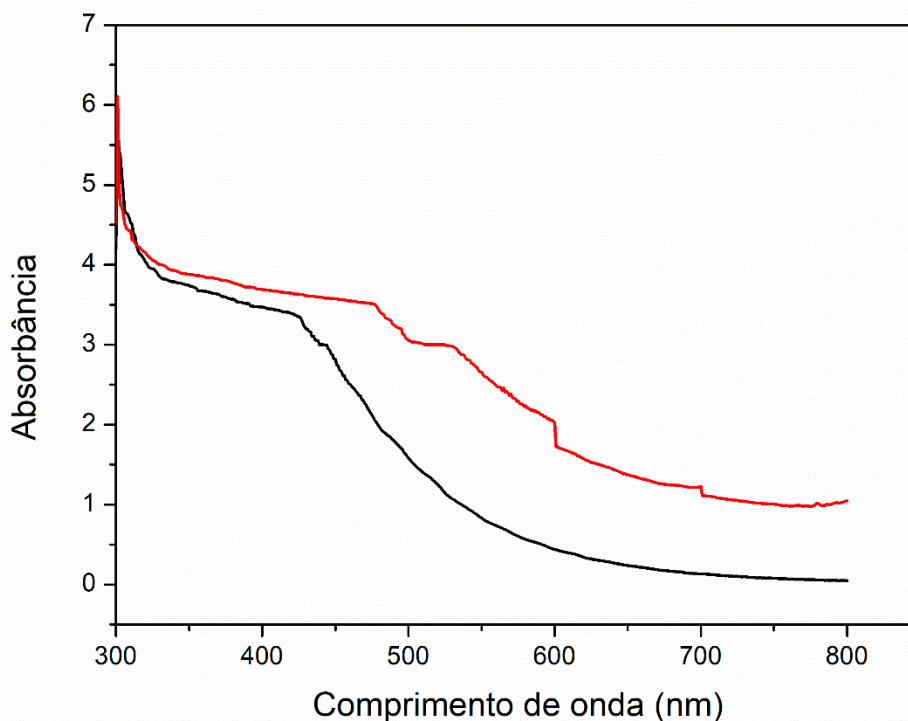
Figura 16 – Imagens do meio fermentado antes (A) e após (B) o processo de clarificação do meio fermentado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, foi também realizada uma varredura de comprimento de onda na faixa de 300 a 800 nm para determinar a variação da absorvância antes e após o processo de clarificação, cujas curvas estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Espectro de varredura do meio fermentado contendo o ácido lático produzido a partir do hidrolisado do bagaço de caju antes (-) e após (-) processo de clarificação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 17 foi observado que a maior absorvância obtida foi no comprimento de onda igual a 300 nm tanto antes (em vermelho) quanto após (em preto) a etapa de clarificação e que o meio clarificado apresentou um menor valor de absorvância para todos os comprimentos de ondas, indicando que o carbono ativado é capaz de adsorver componentes presentes no meio que proporcionavam cor e conseqüentemente uma maior absorvância. Os resultados obtidos são corroborados por outros autores. Albuquerque et al. (2015) avaliaram a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju e constataram que ocorre uma clarificação do meio fermentativo ao utilizar carbono ativado. Além disso, esse método é reportado na literatura como um método eficiente e barato para retirar compostos interferentes do bioprocessamento, como compostos fenólicos, ácido acético, compostos aromáticos, furfural e 5- hidroximetilfurfural (HMF) que

normalmente são encontrados nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos (CANILHA *et al.*, 2008; TADA, KANNO e HORIUCHI 2012; MISRA, RAGHUWANSHI e SAXENA, 2013; MUSHTAQ *et al.*, 2013).

Após a clarificação, foi realizada a concentração do meio visando aumentar o teor de ácido láctico em aproximadamente 100 g/L (concentrado 3 vezes) e em seguida o pH da solução foi ajustado para 2. Esse ajuste de pH aumenta a solubilidade do ácido láctico nos solventes orgânicos (1-butanol, 1-octanol, clorofórmio, hexano e tolueno) enquanto aumenta sua polaridade e o coeficiente de partição, tornando a extração líquido-líquido melhor. Na literatura também é relatado estudos sobre extração e separação de ácido láctico em condições de altas concentrações e baixo pH. Baral *et al.* (2021), ao realizarem o estudo sobre a extração com solvente assistida por *salting-out* de ácido L(+) láctico obtido após fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, as concentrações no meio estava na faixa de 40 g/L a 100 g/L e pH aproximadamente igual a 2,5. Concentração inicial de ácido láctico de 55 g/L e pH de 3,6 foram reportados no estudo realizado por Xu *et al.*, (2018), no processo de separação de ácido láctico de soluções sintéticas e da mistura diretamente derivada de palha de milho por extração aquosa bifásica. Hu *et al.* (2017) conduziram um estudo que partiu de concentrações iniciais de ácido láctico de 350 – 400 g/L e pH igual a 2.

Neste estudo foram conduzidos ensaios de extração líquido-líquido tanto com soluções de ácido láctico PA, como com o ácido láctico produzido a partir do hidrolisado do bagaço de caju nas concentrações de 100 g/L e pH igual 2.

Cunha (2022) avaliou a seleção de 51 diferentes solventes para a extração de ácido láctico em soluções aquosas por meio do modelo UNIFAC. Dentre esses solventes foram analisados hidrocarbonetos como hexano e tolueno, compostos clorados como clorofórmio e álcoois como 1- butanol e 1- octanol. Constatou-se que hidrocarbonetos que contem anel aromático apresentam baixos valores de desempenho no processo extrativo ocasionado pelo arranjo da cadeia. Já hidrocarbonetos de cadeia aberta são capazes de extrair melhor pois a interação é considerada mais forte entre as substâncias de maior cadeia carbônica. Já em relação aos álcoois quanto menor a cadeia melhor a eficiência de extração pois

cadeias apolares grandes acabam por exercer influência negativa na extração de ácido láctico, contudo a eficiência dos álcoois é maior do que a de hidrocarbonetos. Os compostos clorados como o clorofórmio, que apresenta uma baixa polaridade, não favorecem o processo de extração. Desta forma, foram escolhidos esses solventes (1-butanol, 1-octanol, clorofórmio, hexano e tolueno) para avaliar a extração de ácido láctico da fase aquosa (hidrolisado do bagaço de caju) para a fase orgânica.

Na Tabela 10 é possível observar a porcentagem de separação que foi obtida em cada fase para cada solvente utilizado, indicando assim a quantidade final de ácido láctico obtido.

Tabela 10 – Porcentagem de recuperação de ácido láctico por diferentes solventes na separação do ácido láctico comercial e oriundo do bioprocessamento usando o hidrolisado do bagaço de caju por extração líquido-líquido.

ÁCIDO	Solvente	Fase orgânica	Fase aquosa
Ácido láctico comercial	1-butanol	80	20
	1-octanol	42,3	57,7
	clorofórmio	0	100
	hexano	0	100
	tolueno	0	100
Ácido láctico hidrolisado	1-butanol	72,1	27,9
	1-octanol	37,9	62,1
	clorofórmio	1,1	98,9
	hexano	0	100
	tolueno	0	100

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os processos de extração de solvente usando hexano e tolueno não propiciaram a separação do ácido láctico da fase aquosa para a orgânica utilizando ambas as soluções de ácido láctico (comercial ou oriundo do bioprocessamento). Isso pode ser explicado pois tais solventes são apolares e como a molécula de interesse

(ácido láctico) é polar a mesma apresentou maior afinidade com solventes também polares como o caso do 1-butanol e 1-octanol.

Na extração utilizando 1-octanol foi possível separar o ácido láctico da fase aquosa, porém os rendimentos de separação foram de 42,3% para o ácido láctico comercial e 37,9% para o ácido láctico oriundo do bioprocesso.

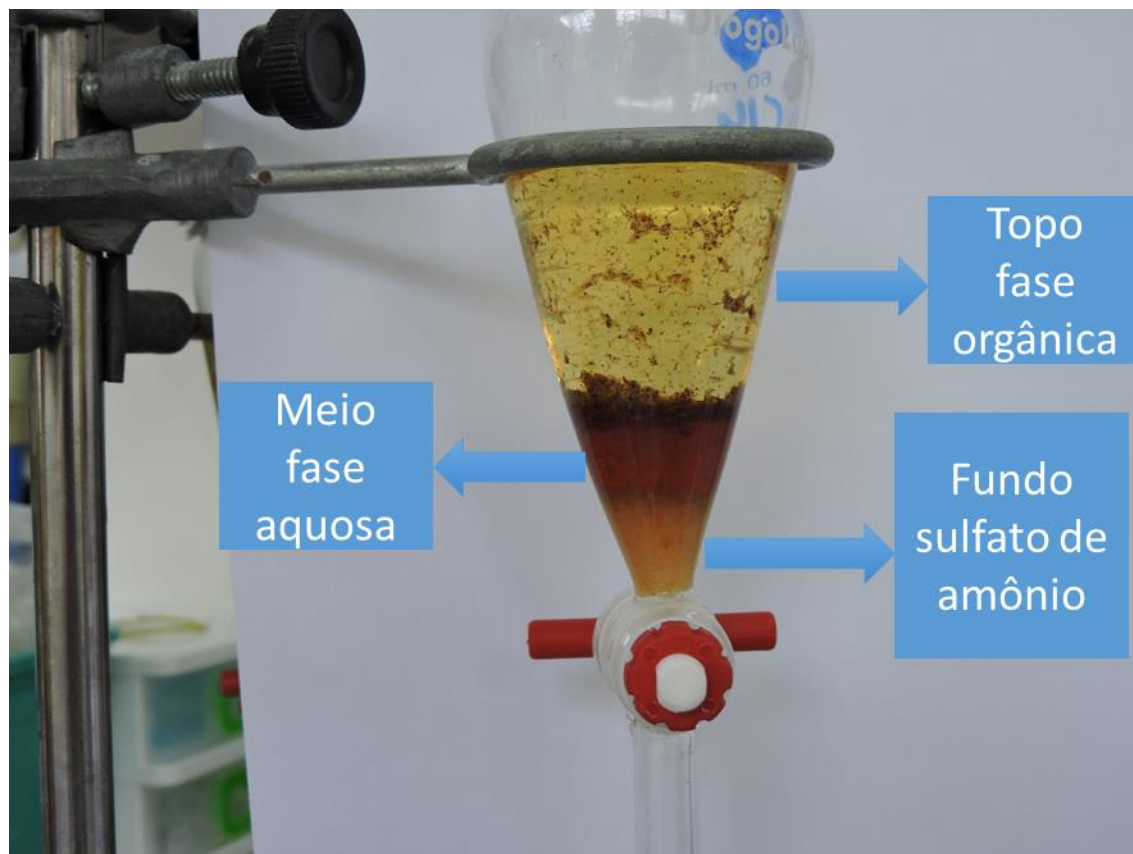
Já nos processos de separação utilizando o 1-butanol como solvente foram obtidos os melhores resultados. Na extração usando o ácido láctico comercial, o butanol conseguiu uma eficiência de separação igual a 80,0% e que diminuiu para 72,1% no processo de extração usando o ácido láctico oriundo do bioprocesso. Esse decréscimo ocorre devido ao meio hidrolisado apresentar além do ácido láctico outros componentes como açúcares não consumidos e outros componentes que podem interferir no processo de separação do ácido láctico da fase aquosa para orgânica.

O 1 – butanol foi considerado melhor solvente comparado com o 1 – octanol, observando um incremento de 89,1% para o processo de extração utilizando o ácido láctico comercial e um incremento de 90,2% utilizando o ácido láctico oriundo do hidrolisado do bagaço de caju.

Outros autores obtiveram diferentes valores ao estudar a separação de ácido láctico por solventes. Hu *et al.* (2017) obtiveram rendimento de recuperação igual a 57,38% do caldo fermentado utilizando acetato de etila como solvente. Beg *et al.* (2022) conduziram um estudo sobre extração líquido-líquido de ácido láctico usando solventes não tóxicos com adição de diferentes óleos, óleo de gergelim, óleo de farelo de arroz e óleo de mostarda, e reportaram eficiências de extração iguais a 22,37%, 16,66% e 12,16%, respectivamente.

Durante o processo de extração de ácido láctico, ocorreu a formação de três fases conforme apresentado na Figura 18. A fase do fundo representa o sulfato de amônio, que acabou precipitando com o tempo, a fase do meio representa fração aquosa do hidrolisado do bagaço de caju e a fração do topo equivale a fase orgânica na qual ficou concentrada a maior parte do ácido láctico.

Figura 18 – Imagem ilustrativa da extração do ácido láctico, produzido a partir do hidrolisado do bagaço de caju, da fase aquosa para fase orgânica utilizando como solvente 1-butanol e com tempo de extração de 2 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização da etapa de extração, ao ácido láctico obtido foi realizada a caracterização do isômero, e após análises realizadas no polarímetro Polax foi possível determinar que para ambas as cepas, LAB07 e LAB14, ocorreu a produção de L – ácido láctico.

4.5 Produção enzimática de poliácido láctico (PLA)

Dentre as estratégias avaliadas para produção de poliácido láctico (PLA), neste trabalho, destacou-se a utilização de enzimas como biocatalisadores, em substituição aos comumente utilizados catalisadores metálicos. O método de

produção do polímero PLA catalisado pela enzima lipase B de *Candida antarctica* (CALB), ocorreu sob condições de 25 °C e 150 rpm por 2 horas, avaliando os solventes tolueno e hexano como meio reacional, bem como diferentes concentrações de ácido láctico (8, 23, 38, 53 e 75 mmol/L) oriundo do HBC.

A Tabela 11 apresenta os resultados da conversão de ácido láctico em PLA. Foi possível observar que a utilização do hexano como solvente não favoreceu a produção, pois em todos os testes analisados não ocorreu mudança na concentração do ácido láctico. No entanto, nos processos usando o tolueno como solvente, foi possível constatar que com uma maior concentração de ácido láctico inicial (53 e 75 mmol/L) ocorreu uma diminuição na sua concentração no decorrer do processo enzimático, indicando assim que a enzima pode ter sintetizado o polímero, não ocorrendo nenhuma variação na concentração de ácido láctico nos experimentos realizados nas menores concentrações (8, 23 e 38 mmol/L).

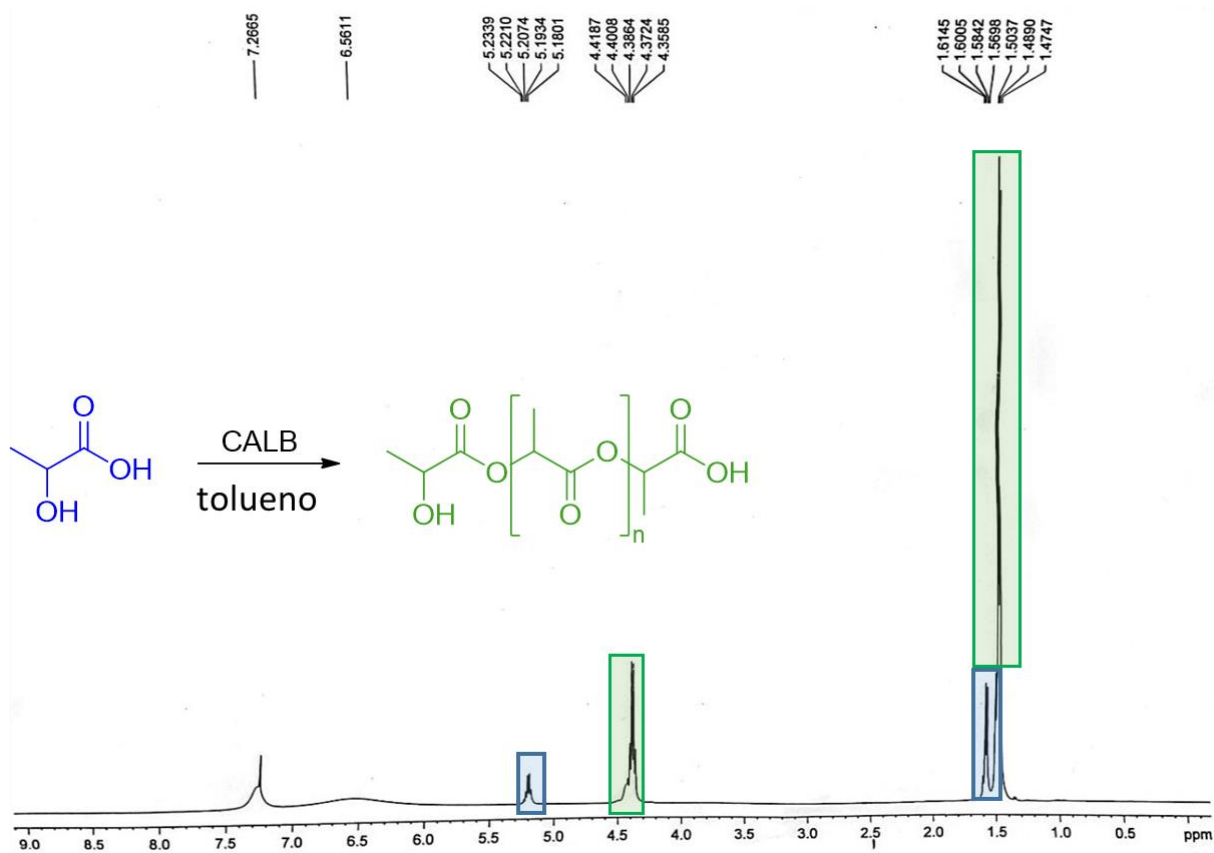
Tabela 11 - Síntese do polímero PLA catalisada pela enzima lipase B de *Candida antarctica* a 25 °C e 150 rpm por 2 horas em diferentes solventes e usando o ácido láctico oriundo do bioprocessos.

Solvente	Concentração de ácido (mmol/L)	Conversão de AL (%)
Hexano	8	0
	23	0
	38	0
	53	0
	75	0
Tolueno	8	0
	23	0
	38	0
	53	3,7
	75	7,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

O PLA produzido foi identificado por espectroscopia de ressonância magnética baseada na identificação dos hidrogênios (RMN de ^1H). De acordo com os resultados apresentados, observou-se que a enzima CALB pode ser usada para produção de PLA, sendo os dados obtidos nesse trabalho suportados pelos dados publicados na literatura (JEON *et al.*, 2013). A Figura 19 apresenta o RMN obtido para o ensaio utilizando tolueno como solvente e com uma concentração de ácido igual a 75 mmol/L. Na análise do espectro de RMN de ^1H observa que ocorreram desvios químicos em δ_{H} 5,22 - 1,47 ppm indicando assim a formação de PLA. Na Figura 19, é possível observar que os grupos CH estão representados em δ_{H} 5,22 - 5,18 ppm e também pode ser constatado a presença de grupos CH_3 nos dupletos em δ_{H} 1,58 - 1,56 ppm. E observando os dados reportados na literatura (SUGANUMA *et al.*, 2019), é possível constatar a concordância dos resultados de deslocamento químico do PLA. Pode-se também analisar que para o deslocamento químico para o ácido láctico, o quarteto em δ_{H} 4,40 - 4,35 ppm representa o CH e o duplete em δ_{H} 1,48-1,47 ppm representa CH_3 . Por fim, foi observado que os resultados experimentais apresentados na Figura 19 estão de acordo com os valores encontrados no banco de dados HMDB (Human Metabolome Database).

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da síntese do PLA por lipase B de *Candida antactica* em tolueno por 2 horas usando o ácido láctico produzido por bioprocesso.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Contudo, poucos estudos são reportados na literatura acerca da utilização de enzimas como biocatalisadores para produção de PLA, não existindo assim muitos dados comparativos. Todavia, foi constada a produção de PLA pela técnica de RMN e tal produção, que ocorre utilizando um biocatalisador enzimático, apresenta-se adequada aos requisitos necessários as mais novas legislações ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 2019), tendo em vista a não utilização de um catalisador químico que gera muitos compostos tóxicos. Esse estudo foi realizado sob condições reacionais mais amenas, contudo em relação a utilização do tolueno como solvente, esse seria um ponto de estudo futuro visando avaliar solventes menos tóxicos, pois os resultados obtidos com tolueno já foram promissores.

5 CONCLUSÃO

Em concordância com os resultados obtidos nesse estudo, foi possível concluir a produção de L- ácido láctico a partir do hidrolisado de bagaço de caju em biorreator, que nas melhores condições operacionais selecionadas de obtenção do inóculo, temperatura, rotação, controlando o pH e adicionando ureia como fonte de nitrogênio obteve concentrações de ácido láctico iguais a 31,6 g/L e 29,58 g/L para as cepas de *Lactobacillus plantarum* LAB 07 e LAB 14, respectivamente.

Constatou-se que o melhor tempo de inóculo foi de 24 h para a cepa LAB07 e 20 h para a cepa LAB14, indicando assim que a cultura em fase de desaceleração de crescimento é mais favorável ao processo de produção do ácido de interesse. Bem como foi possível observar que a maior produção ocorreu a uma menor temperatura, 30 °C, para ambas as cepas e também se constatou que com uma menor rotação 100 rpm era possível produzir mais ácido láctico.

A fonte de nitrogênio escolhida (para ambas as cepas) foi a ureia, pois o hidrolisado suplementado com essa fonte apresentou maior produção se comparado com os estudos sem fonte de nitrogênio e com sulfato de amônio, bem como não houve diferença significativa se comparado com o ensaio que utilizou de extrato de levedura. Além disso a utilização do hidrolisado do bagaço de caju suplementado com ureia apresentou uma redução nos custos com o meio de cultivo de 90%, se comparado com o meio comercial (MRS), condição essa importante tendo em vista a possibilidade de aplicação industrial e destacando o HBC como importante fonte de carbono para produção do bioproduto.

No processo de separação do ácido láctico por extração líquido-líquido, o 1-butanol apresentou melhores resultados, recuperando 80% e 72,1% do ácido láctico, proveniente da fase polar, comercial e o oriundo do bioprocessamento, respectivamente.

Também foi verificado a produção do bioplástico PLA por RMN a partir do ácido láctico produzido em HBC, por reação enzimática com lipase CALB em tolueno, numa reação de 2 horas a 150 rpm e 30 °C, ressaltando a importância desse resíduo agroindustrial na produção de bioprodutos de alto valor agregado e grande aplicação industrial.

Por fim, esta tese apresenta-se como uma rota inovadora para a produção de L-ácido láctico (o mais requerido pelas indústrias para produção do PLA), por duas cepas de *L. plantarum* selvagens, uma isolada do queijo (LAB07) e outra isolada do molho de pimenta (LAB14), utilizando uma fonte de carbono renovável (HBC) e com baixo custo de processo. Também, obteve-se o polímero de ácido láctico por um bioprocessamento sendo conduzido em condições amenas (25 °C, 150 rpm) e utilizando um catalisador não tóxico.

6 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

O desenvolvimento dessa tese de doutorado gerou as seguintes produções científicas:

- Foi publicado um artigo de revisão cujo título foi: “*Polylactic acid production from biotechnological routes: A review*”. Na revista: *International Journal of Biological Macromolecules*;
- Foi submetido um artigo cujo título foi: “*Lactic acid production from cashew apple bagasse, an agro-industrial waste, and its application in the enzymatic synthesis of polylactic acid*”. Na revista: *Process Biochemistry*.
- Foi apresentado um trabalho no 26th *International Congress of Chemical and Process Engineering – CHISA*, que ocorreu em Praga em 2022, cujo título do trabalho foi: “*Cashew apple bagasse as feedstock for biotechnological production of lactic acid*”.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **J. Biotechnol.** v. 156 p. 286–301, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>.

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**. In press, 2013.

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; ZENDO, T.; HANADA, K.; SHIBATA, K.; SONOMOTO, K. Efficient homofermentative l-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 77, p. 1892–1895, 2011b.

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; ZENDO, T.; SHIBATA, K.; SONOMOTO, K. Isolation and characterization of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo l-(+)-lactic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 89, p. 1039–1049, 2011a.

ADACHI, E., TORIGOE, M., SUGIYAMA, M., NIKAWA, J., SHIMIZU, K. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. **J. Ferment. Bioeng.** v. 86, p. 284–289, 1998.

AGRIEXCHANGE, Disponível em: agriexchange.apeda.gov.in/International_Productions/International_Production.aspx?ProductCode=0217, Acessado em: 04/04/2023.

AHMAD, A.; OTHMAN, I.; TARDY, B. L.; HASAN, S. W.; BANAT, F. Enhanced lactic acid production with indigenous microbiota from date pulp waste and keratin protein hydrolysate from chicken feather waste. **Bioresource Technology Reports**. v. 18, 2022.

AHMAD, M. N.; ADENI, D. S. A.; SUHAILI, N.; BUJANG, K. Optimisation of pre-harvest sago frond sap for the production of l-lactic acid using *Lactococcus lactis* IO-1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 43, 2022.

AHRING, B.K.; TRAVERSO, J.J.; MURALI, N.; SRINIVAS, K. Continuous fermentation of clarified corn stover hydrolysate for the production of lactic acid at high yield and productivity, **Biochem. Eng. J.** v. 109, p. 162–169, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.012>

ÅKERBERG, C.; ZACCHI, G. AN Economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresour. Technol.** v. 75, p. 119–126, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00057-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00057-2).

ÅKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 49(6), p. 682–690, 1998. DOI: 10.1007/s002530051232.

ALIBABA, Disponível em: https://www.alibaba.com/product-detail/Wholesale-organic-lactic-acid-80-ood_62462196663.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.7f057HmD7HmDDy. Acessado em 30/11/2022.

ALEXANDRI, M.; HÜBNER, D.; SCHNEIDER, R.; FRÖHLING, A.; VENUS, J. Towards efficient production of highly optically pure d-lactic acid from lignocellulosic hydrolysates using newly isolated lactic acid bacteria. **New Biotechnology**. v. 72, p. 1-10, 2022.

ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; REDDY, G. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L-lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresour. Technol.** v. 98, p. 498–503, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.013.

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; SILVA JUNIOR, I. J.; GONCALVES, L. R. B.; ROCHA, M.V.P. Xylitol production by different yeasts: kinetic study and biosynthesis from cashew apple bagasse hydrolysate. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2022.

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L. JR., J. E. M.; JR., I. J. S.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**. v. 255, p. 33–40, 2015.

ALBUQUERQUE, T. L.; MARQUES JUNIOR, J. E.; QUEIROZ, L. P.; RICARDO, A. D. S.; ROCHA, M. V. P. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 186, p. 933–951, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.074>.

Allied Market Research (AMR), 2015. Polylactic Acid (PLA) Market - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2014 e 2020. United States. www.alliedmarketresearch.com/polylactic-acid-market.

ALVES DE OLIVEIRA, R., KOMESU, A., VAZ ROSSELL, C. E., & MACIEL FILHO, R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**. v. 133, p. 219–239, 2018.

ALVES-FERREIRA, J.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; FERREIRA, A.R.P.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, H.; FERNANDES, M.C. D-Lactic acid production from *Cistus ladanifer* residues: Co-fermentation of pentoses and hexoses by *Escherichia coli* JU15. **Ind. Crops. Prod.** 177(114519), 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114519.

AMRANE A. Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. **J Chem Technol Biotechnol.** v. 80, p. 345–352, 2005.

AMRANE, A., PRIGENT, Y. A novel concept of bioreactor: specialized function twostage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid. **J. Biotechnol.** v. 45, p. 195–203, 1996.

ANAGNOSTOPOULOU, C.; KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; GASPARI, M.; MORLINO, M. S.; ASSIMOPOULOU, A. N.; KOUGIAS, P. G. Valorization of household food wastes to lactic acid production: A response surface methodology approach to optimize fermentation process. **Chemosphere.** v. 296, 2022.

ARMINDA, M.; JOSÚE, C.; CRISTINA, D.; FABIANA, S.; YOLANDA, M. Use of activated carbons for detoxification of a lignocellulosic hydrolysate: Statistical optimisation. **J. Environ. Manage.** 296(113320), 2021 DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113320.

ATILA, F. Lignocellulosic and proximate based compositional changes in substrates during cultivation of *Hericium erinaceus* mushroom. **Scientia Horticulturae.** v. 258, p. 108779, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108779>.

AURAS, R.; LIM, L.T.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H. Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application, first ed., Inc. Jhon Wiley & Sons, New Jersey, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470649848>.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S.; Wright, A. V.; Ouwehand, A. (Eds.). **Microbiological and functional aspects.** New York: Marcel Dekker, 2004.

BAEK, S. H.; KWON, E. Y.; BAE, S. J.; CHO, B. R.; KIM, S. Y.; HAHN, J. S. Improvement of D-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering. **Biotechnology Journal,** v. 12(10), p. 1–26, 2017.

BAI, D.M.; WEI, Q.; YAN, Z.H.; WEI, Q.; ZHAO, X.M.; LI, X.G.; XU, S.M. Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations. **Biochem. Eng. J.** v. 19, p. 47–51, 2004.

BARAL, P.; PUNDI, A.; KUMAR, A.; SINGH, R.; KUMAR, V.; AGRAWAL, D. Salting-out assisted solvent extraction of L (+) lactic acid obtained after fermentation of

sugarcane bagasse hydrolysate. **Separation and Purification Technology**, v. 269, 2021.

BARAUNA, G. S.; PIERUCCI, A.; OLIVEIRA, A.; DUARTE, M. A. T.; DUCK, E. A. R. Estudo da degradação "in vivo" de poli(L-co-D,L-ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica. **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, p. 298 – 306, 2007.

BEG, D.; KUMAS, A.; SHENDE, D.; WASEWAR, K. Liquid-liquid extraction of lactic acid using non-toxic solvents. **Chemical Data Collections**, v. 38, 2022.

BENEVENUTI, C. S. J.; PEREIRA JR, N. Technological forecasting of lactic acid production within the context of biorefinery: Trends and opportunities. **Revista Espacios**, v. 37, p. 10, 2016.

BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; SASS, D. C.; CONTIERO, J. I. (+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47(3), p. 640–646, 2016.

BHUTTO, A.W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A.A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**. v. 122, p. 724–745, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>.

BIDDY, M.J.; SCARLATA, C.; KINCHIN, C. Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential, Golden, CO (UnitedStates), 2016, <http://dx.doi.org/10.2172/1244312>.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.

BOONTIM, N.; KHANONGNUCH, C.; PATHOM-AREE, W.; NIAMSUP, P.; LUMYONG, S. Production of L-Lactic Acid by Thermotolerant lactic acid bacteria. *Chiang Mai Journal of Science*. v. 45, n. 1, p. 68-76, 2018

BOSWELL, C. Bioplastics aren't the stretch they once seemed, **Chem. Mark.Rep.** v. 260, pFR15, 2001.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6537-6542, 2009.

BOYAVAL, P.; CORRE, C.; TERRE, S. 1987. Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis. **Biotechnol. Lett.** v. 9, p. 207–212, 1987.

BUDHAVARAM, N. K.; FAN, Z. (2009). Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulans* strains. **Bioresource Technology**, v. 100(23), p. 5966–5972, 2009.

BUSSA, M.; EISEN, A.; ZOLLFRANK, C.; RODER, H. Life cycle assessment of microalgae products: state of the art and their potential for the production of polylactid acid, **J. Clean. Prod.** v. 213 2019 p. 1299–1312, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.048>

CAMESASCA, L.; MATTOS, J. A.; VILA, E.; CEBREIROS, F.; LAREO, C. Lactic acid production by *Carnobacterium sp.* isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate. **Biotechnology Reports**. v. 31, 2021.

C.-H. Zhou, X. Xia, C.-X. Lin, D.-S. Tong, J. Beltramini, Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels, **Chem. Soc. Rev.** v. 40, p. 55-88, 2021. doi:10.1039/c1cs15124j.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; GIULIETTI, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Clarification of a wheat straw-derived medium with ion-exchange resins for xylitol crystallization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 715-72, 2008.

CAPLICE, E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, **Int. J. Food Microbiol.** v. 50 p. 131–149, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3).

CARR, F.J; CHILL,D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 28, p. 281–370, 2002.

CARRASCO, F.; PAGÈS, P.; GÁMEZ-PÉREZ, J.; SANTANA, O.O.; MASPOCH, M.L. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. **Polym. Degrad. Stabil.** v. 95, p.116–125, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.045>.

CASTRO-AGUIRRE, E.; IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SAMSUDIN, H.; FANG, X.; AURAS, R. Poly(lactic acid)—mass production, processing, industrial applications, and end of life, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 107, p. 333–366, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, **FEMS Microbiology rev** v. 87, p.113-130, 1990.

CHACÓN, M. G.; IBENEGBU, C.; LEAK, D. J. Simultaneous saccharification and lactic acid fermentation of the cellulosic fraction of municipal solid waste using *Bacillus smithii*. **Biotechnol. Lett.**, v. 43, p. 667-675, 2021.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pre-treated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**. v. 5-9, 2008.

CHENEBAULT, C.; MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; ESCUDIÉ, R.; PERCHERON, B. Lactic acid production from food waste using a microbial consortium: Focus on key parameters for process upscaling and fermentation residues valorization. **Bioresource Technology**. v. 354, 2022.

CHENG, Y.; DENG, S.; CHEN, P.; RUAN, R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: A review. **Front. Chem. China**. v. 4, p. 259–264, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11458-009-0092-x>

CHOONUT, A.; PAICHID, N.; YUNU, T.; SANGKHARAK, K. The statistic optimization for lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* using ethanol stillage as sole carbon source in AIP Conference Proceedings (American Institute of Physics Inc.,1775, 201.6 DOI: 10.1063/1.4965139.

CIZEIKIENE, D; JUODEIKIENE, G; DAMASIUS, J. Use of wheat straw biomass in production of L lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 185-191, 2018.

COELHO, L. F.; DE LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C.M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* Lmism6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 27 - 36, 2011 b.

CORREIA, J. A. C.; SILVA, J. S.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Different design configurations of simultaneous saccharification and fermentation to enhance ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide applying the biorefinery concept. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 2767-2780, 2022.

CORREIA, J. A. DA C. Produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino utilizando o processo de sacarificação e fermentação simultânea: avaliação de configurações e parâmetros. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2017.

CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresour Technol**, v. 179, p. 249–259, 2015

CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Process Biochemistry**, v. 139, p. 249-256, 2013.

CORREIA, J., ROCHA, M., GONÇALVES, L. (2012), —Efeito da combinação de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado com peróxido de hidrogênio para produção de etanol. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Búzios.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*, **Biores. Technol.** v. 102, p. 1831-1836, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.063>.

CUNHA, R. S. Seleção de solventes para a extração do ácido láctico em soluções aquosas por meio do modelo UNIFAC. 2022. 75p. Trabalho final de curso. Graduação em Engenharia Química, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 2022.

D'ALMEIDA; M. L. O. Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. In: Celulose e Papel-Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. São Paulo: **SENAI/IPT**, v. 2, p. 45-106, 1988.

DA SILVA, J.; DA SILVA, F. L. H.; RIBEIRO, J. E. S.; DE MELO, D. J. N.; SANTOS, F. A.; DE MEDEIROS, L. L. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101847>.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 87-98, 2017.

DATTA, R.; TSAI, S.; BONSIGNORE, P.; MOON, S.; FRANK, J.R. Technological and economical potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives, **FEMSMicrobiol. Rev.** v. 16, p. 221–231, 1995.

DATTA, R.; HENRY, M. Review Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **J Chem Technol Biotechnol** v.81, p.1119–1129, 2006.

DAWNSON, L.;BOOPATHY,R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **BioResources**, v.3, n. 2, p. 452-460, 2008.

DE LA TORRE, I.; ACEDOS, M.G.; LADERO, M.; SANTOS, V.E. On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates, **Biochem. Eng. J.** v. 145, p. 162-169, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.012>.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food application. **J. Mol. Microbiology and Biotechnology** v.13, p.194-199, 2007.

DIN, N. A. S.; LIM, S. J.; MASKAT, M. Y.; ZAINI, N. A. M. Microbial D-lactic acid production, In Situ separation and recovery from mature and young coconut husk hydrolysate fermentation broth. **Biochemical Engineering Journal**. v. 188, 2022.

DING, S.; TAN, T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry** v. 41, p. 1451–1454, 2006.

DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A.P.; MOJOVIĆ, L.V.; JOKIĆ, B.M.; NIKOLIĆ, S.B.; PEJIN, J.D. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus immobilized* onto zeolite, **Bioresour. Technol.** v. 135, p. 454–458, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.066>.

DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii mutant* Uc-3 in batch fermentation, **Appl. Environ. Microbiol.** v. 74, p. 333-335, 2008. <https://doi.org/10.1128/AEM.01595-07>.

EITEMAN, M.A.; RAMALINGAM, S. Microbial production of lactic acid. **Biotechnol. Lett.** v. 37(5), p. 955–972, 2015. DOI: 10.1007/s10529-015-1769-5.

EL-SHESHTAWY, H. S.; FAHIM, I.; HOSNY, M.; EL-BADRY, M. A. Optimization of lactic acid production from agro-industrial wastes produced by *Kosakonia cowanii*. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**. v. 5, 2022.

ELSHAGHABEE, F. M.; BOCKELMANN, W.; MESKE, D.; DE VRESE, M.; WALTE, H. G.; SCHREZENMEIR, J.; HELLER, K. J. Ethanol production by selected intestinal microorganisms and lactic acid bacteria growing under different nutritional conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 47, 2016.

EŞ, I.; MOUSAVI KHANEGHAH, A.; BARBA, F. J.; SARAIVA, J. A.; SANT'ANA, A. S.; HASHEMI, S. M. B. Recent advancements in lactic acid production - a review. **Food Research International**, v. 107, p. 763–770, 2018.

ESTEBAN, J.; LADERO, M. Food waste as a source of value- added chemicals and materials: a biorefinery perspective, **Int. J. Food Sci. Technol.** v. 53, p. 1095-1108, 2018.

EVANGELIESTA, R.L.; MANGOLD, A.J.; NIKOLOV, Z.I. Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 45–46, p. 131–144, 1994.

FENGEL, D.; WENEGER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, New York, 1989. 613p.

FERNÁNDEZ, L. <https://www.statista.com/statistics/1310495/lactic-acid-market-volume-worldwide/#statisticContainer>.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915–8922, 2010.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass, **Biotechnol. Adv.** v. 29, p. 930–939, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>.

GARDE, A.; JONSSON, G.; SCHMIDT, A.S.; AHRING, B.K. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*, **Bioresour Technol.** v.81, p.217-223, 2002. [https://10.1016/s0960-8524\(01\)00135-3](https://10.1016/s0960-8524(01)00135-3).

GATJE, G.; GOTTSCHALK, G. Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 34, p. 446–449, 1991.

GE, X.Y.; QIAN, H.; ZHANG, W.G. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism, **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 101-109, 2010. <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05032>.

GHAFFAR, T.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AQIL, T.; ZULIFQAR, Z.; TARIQ, A.; KAMRAN, M.; EHSAN, N.; MEHMOOD, S. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification, **Journal of Radiation Research and Applied Sciences** v. 7, p. 222 e 229, 2014.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–7, 2010.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifermantans* immobilized in Caalginate using response surface methodology, **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, p. 745-752, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9534-0>.

GÖRKE, B.; STÜLKE, G. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients, **Nat. Rev. Microbiol.** v. 6, p. 613 e 624, 2008.

GOVUMONI, S. P.; KOTI, S.; KOTHAGOUNI, Y. S.; VENKATESHWAR, S.; LINGA, V. R. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 646–650, 2013.

GROSS, R.A. Biodegradable polymers for the environment, **Science**. v. 297, p. 803–807, 2002. <http://dx.doi.org/10.1126/science.297.5582.803>.

GULLON, B.; YANEZ, R.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation, **Bioresour. Technol.** v. 99, p. 308-319, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.018>.

GUO, W.; JIA, W.; LI, Y.; CHEN, S. Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 161, p. 124-136, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8857-8>.

GUO, Y.; WANG, L.; CHENG, D.; SHAO, J.; HOU, H. Toughening behavior of poly(l-lactic acid)/poly(d-lactic acid) asymmetric blends, **Polym. - Plast. Technol. Eng.** v. 57, p.1225–1235, 2018.. <https://doi.org/10.1080/03602559.2017.1373405>.

HAMA, S.; MIZUNO, S.; KIHARA, M.; TANAKA, T.; OGINO, C.; NODA, H.; KONDO, A. Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, **Biores. Technol.** v.187, p. 167-172, 2015.

HAMES, B; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON D. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratorial Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-4620.

HANO, T.; MATSUMOTO, M.; UENOYAMA, S.; OHTA, T.; KAWANO, Y.; MIURA, S. Separation of lactic acid from fermented broth by solvent extraction. **Bioseparation**. v. 3, p. 321–326, 1993.

HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2009.

HETÉNYI, K.; NÉMETH, Á; SEVELLA, B. Examination of medium supplementation for lactic acid fermentation, **Hungar. J. Ind. Chem.** v. 36, p. 49-53, 2008. <https://doi.org/10.1515/178>.

HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Metabolism of pyruvate and citrate in lactobacilli. **Aust. J. Biol. Sci.** v. 36, p. 487–496, 1983. DOI: 10.1071/BI9830487.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, **Enzyme Microb. Technol.** v. 26, p. 87–107, 2000.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1, **Enzyme Microb. Technol.** v. 26 p. 87–107, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6).

HOLM, M. S., SARAVANAMURUGAN, S., TAARNING, E. Conversion of sugars to lactic acid derivatives using heterogeneous zeotype catalysts **Science**, v. 328, p. 302-305, 2010

HON, DAVID. N.-S., SHIRAISHI, N. Wood and Cellulose Chemistry, Marcel Dekker, New York, 1991. 1020p.

HONDA, H.; TOYAMA, Y.; TAKAHASHI, H.; NAKAZEKO, T.; KOBAYASHI, T. Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. **J. Ferment. Bioeng.** v. 79, p. 589–593, 1995.

HONG, C.H.; KIM, S.H.; SEO, J.Y.; HAN, D.S. Manufacturing method of lactide from lactic acid. CN Patent 102 (796), 071A, 2012.

HONGO, M.; NOMURA, Y.; IWAHARA, M. Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 52, p. 314–319, 1986.

HU, Y.; KWAN, T. H.; DAOUD, W. A.; LIN, C. S. K. Continuous ultrasonic-mediated solvent extraction of lactic acid from fermentation broths. **Journal of Cleaner Production**, v. 145, p. 142 – 150, 2017.

HU, Y.; DAOUD, W.A.; CHEUK, K.K.L.; LIN, C.S.K. Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: Focus on poly(lactic acid), **Materials (Basel)**. v. 9, 2016. <https://doi.org/10.3390/ma9030133>.

IBGE. Produção de Castanha-de-caju (cultivo). Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>. Acesso em: 27 set. 2022.

ICIDCA, Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar, Imprenta MINAZ, 2000. 458p.

ILMEN, M.; KOIVURANTA, K.; RUOHONEN, L.; SUOMINEN, P.; PENTTILA, M. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, p. 117–123, 2007.

IYER, P.V.; LEE, Y.Y. Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid. **Biotechnol. Lett.** v. 21, p. 371–373, 1999a.

IYER, P.V.; LEE, Y.Y. Simultaneous saccharification and extractive fermentation of lignocellulosic materials into lactic acid in a two-zone fermentor–extractor system. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 78, p. 409–419, 1999b.

IZAGUIRRE, J.K.; DIETRICH, T.; VILARINHO, M.C.; CASTAÑÓN, S. Protein hydrolysate from organic fraction of municipal solid waste compost as nitrogen source to produce lactic acid by *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 and *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. **Process Biochem.** 88 pp. 15–21, 2019, DOI: 10.1016/j.procbio.2019.09.028.

JAMBUNATHAN, P. ZHANG, K. Engineered biosynthesis of biodegradable polymers. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 43, p. 1037–1058, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1785-z>.

JANSSEN, K. P. F., PAUL, J. S., SELS, B. F., JACOBS, P. A. Glyoxylase biomimics: zeolite catalyzed conversion of trioses. **Stud. Surf. Sci. Catal.**, v. 170, p. 1222–1227, 2007.

JEANTET, R.; MAUBOIS, J.L.; BOYAVAL, P. Semicontinuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nano-filtration membranes. **Enzyme Microb. Technol.** v. 19, p. 614–619, 1996.

JEON, B. W.; LEE, J.; KIM, H.S.; CHO, D.H.; LEE, H.; CHANG, R.; KIM, Y.H. Lipase-catalyzed enantioselective synthesis of (R,R)-lactide from alkyl lactate to produce PDLA (poly D-lactic acid) and stereocomplex PLA (poly lactic acid). **J. Biotechnol.** v. 168, p. 201–207, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.06.021.

JIANG, S.; XU, P.; TAO, F. L-Lactic acid production by *Bacillus coagulans* through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic corncob residue. **Bioresour. Technol. Rep.** v. 51, p. 263-268, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.02.005>.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(p)-lactic acid production using *Lactobacilli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 134, p. 263-272, 2006. <https://doi.org/10.1385/abab:134:3:263>.

JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.** v. 199, p. 103-112, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial Production of Lactic Acid: The Latest Development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.36, p. 967-77, 2016. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1066305>.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek.** v.49, p.209-224, 1983.

KASAVAN, A.; YUSOFF, S.; FAKRI, M. F. R.; SIRON, R. Plastic pollution in water ecosystems: A bibliometric analysis from 2000 to 2020, **Journal of Cleaner Production.** v.313, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127946>.

KAUFMAN, E.N.; COOPER, S.P.; CLEMENT, S.L.; LITTLE, M.H. Appl. Use of a biparticle fluidized-bed bioreactor for the continuous and simultaneous fermentation and purification of lactic acid, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 51–52, p. 605–620, 1995.

KIM, J.; JANG, J.H.; YEO, H.J.; SEOL, J.; KIM, S.R.; JUNG, Y.H. Lactic acid production from a whole slurry of acid-pretreated spent coffee grounds by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 189, p. 206–216, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03000-6>.

KIM, Y.H.; MOON, S.H. Lactic acid recovery from fermentation broth using one stage electrodialysis. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 76, p. 169–178, 2001.

KIZZIE-HAYFORD, N. DABIE, K.; KYEI-ASANTE, B.; AMPOFO-ASIAM, J.; ZAHN, S.; JAROS, D.; ROHM, H. Storage temperature of tiger nuts (*Cyperus esculentus L*) affects enzyme activity, proximate composition and properties of lactic acid fermented tiger nut milk derived thereof. **LWT**, v. 137, n. October 2020, p. 110417, 2021.

KLEIN, G. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 41, p. 103–125, 1998.

KLOVRYCHEV, MF; KOROLEV, PN; BULGAKOVA, VG. Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis*. **Microbiology**, v. 47, pp. 357-361, 1979.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 13, n.2, p. 151-172, 1993.

KUMAR, V.; KRISHANIA, M.; PREET, S. P.; AHLUWALIA, V.; GNANSOUNOU, E.; SANGWAN, R. S. Efficient detoxification of corn cob hydrolysate with ion-exchange resins for enhanced xylitol production by *Candida tropicalis* MTCC 6192. **Bioresour Technol.** v. 251, p. 416–419, 2018.

KUMAR, S.; YADAV, N.; NAIN, L.; KHARE, S. K. A simple downstream processing protocol for the recovery of lactic acid from the fermentation broth. **Bioresource Technology**. v. 318, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124260>.

KUMAR, V.; AHLUWALIA, V.; SARAN, S.; KUMAR, J.; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, v. 323, 2021. [10.1016/j.biortech.2020.124566](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566).

KUMAR, P.; BARRET, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel

Production. **Industrial Engineering Chemical Resource**. v. 48, p. 3713-1729, 2009.

LADISCH, M. R. Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 21-5, 1979.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresour. Technol.** v. 101, p. 1036-1043, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.091>.

LASSALE, V.; GALLAND, G. B.; FERREIRA, M. L. Lipase-catalyzed copolymerization of lactic and glycolic acid with potential as drug delivery devices. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 31, p. 499–508, 2008.

LASPRILLA, A.J.R.; MARTINEZ, G.A.R.; LUNELLI, B.H.; JARDINI, A.L.; FILHO, R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review, **Biotechnol. Adv.** v. 30, p. 321–328, 2012.

LI, C., GAI, Z.; WANG, K.; JIN, L. Engineering *Bacillus licheniformis* as a thermophilic platform for the production of L-lactic acid from lignocellulose-derived sugars. **Biotechnol. Biofuels**. v. 10, p. 235, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0920-z>.

LI, Z.; DING, S.F.; LI, Z.P.; TAN, T.W. L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation with corn steep liquor-supplemented acid-hydrolysate of soybean meal, **Biotechnol. J.** v. 12, p. 1453-1458, 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200600099>.

LIU, Y.; JIANG, S.; YAN, W.; HE, M.; QIN, J.; QIN, S.; YU, J. Crystallization morphology regulation on enhancing heat resistance of polylactic acid. **Polymers (Basel)**. v. 12 (7), p. 1563, 2020.

LÓPEZ-GÓMEZ, JP; ALEXANDRI, M; SCHNEIDER, R; VENUS, J. A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. **Process Biochemistry**, v.79, p.1-10, April 2019.

LOWOR, S.T.; AGYENTE-BADU, C.K. Mineral and proximate composition of cashew apple (*Anarcadium occidentale* L.) Juice from Northern Savannah, Forest and Coastal Savannah Regions in Ghana. **American Journal of Food Technology**. v. 4, p. 154-161, 2009. <https://doi.org/10.3923/ajft.2009.154.161>.

LU, Z.H.; HE, F.; SHI, Y.; LU, M.B.; YU, L.J. Fermentative production of L(p)-lactic acid using hydrolysed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients, **Bioresour. Technol.** v. 101, p. 3642-3648, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.119>.

MA, K.; HU, G.; PAN, L.; WANG, Z.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; RUAN, Z.; HE, M. Highly efficient production of optically pure L-lactic acid from corn stover hydrolysate by

thermophilic *Bacillus coagulans*. **Bioresour. Technol.** v. 21, p. 114–122, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.10.

MARQUES JUNIOR, J. E.; ROCHA, M. V. P. Development of a purification process via crystallization of xylitol produced for bioprocess using a hemicellulosic hydrolysate from the cashew apple bagasse as feedstock. **Bioprocess and Biosystems Engineering.** v. 44, p. 713–725, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02480-9>.

MARQUES, S.; SANTOS, J.A.L.; GIRIO, F.M.; ROSEIRO, J.C. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation, **Biochem. Eng. J.** v. 41, p. 210–216, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.04.018>.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; GONZÁLEZ, J. M. D.,; CONVERTI, A.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology.** v. 30(1), p. 70–83, 2013.

MARZO, C.; DÍAZ, A. B.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorisation of fungal hydrolysates of exhausted sugar beet pulp for lactic acid production. **J. Sci. Food Agric.** v. 101, p. 4108, 2020. DOI: 10.1002/jsfa.11046.

MATSUMURA, S.; MABUCHI, K.; TOSHIMA, K. Lipase-catalyzed ring opening-polymerization of lactide, **Macromol. Rapid Commun.** v. 85, p. 921–932, 1997. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2374-0>.

MEHTA, R.; KUMAR, V.; BHUNIA, H.; UPADHYAY, S. Synthesis of poly(lactic acid): a review, **Polym Rev.** v. 45, p. 325–49, 2005. <https://doi.org/10.1080/15321790500304148>.

MENEZES, J. B.; ALVES, R. E. Fisiologia e tecnologia pós-colheita do pedúnculo do caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1995, 20 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 17).

MICHALCZYK, A.K.; GARBACZEWSKA, S.; MORYTZ, B.; BIAŁEK, A.; ZAKRZEWSKI, J. Influence of Nitrogen Sources on D-Lactic acid biosynthesis by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 Strain. **Fermentation.** v. 7, 2021. DOI: 10.3390/fermentation7020078.

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

MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate polymers,** v. 92, n. 2, p. 1596–601, 2013.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings- A review. **Biomass and Bioenergy**. v. 56, p. 526-544, 2013.

MOLDES, A.B.; TORRADO, A.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J.M. Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 135, p. 219-227, 2006. <https://doi.org/10.1385/ABAB:135:3:219>.

MONTEAGUDO, J.M.; ALDAVERO, M. Production of L-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* in chemostat culture using an ion exchange resins system. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 74, p. 627–634, 1999.

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

MUSHTAQ, Z.; IMRAN, M.; ZAHOOR, T.; AHMED, R. S.; ARSHAD, M. U. Biochemical perspectives of xylitol extracted from indigenous agricultural by-product (*Mongbean hulls*) in rats modelling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I.M.; ROBERTO, I.C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain, **Biochem. Eng. J.** v. 40, p. 437–444, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.013>.

NAGARAJAN, D.; OKTARINA, N.; CHEN, P.-T.; CHEN, C.-Y.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Fermentative lactic acid production from seaweed hydrolysate using *Lactobacillus sp.* and *Weissella sp.* **Bioresour. Technol.** 344 (126166), 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126166.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; BOUDRANT, J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*, **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 25, p. 1423–1429, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0029-z>.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization, *Electron. J. Biotechnol.* v. 7, p.167–179, 2004. <http://dx.doi.org/10.2225/vol7-issue2-fulltext-7>.

NGOUÉNAM, J.R.; KAKTCHAM, P. M.; KENFACK, C. H. M.; KOUAM, E. M. F.; NGOUFACK, F. Z. Optimization of Lactic Acid Production from Pineapple By-Products and an Inexpensive Nitrogen Source Using *Lactiplantibacillus plantarum* strain 4O8. **International Journal of Food Science**, 2021.

NGUYEN, C. M.; KIM, J. S.; HWANG, H. J.; PARK, M. S.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; KIM, J. C. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 552–559, 2012.

NGUYEN, C.M.; KIM, J.S.; HWANG, H.J.; PARK, M.S.; CHOI, G.J.; CHOI, Y.H.; KIM, J.C. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli, **Bioresour. Technol.** v. 110, p. 552–559, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.079>.

NGUYEN, C.M.; KIM, J.S.; SONG, J.K.; CHOI, G.J.; CHOI, Y.H.; JANG, K.S.; KIM, J.C. D-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. Torquens, **Biotechnol Lett.** v. 34 p. 2235–2240, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1023-3>.

NOGUEIRA, I. de M., AVELINO, F. A., OLIVEIRA, D. R., SOUZA, N. F., ROSA, M. F., MAZZETTO, S. E., LOMONACO, D. Organic solvent fractionation of acetosolv palm oil lignin: The role of its structure on the antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 122, p. 1163–1172, 2019.

NOLASCO-HIPOLITO, C.; MATSUNAKA, T.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Synchronised fresh cell bioreactor system for continuous l-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. **J. Biosci. Bioeng.** v. 93, p. 281–287, 2002.

NOMURA, Y.; IWAHARA, M.; HALLSWORTH, J.E.; TANAKA, T.; ISHIZAKI, A. High-speed conversion of xylose to l-lactate by electro dialysis bioprocess. **J. Biotechnol.** v. 60, p. 131–135, 1998.

OKANO, K.; YOSHIDA, S.; TANAKA, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Homo d-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of phosphoketolase pathway to pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*, **Appl. Environ. Microbiol.** v.75, p. 5175 – 5178, 2009.

OLIVEIRA R.A.; FILHO, R. M.; Rossell, C.E.V. High lactic acid production from molasses and hydrolysed sugarcane bagasse, **Chem. Eng. Trans.** v. 50, p. 307–312, 2016. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1650052>

OLIVEIRA, A.; SCHNEIDER, R.; VAZ ROSSELL, C.E.; MACIEL FILHO, R.; VENUS, J. Polymer grade l-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*, **Bioresour. Technol. Rep.** v. 6, p. 26–31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.02.003>.

OMAY, D.; GUVENILIR, Y. Synthesis and characterization of poly (d, l-lactic acid) via enzymatic ring opening polymerization by using free and immobilized lipase. **Biocatal. Biotransformation** v.31 (3), p. 132–140, 2013.

OSHIRO, M.; SHINTO, H., TASHIRO, Y.; MIWA, N.; SEKIGUCHI, T.; OKAMOTO, M.; ISHIZAKI, A.; SONOMOTO, K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1. **J. Biosci. Bioeng.** v. 108, p. 376–384, 2009.

OVERBECK, T.; STEELE, J.L.; BROADBENT, J.R. Fermentation of de-oiled algalbiomass by *Lactobacillus casei* for production of lactic acid, **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 39, p. 1817–1823, 2016. DOI: 10.1007/s00449-016-1656-z.

PACHECO, A. L. T. A.; BARCELLOS, R. M. M. Estudo de viabilidade técnica e econômica da produção de poliácido láctico a partir de melão de cana-de-açúcar de forma integrada à indústria açucareira, **Trabalho de Conclusão de Curso**, 2021

PAL, P.; SIKDER, J.; ROY, S.; GIORNO, L. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. **Chem. Eng. Process. Intens.** v. 48(11-12), p. 1549-1559, 2009. DOI: 10.1016/j.cep.2009.09.003.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with content high residual lignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121/124, p. 1069-1080, 2005.

PANDEY, A. E ASWATH, P.B. Microwave synthesis of poly(L-lactic acid). **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** v. 20, p. 33–48, 2009. <https://doi.org/10.1163/156856208X393482>.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresour. Technol.** v. 77, p. 203–214, 2001.

PARK, E.Y.; KOSAKAI, Y.; OKABE M. Efficient production of L-(+)-Lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. **Biotechnol Prog.** v. 14, p. 699–704, 1998.

PEJIN, J.; RADOSAVLJEVIĆ, M.; MOJOVIĆ, L.; KOCIĆ-TANACKOV, S.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. **Food Research International.** v.73, p. 31 – 37; 2015.

PING, Y.; LING, H.-Z.; SONG, G.; GE, J.-P. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 86-91, 2013.

PLEISSNER, D.; LAU, K. Y.; SCHNEIDER, R.; VENUS, J.; LIN, C. S. K. Fatty acid feedstock preparation and lactic acid production as integrated processes in mixed restaurant food and bakery wastes treatment. **Food Research International**. v. 73, p. 52-61, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.048>.

POT, B.; TSAKALIDOU, E. Taxonomy and Metabolism of *Lactobacillus*. In: Ljungh, Å.; Wadström, T. (Eds.). *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. 1. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 1–56.

QUI, Z.; HAN, X.; HE, J.; JIANG, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; LIU, X.; XIA, J.; XU, N.; HE, A.; GU, H.; XU, J. One-pot d-lactic acid production using undetoxified acid-pretreated corncob slurry by an adapted *Pediococcus acidilactici*. **Bioresource Technology**. v. 363, 2022.

QUEIROZ, L. P. Estudo da produção de ácido láctico por bioprocesso utilizando soro de leite como matéria-prima. 2021. 61p. Trabalho final de curso. Graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2021.

RAMOT, Y.; HAIM-ZADA, M.; DOMB, A.J.; NYSKA, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 107 p. 153–162, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.012>.

RANDHAWA, M. A; AHMED, A.; AKRAM, K. Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses. **Pakistan Journal of Botany**. v. 44(1), p. 333-338, 2012.

REIS, C. L. B.; SILVA, L. M. A.; RODRIGUES, T. H. S.; FÉLIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; canuto, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technol.**, v. 224, p. 694-701, 2017.

ROCHA, M. V. P., RODRIGUES, T., H. S., MACEDO, G. R., GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 155, p. 407– 417, 2009.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 234–243, 2014.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

RODRIGUES, R. C. L. B.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1649-55, 2011.

RODRIGUES, T. H. S., DANTAS, M. A. A., PINTO, G. A. S., GONÇALVES, L. R. B. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 675 – 688, 2007.

RODRIGUES, T. H. S.; BARROS, E. M.; BRÍGIDO, J. S.; SILVA, W. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. The Bioconversion of Pretreated cashew apple bagasse into ethanol by SHF and SSF processes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 178, p. 1167-1183, 2016.

RODRÍGUEZ-TORRES, M.; ROMO-BUHELLEY, J.; OROZCO-SÁNCHEZ, F. Effects of oxygen transfer rate on the L(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 in stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 187, 2022.

ROMANI, A.; YANEZ, R.; GARROTE, G.; ALONSO, J.L. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges, **Bioresour. Technol.** v. 99, p. 4247–4254, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.051>.

RONZON, T.; LUSSER, M.; KLINKENBERG, M.; LANDA, L.; SANCHEZ LOPEZ, J.; M'BAREK, R.; HADJAMU, G.; BELWARD, A.; CAMIA, A.; GIUNTOLI, J.; CRISTOBAL, J.; PARISI, C.; FERRARI, E.; MARELLI, C.; TORRES DE MATOS, C.; GOMEZ BARBERO, M.; RODRIGUEZ CERREZO, E. 2017. Bioeconomy report 2016. In: **JRC Science for Policy Report**, <https://doi.org/10.2760/20166>.

SAHA, B. C.; YOSHIDA, T.; COTTA, M. A.; SONOMOTO, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367-372, 2013.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd ed., Marcel Dekker, Inc, NewYork, 2004.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Biosource Technology**. v. 99, p. 527-5295, 2008. SANFÉLIX-HAYWOOD, N.; COLL-MARQUÉS, J.M.; YEBRA, M.J. Role of α -phosphoglucosyltransferase and phosphoglucose isomerase activities at the branching point between sugar catabolism and anabolism in *Lactobacillus casei*. **J. Appl. Microbiol.** v. 111(2), p. 433–442, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05045.x.

SENEDESE, A.L.C.; FILHO, R.M.; WOLF, M.R. L-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. **Sci. World J.** 501029, 2015. DOI: 10.1155/2015/501029

SERPA, J.F.; SILVA, J.S.S.; REIS, C.L.B.; MICOLI, L.; SILVA, L.M.A.; CANUTO, K.M.; MACEDO, A.C.; ROCHA, M.V.P. Extraction and characterization of lignins from cashew apple bagasse obtained by different treatments. **Biomass Bioenerg.** v. 141, p. 105728, 2020. DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105728.

SHARMA, A.; MUKHERJEE, S.; TADI, S. R. R.; RAMESH, A.; SIVAPRAKASAM, S. Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. **Lwt**, v. 139, p. 110744, 2021.

SHEN, X.L.; XIA, L.M. Lactic acid production from cellulosic material by synergetic hydrolysis and fermentation, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 133, p. 251-262, 2006. <https://doi.org/10.1385/abab:133:3:251>.

SHI, X.; ZHANG, G.; SILIGARDI, C.; ORI, G.; LAZZERI, A. Comparison of precipitated calcium carbonate/poly(lactic acid) and halloysite/poly(lactic acid) nanocomposites, **J. Nanomater.** (2015) 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/905210>.

SHI, Z.; WEI, P.; ZHU, X.; CAI, J.; HUANG, L.; XU, Z. Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors, **Enzyme Microb. Technol.** v. 51, p. 263–268, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.07.007>.

SHIBATA, K.; FLORES, D.M.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amyolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 41, p. 149–155, 2007.

SILVA, A. S. E. ; MOREIRA, L. M. ; MAGALHAES, W. T. ; FARIAS, W. R. L. ; ROCHA, M.V.P. ; BASTOS, A. K. P. . Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 2101-2106, 2018.

SILVESTRINI, R.; SANTANA, R. M. C. Influência do catalisador, tempo de reação e temperatura na síntese de poli(ácido láctico) (PLA) via micro-ondas. **15º Congresso brasileiro de polímeros**, 2019.

SINGH, A., MISHRA, P. Microbial Pentose Utilization. Current Applications in Biotechnology. **Elsevier**, 1995. 401p.

SINGH, S.K.; ANTHONY, P.; CHOWDHURY, A. High molecular weight poly (lactic acid) synthesized with apposite catalytic combination and longer time. **J. Chem.** v. 34 (4), p. 1984, 2018.

SINGH, J.; SHARMA, A.; SHARMA, P.; TOMAR, G. S.; GROVER, M.; SINGH, S.; NAIN, L. Production of ethanol, lipid and lactic acid from mixed agro-wastes hydrolysate. **Natural Product Research**. 2022.

SINGHVI, M.; JOSHI, D.; ADSUL, M.; VARMA, A.; GOKHALE, D. D-(-)-Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2- 24, **Green Chem.** v. 12, p. 1106-1109, 2010.

SINGHVI, M.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5911–5924, 2018.

SINTIM, H.Y.; BARY, A.I.; HAYES, D.G.; WADSWORTH, L.C.; ANUNCIADO, M.B.; ENGLISH, M.E.; BANDOPADHYAY, S.; SCHAEFFER, S.M.; DEBRUYN, J.M.; MILES, C.A.; REGANOLD, J.P. In situ degradation of biodegradable plastic mulch films in compost and agricultural soils. **Sci. Total Environ.** v. 727, p. 138668, 2020.

SIVAGURUNATHAN, P.; RAJ, T.; CHAUHAN, P. S.; KUMARI, P.; SATLEWAL, A.; GUPTA, R. P.; KUMAR, R. High-titer lactic acid production from pilot-scale pretreated non-detoxified rice straw hydrolysate at high-solid loading. **Biochemical Engineering Journal.** v. 187, 2022.

SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1998. 316 p

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 3/31/2008. Technical Report NREL/TP-510-42621 Revised March 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 4/25/2008 Technical Report NREL/TP-510-42618 Revised April 2008b

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 4/25/2008 Technical Report NREL/TP-510-42618 Revised April 2008c.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal** v. 39, p 369–375, 2008.

SOUZA, E. C.; DE AZEVEDO, P. O. DE S.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. DE S. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. **CyTA - Journal of Food**, v. 15(4), p. 525–530, 2017. DOI: <https://10.1080/19476337.2017.1306806>.

SREENATH, H.K.; MOLDES, A.B.; KOEGEL, R.G.; STRAUB, R.J. Lactic acid production from agriculture residues, **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 179-184, 2001. <https://10.1023/A:1005651117831>.

SRIVASTAVA, A.; ROYCHOUDBURY, P.K.; SASHI, V. Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. **Biotechnol. Bioeng.** v. 39, p. 607–613, 1992.

STATISTA, <https://www.statista.com/statistics/1310495/lactic-acid-market-volume-worldwide/#:~:text=In%202021%2C%20the%20market%20volume,1.39%20million%20metric%20tons%20worldwide>. Acessado em 10/04/2023.

STATISTA, <https://www.statista.com/statistics/964392/market-value-polylactic-acid-worldwide/>. Acessado em 10/04/2023.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 36, p 1-29, 1997.

STILES, M.E. Biopreservation by Lactic Acid Bacteria. **Antonie Leeuwenhoek Journal**, v. 70, p. 331-345, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>.

SUDHAKAR, M. P.; DHARANI, G. Evaluation of seaweed for the production of lactic acid by fermentation using *Lactobacillus plantarum*. **Bioresource Technology Reports**. v. 17, 2022.

SUGANUMA, K.; ASAKURA, T.; OSHIMURA, M.; HIRANO, T.; UTE, K.; CHENG, H.M. NMR Analysis of Poly(Lactic Acid) via Statistical Models. **Polymers**, v. 11(4), p. 725, 2019. DOI: 10.3390/polym11040725.

SUN, Y.; LI, X.; WU, L.; LI, Y.; LI, F.; XIU, Z.; TONG, Y. 2021. The advanced performance of microbial consortium for simultaneous utilization of glucose and xylose to produce lactic acid directly from dilute sulfuric acid pretreated corn stover. **Biotechnol. Biofuels**. v.14 (233), 2021. DOI: 10.1186/s13068-021-02085-8.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**. v. 84, p. 331-339, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p. 1-11, 2002.

TADA, K.; KANNO, T.; HORIUCHI, J. Enhanced production of bioxylitol from corn cobs by *Candida magnolia*, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 10008-10014, 2012.

TANAKA, K.; KOMIYAMA, A.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A.; HALL, S. J.; STANBURY, P. F. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 160-167, 2002.

TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation, **Bioresour. Technol.** v. 97, p. 211–217, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.025>

TASHIRO, Y.; KANEKO, W.; SUN, Y.; SHIBATA, K.; INOKUMA, K.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Continuous d-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* QU 41. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 89, p. 1741–1750, 2011.

TAY, A.; YANG, S.T. Production of L-(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 80, p. 1-12, 2002.

THAKUR, A.; PANESAR, P.S.; SAINI, M.S. L(+)-Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using low cost agro-industrial waste as carbon and nitrogen sources. **Waste Biomass Valor.** v. 10, p. 1119–1129, 2019. DOI: 10.1007/s12649-017-0129-1.

TONG, Y.; HIRATA, M.; TAKANASHI, H.; HANO, T.; KUBOTA, F.; GOTO, M.; NAKASHIO, F.; MATSUMOTO, M. Extraction of lactic acid from fermented broth with microporous hollow fiber membranes, **J. Membr. Sci.** v. 143, p. 81, 1998.

TSENG, C.P.; TSAU, J.L.; MONTVILLE, T.J. Bioenergetic consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in environmental oxygen and pH in chemostat cultures. **J. Bacteriol. Res.** v. 173(14), p. 4411–4416, 1991. DOI: 10.1128/jb.173.14.4411-4416.1991.

TU, W. L.; HSU, T. C.; WANG, C. A.; GUO, G. L.; CHAO, Y. Using novel *Lactobacillus plantarum* to produce lactic acid from lignocellulosic biomass in an integrated simultaneous saccharification and fermentation process. **BioResources**, v. 14(2), p. 3873-3885, 2019. DOI: 10.15376/biores.14.2.3873-3885.

TUNG, L.A.; KING, C.J. Sorption and extraction of lactic and succinic acids at pH>pKa1. I: Factors governing equilibria, **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 33, p. 3217–3223, 1994.

UN Environment, 2021. <https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/relatorio-da-onu-sobre-poluicao-plastica-alerta-sobre> acessado em 01 de dezembro de 2022.

UPADHYAYA, B. P.; DEVEAUX, L. C.; CHRISTOPHER, L. P. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. **Trends in Biotechnology**. v. 32(12), p. 637–644, 2014.

URBACH, G. Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. **Int. Dairy Journal**. v.5, p.877-903, 1995.

VACCARI, G.; GONZALEZ-VARA, R.A.Y.; CAMPI, A.L.; DOCI, E.; BRIGIDI, P. Fermentative production of L-lactic acid by *Lactococcus lactis* DSM20011 and product recovery using ion exchange resins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 40, p. 23–27, 1993.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications, **Polym. Test**. v.21, p. 433–442, 2002 [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00107-6).

VAN HYLCKAMA VLIEG, J.E.T. AND HUGENHOLTZ, J. Mining Natural Diversity of LAB for Flavour and Health Benefits. **International Dairy Journal**. v.17, p. 1290-1297, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.010>.

VAN NISPEN, J.G.M., JONKER, R., 1991. Process for the fermentative preparation of organic acids. US Patent, 5:002,881.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUSA JR., M. B.; PEREIRA JR., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136, p. 141-154, 2007.

VENUS, J. Utilization of renewables for lactic acid fermentation. **Biotechnol. J.** v. 1 (12), p. 1428-1432, 2006.

VENUS, J., RICHTER, K. Production of lactic acid from barley: strain selection, phenotypic and medium optimization. **Eng. Life Sci.** v. 6 (5), p. 492-500, 2006.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. v. 22(2), p. 245- 264, 2008.

VONKTAVEESUK, P., TOYOKAWA, M., ISHLZAKI, A. Stimulation of the rate of L-lactate fermentation using *Lactococcus lactis* IO-1 by periodic electro dialysis. **J. Ferment. Technol.** v. 77, p. 508–512, 1994.

WALTON S.L.; BISCHOFF K.M.; HEININGEN A.R.P.; WALSUM G.P. Production of lactic acid from hemicellulose extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 37, p. 823–830, 2010. doi: 10.1007/s10295-010-0727-4.

WANDERLEY, M.C., de, A., MARTÍN, C., ROCHA, G.J., de, M., GOUVEIA, E.R., Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** v. 128, p. 448–453, 2013.

WANG, Y.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; XIAO, Y. T.; ZENDO, T.; SAKAI, K.; SONOMOTO, K. L-(p)-Lactic acid production by co-fermentation of cellobiose and xylose without carbon catabolite repression using *Enterococcus mundtii* QU 25, **RSC Adv.** v. 4, p. 22013, 2014.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO K., Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits, **J. Biosci. Bioeng.** v. 119, p. 10–18, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>.

WANG, Y.; WANG, M.; CAI, D.; WANG, B.; WANG, Z.; QIN, P.; TAN, T. Efficient L-lactic acid production from sweet sorghum bagasse by open simultaneous saccharification and fermentation. **RSC Adv.** v. 6, p. 35771–35777, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA04538C>.

WASEWAR, K.L. Separation of lactic acid: recent advances, **Chem. Biochem Eng. Q.** v. 19, p. 159–172, 2005.

WATANABE, M.; MAKINO, M.; KAKU, N.; KOYAMA, M.; NAKAMURA, K.; SASANO, K. Fermentative L-(+)-lactic acid production from non-sterilized rice washing drainage containing rice bran by a newly isolated lactic acid bacteria without any additions of nutrients. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v.115 (4), p. 449–452, 2013.

WEE, Y.J.; YUN, J.S.; PARK, D.H.; RYU, H.W. Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Biotechnol Lett.** v. 26, p. 71-74, 2004. doi: 10.1023/b:bile.0000009464.23026.e0.

WEE, Y.J.; RYU, H.W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cellerecycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials, **Bioresour. Technol.** v. 100, p. 4262-4270, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.074>.

WELMAN, A. D. E MADDIX, I. S. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Perspectives and Challenges. **Trends in Biotechnology.** v. 21, n. 6, p. 269274, 2003.

WISCHRAL, D.; ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F.; PASSOS, D. F.; PEREIRA JR, N. Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by *Lactobacillus pentosus*: Integrating xylose and glucose fermentation. **Biotechnology Progress,** v. 35, n. 1, 2019.

XAVIER, Michelle da Cunha Abreu. Bioconversão de xilose em ácido láctico. Campinas: UNICAMP, 2011, 126F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011.

XU, S.; LAN, K.; LI, J.; HE, T.; HU, C. Separation of lactic acid from synthetic solutions and the mixture directly derived from corn stover by aqueous two phase extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 204, p. 281–289, 2018.

YABANNAVAR, V.M.; WANG, D.I.C. Extractive fermentation for lactic acid production. **Biotechnol. Bioeng.** v. 37, p. 1095–1100, 1991.

YADAV, N.; NAIN, L.; KHARE, S. K. Studies on the degradation and characterization of a novel metal-free polylactic acid synthesized via lipase-catalyzed polymerization: A step towards curing the environmental plastic issue. **Environmental Technology & Innovation**. v. 24, p. 101845, 2021.

YÁÑEZ, R.; ALONSO, J.L.; PARAJÓ, J.C. D-lactic acid production from waste cardboard. Journal of chemical technology & biotechnology: international research in process. **Environ. Clean Technol.** v. 80, p. 76–84, 2005. <https://doi.org/10.1002/jctb.1160>.

YANG, S.; MADBOULY, S.A.; SCHRADER, J.A.; SRINIVASAN, G.; GREWELL, D.; MCCABE, K.G.; KESSLER, M.R.; GRAVES, W.R. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications, **Green Chem.** v. 17, p. 380–393, 2015 <http://dx.doi.org/10.1039/C4GC01482K>.

YE, K.; JIN, S.; SHIMIZU, K. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. **J. Ferment. Bioeng.** v. 81, p. 240–246, 1996.

YOO, D.K.; KIM, D.; LEE, D.S.J.M.R. Reaction kinetics for the synthesis of oligomeric poly (lactic acid), **Macromolecular Research**. v. 13, p. 68-72, 2005. <https://doi.org/10.1007/BF03219017>

YUEAGYEN, P.; LERTWORASIRIKUL, A. Effect of poly(hexamethylene succinamide) on crystallization of poly(L-lactic acid), **Key Eng. Mater.** v. 751, p. 302–307, 2017. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.751.302>.

ZHANG, B.; LI, J.; LIU, X.; BAO, J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. **Industrial Crops and Products**. v. 187, 2022.

ZHANG, Y.; VADLANI, P.V.; KUMAR, A.; HARDWIDGE, P.R.; GOVIND, R.; TANAKA, T.; KONDO, A. Enhanced D-lactic acid production from renewable

resources using engineered *Lactobacillus plantarum*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 100, p. 279–288, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7016-0>.

ZHANG, Y.; VADLANI, P.V. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **J. Biosci. Bioeng.** v. 119(6), p. 694–699, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.027.

ZHAO, T.; LIU, D.; REN, H.; SHI, X.; ZHAO, N.; CHEN, Y.; YING, H. D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 immobilized in fibrous bed bioreactor using corn flour hydrolysate, **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, p. 1664–1672, 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1406.06043>.

ZHONG, Y.; FROST, H.; BUSTAMANTE, M.; LI, S.; LIU, Y. S.; LIAO, W. A mechano-biocatalytic one-pot approach to release sugars from lignocellulosic materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 121, p. 109675, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109675>.

ZHU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Appl Microbiology Biotechnology**, v. 83, p. 597-610, 2009.

ZHU, Y.M.; LEE, Y.Y.; ELANDER, R.T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 137, p. 721–738, 2007. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9092-9>.