



**UNICAMP**

---

JOHN HERVIN BERMUDEZ JAIMES

**Produção de Ácido Acrílico de Fonte Renovável  
a Partir do Ácido Láctico por Fermentação do Melaço  
de Cana-de-Açúcar**

**Campinas**

**2013**





---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE ENGENHARIA QUÍMICA**

**JOHN HERVIN BERMUDEZ JAIMES**

**Produção de Ácido Acrílico de Fonte Renovável a Partir do Ácido  
Lático por Fermentação do Melaço de Cana-de-Açúcar**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JOHN  
HERVIN BERMUDEZ JAIMES E ORIENTADO PELA  
PROFA. DRA. MARIA REGINA WOLF MACIEL.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Regina Wolf Maciel", is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

**Campinas**

**2013**

---

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

B456p Bermudez Jaimes, John Hervin, 1981-  
Produção de ácido acrílico de fonte renovável a partir do ácido láctico por  
fermentação do melaço de cana-de-açúcar / John Hervin Bermudez Jaimes. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Regina Wolf Maciel.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia Química.

1. Ácido láctico. 2. Ácido acrílico. 3. Fermentação. 4. Desidratação. I. Maciel,  
Maria Regina Wolf, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Acrylic acid production from renewable sources from lactic acid by  
sugarcane molasses fermentation

**Palavras-chave em inglês:**

Lactic acid

Acrylic acid

Fermentation

Dehydration

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Químicos

**Titulação:** Mestre em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Maria Regina Wolf Maciel [Orientador]

Maria Ingrid Rocha Barbosa

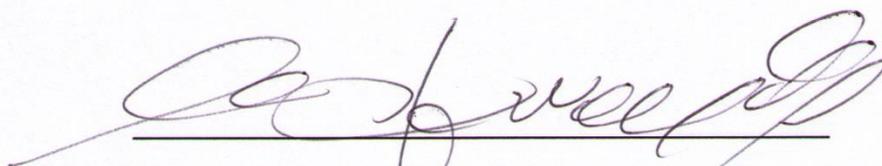
Francisco Maugeri Filho

**Data de defesa:** 28-02-2013

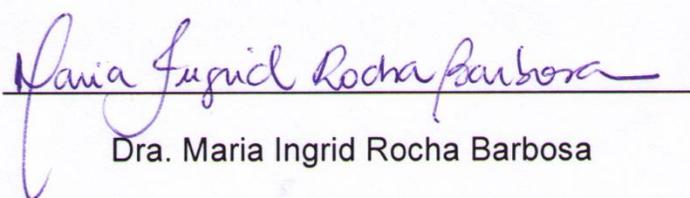
**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

---

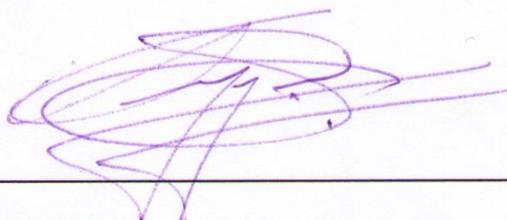
Dissertação de Mestrado defendida por John Hervin Bermudez Jaimes e aprovada em 28 de março de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel (orientadora)



Dra. Maria Ingrid Rocha Barbosa



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

---

---

## DEDICATORIA

*Dedico esse trabalho a todas as pessoas que acreditaram constantemente neste fiel servidor e amigo...*

*A toda minha família. Especialmente a minha mãe Genoveva Jaimes que desafortunadamente não conseguiu presenciar este lindo logro da minha vida; meus irmãos Sandra, Gerson e Deiby; sobrinhos Geison, Brayan e Kimberly; cunhados; tia Nelda e família em geral; que os quero muito...*

*A minha namorada Natali Gonçalves de Souza que me apoiou o tempo todo e a sua família que me recebeu na sua casa como um membro a mais deles...*

*Ronald, Olga, Caliche, M. Isavel, Diana, Julie, Yesid, Maira, os Diegos, Carlos e Eduardo com quem compartilhei não só uma amizade no Brasil, se não uma família.*

*Em geral, a todos os amigos que tive a oportunidade de conhecer neste lindo país...*



---

## AGRADECIMENTOS

Neste curto espaço, dou meus agradecimentos sinceros a todas as pessoas que participaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

A toda minha família e amigos por me apoiar nesta fase da minha vida.

À Professora Maria Regina e ao Professor Rubens que me permitiram ser parte do seu excelente grupo de pesquisa.

À Betânia por colaborar na parte administrativa deste projeto.

À Bruna por me ajudar, na parte experimental, na inoculação das bactérias e na fermentação do melaço de cana-de-açúcar para ácido láctico.

Ao Jaiver por sua colaboração na parte experimental, nos ensaios de desidratação do ácido láctico comercial e obtido por fermentação para ácido acrílico.

Ao Mario por colaborar no que foi possível no laboratório.

À Ana Paula por seu auxílio no manejo dos equipamentos cromatográficos.

A todos os companheiros do Bioen por compartilhar o laboratório e seus recursos agradavelmente.

Ao CNPq e a Braskem pelo apoio financeiro.

---

---

## RESUMO

Na presente dissertação, descreve-se a síntese do ácido acrílico por método semi-sintético. Na primeira etapa, produz-se ácido láctico por fermentação de melaço de cana-de-açúcar, em biorreator BioFlo 415, usando as bactérias *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, com estudo prévio, em *Shaker*, da temperatura, concentração de sacarose e concentração de extrato de levedura usadas com cada bactéria. Na fermentação com *Lactobacillus delbrueckii*, obteve-se o ácido láctico de concentração de 50,21 g/L e produtividade final de 1,26 g/L.h. Com *Leuconostoc mesenteroides* se produz uma concentração máxima de ácido láctico de 14,57 g/L com produtividade final de 0,41 g/L.h; e usando *Lactobacillus plantarum* se obteve uma concentração de ácido láctico de 50,59 g/L com produtividade final de 1.09 g/L.h. Na segunda etapa, sintetizou-se ácido acrílico por desidratação catalítica do ácido láctico comercial e do ácido láctico obtido da fermentação com *Lactobacillus plantarum* em reator tubular, a 300 °C e fluxo contínuo de CO<sub>2</sub>. Para isso, foram preparados, caracterizados e testados catalisadores suportados em zeólita básica do tipo NaY (KBr/NaY, KI/NaY e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/NaY). Como resultado, quando o ácido láctico comercial foi usado, a maior seletividade obtida foi de 25,66 % com uso de KBr/NaY; já com o ácido láctico obtido por fermentação, a maior seletividade obtida foi de 16,65 % com uso de KI/NaY. Durante o presente projeto, os produtos tanto das fermentações como das desidratações foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Palavras chaves: Ácido láctico, ácido acrílico, fermentação, desidratação catalítica.



---

## ABSTRACT

The present work deals with the synthesis of acrylic acid by semi-synthetic method. In the first step, lactic acid was produced by fermentation of sugarcane molasses, in bioreactor BioFlo 415, using the bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* with a previous study, in *Shaker*, of the temperature, sucrose and yeast extract concentration used to each bacterium. In the fermentation with *Lactobacillus delbrueckii*, it was produced lactic acid with concentration of 50.21 g/L and final productivity of 1.26 g/L.h; with the *Leuconostoc mesenteroides*, it was produced lactic acid with concentration of 14.57 g/L and final productivity of 0.41 g/L.h; and using *Lactobacillus plantarum*, it was obtained a concentration of lactic acid of 50.59 g/L with final productivity of 1.09 g/L.h. In the second stage, acrylic acid was synthesized by catalytic dehydration of commercial and fermented lactic acid in a tubular reactor at 300 °C and continuous flow of CO<sub>2</sub>. For this, the catalyst support on NaY Zeolite basic (KBr/NaY, KI/NaY and Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/NaY) were prepared, characterized and tested. As results, when the commercial lactic acid was used, the largest selectivity was of 25.66% with use of KBr/NaY; whereas with lactic acid obtained by fermentation, the largest selectivity was of 16.65% using KI/NaY. In this design, all products were characterized by high performance liquid chromatography (HPLC).

Key words: Lactic acid, acrylic acid, fermentation, catalytic dehydration



---

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1    INTRODUÇÃO .....	3
1.2    OBJETIVO GERAL.....	4
1.2.1    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3    ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO .....	5
CAPÍTULO 2 ESTADO DA ARTE .....	7
2.1    CANA-DE-AÇÚCAR.....	9
2.1.1    Subprodutos principais da cana-de-açúcar.....	10
2.2    ÁCIDO LÁCTICO .....	14
2.2.1    Características físico-químicas do ácido láctico.....	15
2.2.2    Obtenção de ácido láctico.....	17
2.3    Bactérias do ácido láctico.....	24
2.4    Processo disponível .....	26
2.5    Aplicações do ácido láctico .....	28
2.6    Produção global do ácido láctico .....	29
2.3    ÁCIDO ACRÍLICO .....	30
2.3.1    Propriedades físico-químicas do ácido acrílico.....	30
2.3.2    Obtenção do ácido acrílico .....	31

---

2.3.3	Usos do ácido acrílico .....	45
CAPÍTULO 3 METODOLOGIA .....		47
3.1	PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO.....	49
3.1.1	Substrato .....	49
3.1.2	Micro-organismos .....	50
3.1.3	Fonte de nitrogênio .....	53
3.1.4	Estudos prévios .....	53
3.1.5	Fermentação de melaço de cana-de-açúcar para ácido láctico.....	56
3.1.6	Métodos analíticos .....	58
3.2	PRODUÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO .....	61
3.2.1	Seleção de catalisadores .....	62
3.2.2	Preparação dos catalisadores.....	62
3.2.3	Desidratação catalítica do ácido láctico .....	65
3.2.4	Métodos analíticos .....	66
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....		69
4.1	PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO.....	71
4.1.1	Estudos prévios .....	71
4.1.2	Fermentação de melaço de cana-de-açúcar em biorreator BioFlo 415 80	
4.2	PRODUÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO .....	90
4.2.1	Preparação e caracterização de catalisadores .....	90
4.2.2	Desidratação do ácido láctico .....	96
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		109

---

---

5.1	CONCLUSÕES .....	111
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	112
CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFIA.....		115
CAPÍTULO 7 ANEXOS .....		127
7.1	ANEXO A .....	129
CAPÍTULO 8 APÊNDICES.....		131
8.1	APÊNDICE A.....	133
8.2	APÊNDICE B.....	135
8.3	APÊNDICE C .....	137



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> ) (“Maravilhoso Mundo da Nutrição: Sabor Doce”, 2011).....	9
Figura 2. Caldo de cana-de-açúcar (VEGGIE IN SAMPA, 2012).....	11
Figura 3. Bagaço de cana-de-açúcar (BIOMASSA BR ENERGÍAS RENOVÁVEIS, 2012).....	12
Figura 4. Melaço de cana-de-açúcar (OUTRA MEDICINA, 2010).....	13
Figura 5. Enantiômeros do ácido láctico (REDDY et al., 2008).....	15
Figura 6. Possíveis reações do ácido láctico (Zhang, Lin e Cen, 2008; Zhang et al., 2008).....	16
Figura 7. Produção de ácido láctico por síntese química (LUNELLI, 2010). ....	17
Figura 8. Reações presentes na produção de ácido láctico por síntese química (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004). ....	18
Figura 9. Produção do ácido láctico via processo fermentativo (LUNELLI, 2010). 19	
Figura 10. Principais caminhos de fermentação da glicose pela bactéria do ácido láctico. a) Via homofermentativa, b) Via heterofermentativa (Reddy et al., 2008).....	26
Figura 11. Biorreator batelada (PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999).....	27
Figura 12. Biorreator contínuo (PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999).....	28
Figura 13. Ácido acrílico. Átomos de carbono $\alpha$ e $\beta$ insaturados. ....	31
Figura 14. Produção sintética do ácido acrílico via acetileno (OHARA et al., 2011). ....	32
Figura 15. Produção sintética do ácido acrílico via reação Reepe de alta pressão (OHARA et al., 2011). ....	33

---

Figura 16. Produção sintética do ácido acrílico via hidrólise de acrilonitrila (OHARA et al., 2011). .....	33
Figura 17. Produção sintética do ácido acrílico via ceteno (OHARA et al., 2011). 33	
Figura 18. Produção sintética do ácido acrílico via eteno cianohidrina (BELLO, 2008). .....	34
Figura 19. Produção sintética do ácido acrílico via oxidação de propeno em único estágio (BELLO, 2008). .....	35
Figura 20. Produção sintética do ácido acrílico via oxidação de propeno em dois estágios (BELLO, 2008). .....	35
Figura 21. Rotas metabólicas hipotéticas para a biossíntese de acrilato a partir de açúcares (STRAATHOF et al., 2005). .....	37
Figura 22. Produção de ácido acrílico via fermentação do ácido láctico (GAO; MA; XU, 2011). .....	37
Figura 23. Obtenção de ácido acrílico via semissintética (LUNELLI, 2010; ZHANG; LIN; CEN, 2008). .....	38
Figura 24. Principais reações do ácido láctico (FAN; ZHOU; ZHU, 2009). .....	39
Figura 25. Possíveis rotas de obtenção do ácido acrílico a partir de ácido láctico por desidratação catalítica (LEE et al., 2010; LUNELLI et al., 2007; ZHANG; LIN; CEN, 2008; ZHANG et al., 2008, 2009). .....	40
Figura 26. Balanço de cargas na estrutura tetraédrica da zeólita (OVIEDO, 2010). .....	42
Figura 27. Mecanismo proposto na desidratação do ácido láctico para ácido acrílico, sobre zeólita NaY modificadas por KX (SUN et al., 2010). .....	45
Figura 28. Bancada de fluxo laminar vertical com recirculação de ar Pachane modelo PA 050. ....	53
Figura 29. Autoclave Phoenix Lufenco modelo. AV-50 PLUS. ....	54

---

---

Figura 30. Estufa microprocessada de cultura e bacteriologia marca QUIMIS, modelo Q316M5.....	54
Figura 31. Inoculação para fermentação em Shaker.....	55
Figura 32. Câmara Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital ( <i>Shaker</i> ) marca MARCONI, modelo MA 832. ....	56
Figura 33. Inoculação para fermentação em biorreator.....	57
Figura 34. Fermentador New Brunswick, modelo BioFlo 415.....	58
Figura 35. Centrífuga Eppendorf modelo 5810R.....	59
Figura 36. Cromatógrafo Agilent, modelo 1260 <i>Infinity Quaternary LC System</i> . ...	59
Figura 37. Estufa de secado estático com circulação e renovação de ar marca SP Labor, modelo SP-102/336. ....	61
Figura 38. Peneirador marca Produtest. ....	62
Figura 39. a) Estufa de secado estático com circulação e renovação de ar, modelo SP-102/336, marca SP Labor. b) Forno mufla microprocessado, modelo Q3 18M, marca QUIMIS.....	63
Figura 40. Agitador magnético de múltiplas posições sem aquecimento, modelo RO5, marca IKA. ....	64
Figura 41. a) Equipamento usado na desidratação do ácido láctico; b) Sistema de alimentação; c) Reator tubular coberto com um revestimento de aquecimento; d) sistema de esfriamento. ....	65
Figura 42. Difratorômetro de raios X, modelo X'Pert, marca Philips.....	66
Figura 43. Microscópio eletrônico de varredura com módulo de energia dispersiva de raios x (MEV/EDS), modelo MEV: Leo 440i, modelo EDS: 6070, marca MEV/EDS: LEO <i>Electron Microscopy</i> .....	67
Figura 44. Sputter Coater POLARON, modelo SC7620, marca VG Microtech. ....	67

---

Figura 45. Resultados obtidos nos estudos prévios, em <i>Shaker</i> , para <i>Lactobacillus delbrueckii</i> a 24 horas de fermentação. ....	72
Figura 46. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> na produção do ácido láctico. ....	73
Figura 47. Resultados obtidos nos estudos prévios, em <i>Shaker</i> , para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a 24 horas de fermentação. ....	76
Figura 48. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> na produção do ácido láctico. ....	77
Figura 49 . Resultados obtidos nos estudos prévios, em <i>Shaker</i> , para <i>Lactobacillus plantarum</i> a 24 horas de fermentação. ....	78
Figura 50. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a <i>Lactobacillus plantarum</i> na produção do ácido láctico. ....	79
Figura 51. Monitoramento on-line da fermentação de melaço de cana-de-açúcar com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	81
Figura 52. Resultados da fermentação láctea com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> em função do tempo. ....	83
Figura 53. Monitoramento on-line da fermentação de melaço de cana-de-açúcar com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ....	84
Figura 54. Resultados da fermentação láctea com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em função do tempo. ....	86
Figura 55. Monitoramento on-line da fermentação de melaço de cana-de-açúcar com <i>Lactobacillus plantarum</i> . ....	88
Figura 56. Resultados da fermentação láctea com <i>Lactobacillus plantarum</i> em função do tempo. ....	90

---

Figura 57. Catalisadores usados na desidratação do ácido láctico: a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e e) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ ...	91
Figura 58. Difratoograma de raios X dos catalisadores: a) NaY modificada, b) KBr/NaY, KI/NaY e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .....	92
Figura 59. Imagem microeletrônica dos catalisadores: a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e e) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ . ....	93
Figura 60. Perfil elementar dos catalisadores. a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ . ....	95
Figura 61. Ácido láctico. a) comercial, b) obtido por fermentação.....	96
Figura 62. Desidratação do ácido láctico comercial sem catalisador, com zeólita NaY comercial e com zeólita NaY modificada.....	98
Figura 63. Desidratação do ácido láctico comercial com os catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . ....	101
Figura 64. Desidratação do ácido láctico, obtido por fermentação, com zeólita NaY comercial e com zeólita NaY modificada.....	104
Figura 65. Desidratação do ácido láctico, obtido por fermentação, com os catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	107
Figura 66. Perfil cromatográfico da solução padrão. ....	133
Figura 67. Curva de calibração da sacarose. ....	133
Figura 68. Curva de calibração da glicose. ....	134
Figura 69. Curva de calibração da frutose. ....	134
Figura 70. Curva de calibração do ácido láctico.....	134
Figura 71. Perfil cromatográfico da solução padrão. ....	135
Figura 72. Curva de calibração do ácido láctico.....	135
Figura 73. Curva de calibração do ácido acético.....	136

---

Figura 74. Curva de calibração do ácido propanóico. .... 136

Figura 75. Curva de calibração do ácido acrílico..... 136

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção de cana-de-açúcar (FAOSTAT, 2013). .....	10
Tabela 2. Composição do caldo de cana-de-açúcar (UMEBARA, 2010). .....	11
Tabela 3. Composição do bagaço de cana-de-açúcar em base seca (%w/w) (SUN et al., 2004). .....	12
Tabela 4. Composição do melaço de cana-de-açúcar (LUNELLI, 2010). .....	13
Tabela 5. Propriedades físicas do ácido láctico (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).....	16
Tabela 6. Reportes na literatura de pesquisas sobre produção biotecnológica do ácido láctico a partir de matérias-primas baratas (WEE; KIM; RYU, 2006)....	20
Tabela 7. Bactérias do ácido láctico (LAB), desenvolvimentos recentes. ....	21
Tabela 8. Continuação Tabela 7. ....	22
Tabela 9. Propriedades físicas do ácido acrílico (OHARA et al., 2011). ....	30
Tabela 10. Catalisadores para a oxidação do Propeno em estágio único usados por Nippon Shokubai (BELLO, 2008).....	35
Tabela 11. Catalisadores do primeiro estágio (BELLO, 2008). ....	36
Tabela 12. Catalisadores do segundo estágio (BELLO, 2008).....	36
Tabela 13. Produção de ácido acrílico e acrilato de metila por desidratação de lactato de metila. ....	41
Tabela 14. Desidratação do ácido láctico para ácido acrílico usando zeólita NaY (Conversão e seletividade).....	43
Tabela 15. Caracterização da <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , LAB N. CCT 3744, segundo a FAT (2013). ....	50

---

Tabela 16. Reportes mais relevantes das bactérias do ácido láctico empregadas no presente trabalho. ....	51
Tabela 17. Caracterização da LAB N. CCT 4357, segundo a FAT (2013). ....	52
Tabela 18. Caracterização da LAB N. CCT 3751, segundo a FAT (2013). ....	52
Tabela 19. Temperaturas de crescimento das bactérias usadas, segundo a FAT (2013). ....	54
Tabela 20. Concentrações de sacarose e extrato de levedura estudada. ....	55
Tabela 21. Temperaturas estudadas para cada bactéria. ....	56
Tabela 22. Padrões usados na caracterização do caldo de melão fermentado. .	60
Tabela 23. Soluções padrões usados na caracterização do caldo de melão fermentado. ....	60
Tabela 24. Parâmetros estudados nos estudos prévios de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	71
Tabela 25. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	72
Tabela 26. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	75
Tabela 27. Parâmetros estudados nos estudos prévios de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ....	75
Tabela 28. Parâmetros estudados nos estudos prévios de <i>Lactobacillus plantarum</i> . ....	78
Tabela 29. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando <i>Lactobacillus plantarum</i> . ....	78
Tabela 30. Parâmetros da fermentação com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	80
Tabela 31. Resultados obtidos na fermentação láctea com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . ....	82

---

Tabela 32. Parâmetros da fermentação com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	83
Tabela 33. Resultados obtidos na fermentação láctea com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	85
Tabela 34. Parâmetros da fermentação com <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	87
Tabela 35. Resultados obtidos na fermentação láctea com <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	89
Tabela 36. Diâmetro médio de partícula dos catalisadores em $\mu\text{m}$ .....	94
Tabela 37. Composição elementar dos catalisadores NaY, NaY modificado, KBr/NaY, KI/NaY e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .....	96
Tabela 38. Desidratação do ácido láctico comercial sem catalisador. ....	97
Tabela 39. Desidratação do ácido láctico comercial com NaY comercial. ....	99
Tabela 40. Desidratação do ácido láctico comercial com NaY modificado. ....	100
Tabela 41. Desidratação do ácido láctico comercial com KBr/NaY.....	100
Tabela 42. Desidratação do ácido láctico comercial com KI/NaY. ....	102
Tabela 43. Desidratação do ácido láctico comercial com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .....	102
Tabela 44. Desidratação do ácido láctico fermentado sem catalisador.....	103
Tabela 45. Desidratação do ácido láctico fermentado com NaY comercial.....	105
Tabela 46. Desidratação do ácido láctico fermentado com NaY modificado.....	106
Tabela 47. Desidratação do ácido láctico fermentado com KBr/NaY. ....	106
Tabela 48. Desidratação do ácido láctico fermentado com KI/NaY.....	108
Tabela 49. Desidratação do ácido láctico fermentado com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .....	108
Tabela 50. Anexo A. Folha para descarte de resíduos químicos, segundo a FEQ. ....	129



---

## NOMENCLATURA

ADP: Difosfato de adenosina, *Adenosine diphosphate*

ART: Açúcares redutores totais

ATP: Trifosfato de adenosina, *Adenosine triphosphate*

BIOEN: Laboratório de Bioenergia

CG: Cromatografia gasosa

CTBE: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DHAP: Fosfato de dihidroxiacetona, *Dihydroxyacetone phosphate*

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas

FAT: Fundação André Tosello

FAOSTAT: *The Statistics Division of the FAO*

FDA: *Food and Drug Administration*

FEQ: Faculdade de Engenharia Química

GRAS: Geralmente reconhecido como seguro, *Generally recognized as safe*

g: Grama

h: Hora

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

IAA: Instituto de Açúcar e Alcool

kg: Quilograma

K: kelvin

L: Litro

LAB: *Lactic acid bacteria*

---

LDH: Lactato desidrogenase

LOPCA: Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado

min: Minutos

mL: Mililitros

NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

PKP: Fosfocetolase

PLA: Políácido láctico

PLLA: Poli(L-ácido láctico)

PROÁLCOOL: Programa Nacional do Álcool

Ref: Referência

t: Tempo

T: Temperatura

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

---

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO



## 1.1 INTRODUÇÃO

Com a crise energética, após a segunda guerra mundial, o preço do barril de petróleo se elevou abruptamente e, como consequência, mudou a dependência total do recurso fóssil e desencadeou pesquisas tecnológicas baseadas no uso da biomassa vegetal como substrato. Além disso, a preocupação atual com as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento da atmosfera, o esgotamento das reservas de petróleo e o desenvolvimento socioeconômico estimularam a pesquisa de produtos renováveis, capazes de substituírem os recursos fósseis (ATALA, 2004; DANNER; BRAUN, 1999; GIMENES, 2010).

No Brasil, usa-se a cana-de-açúcar como fonte de carbono. Uso que aumentou com a criação do Instituto de Açúcar e Alcool (IAA) em 1930 e se fortaleceu com o Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) em 1975 (SILVEIRA, 2005). Em 2008, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) com o objetivo de *“Promover uma maior consciência sobre o valor da biodiversidade, para estimular a sua conservação e melhorar a qualidade de vida do homem”* lançou o Programa FAPESP de Pesquisa em Bioenergia (BIOEN), o qual estimula atividades de pesquisa e desenvolvimento para o avanço do conhecimento e sua aplicação em áreas relacionadas à produção de Bioenergia no Brasil (BIOEN-FAPESP, 2013). No mesmo ano, assinou o acordo de cooperação FAPESP-BRASKEM para dar apoio aos projetos de pesquisa científica e tecnológica nas áreas de: Processos de síntese de intermediários, monômeros e polímeros a partir de matérias primas renováveis; Captura, armazenamento e conversão de CO<sub>2</sub>; Estudos e desenvolvimento de materiais que atribuam aos polímeros (obtidos a partir de matérias primas renováveis, ou não) as propriedades físico-químicas que possibilitam sua utilização nas diferentes aplicações demandadas pelo mercado; Poliolefinas (catálise, modificação química, outros); Formação de recursos humanos altamente qualificados nos itens descritos.

Dentro deste contexto, no Laboratório de Bioenergia (BIOEN) do Laboratório de Otimização, Projetos e Controle Avançado (LOPCA) vinculado à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP e dirigido pelo Professor Dr. Rubens Maciel Filho, se desenvolve o projeto temático “*Um processo integrado para produção total de bioetanol e emissão zero de CO<sub>2</sub>*”. Paralelamente, desenvolvem-se rotas para a produção do ácido acrílico e propanóico pelo processo fermentativo de açúcares, do qual faz parte este trabalho.

Portanto, na presente pesquisa se desenvolveu uma metodologia alternativa para a produção de ácido acrílico a partir de fontes renováveis. Neste conceito, melaço de cana-de-açúcar foi usado como substrato de partida.

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

Sintetizar ácido acrílico via semissíntese a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar para ácido láctico e sua posterior desidratação. Demonstra-se, assim, a viabilidade da cana-de-açúcar como fonte renovável e promissória na produção de ácidos orgânicos derivados do petróleo.

### **1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Identificar espécies de micro-organismos que produzem ácido láctico a partir de fontes renováveis.
- ✓ Produzir ácido láctico a partir da fermentação dos açúcares redutores de melaço de cana-de-açúcar
- ✓ Identificar rotas de obtenção do ácido acrílico a partir do ácido láctico ou seu éster.
- ✓ Sintetizar ácido acrílico a partir do ácido láctico obtido por fermentação de melaço de cana-de-açúcar.

### **1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO**

A presente dissertação de mestrado está dividida em oito capítulos.

No Capítulo 1, apresenta-se a introdução, dando a conhecer a importância do tema, a justificativa. Além disso, apresentam-se os objetivos e a organização do trabalho.

No capítulo 2, apresenta-se o estado da arte. Nela, descreve-se uma revisão bibliográfica dos tópicos mais relevante da presente pesquisa como cana-de-açúcar, ácido láctico e ácido acrílico.

No Capítulo 3, apresenta-se a metodologia. Na primeira parte, descreve-se a metodologia relacionada à produção do ácido láctico a partir da fermentação do melaço de cana-de-açúcar; ressaltando o substrato, os micro-organismos e a fonte de nitrogênio, os estudo prévios, a fermentação e os métodos analíticos. Na segunda parte, descrevem-se a metodologia empregada na produção do ácido acrílico a partir da desidratação catalítica do ácido láctico; destacando a seleção e preparação dos catalisadores, os ensaios realizados e a caracterização tanto dos produtos como dos catalisadores.

No Capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos segundo a metodologia estabelecida no Capítulo 3.

No Capítulo 5, apresentam-se as conclusões e sugestões para trabalhos futuros segundo os resultados obtidos.

No Capítulo 6, apresenta-se a bibliografia levada em conta para o desenvolvimento da presente dissertação.

No Capítulo 7, apresentam-se os anexos. Nele, amostra-se a folha usada para descarte de resíduos químicos.

O Capítulo 8 compreende três apêndices. Nele, apresentam-se as curvas de calibração dos métodos cromatográficos usados na quantificação dos principais

produtos da fermentação, na desidratação do ácido láctico e os trabalhos publicados até o momento.

---

# CAPÍTULO 2

## ESTADO DA ARTE



No presente capítulo, descrevem-se os últimos avanços científicos tomados como base para o desenvolvimento da presente pesquisa.

## 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma planta originária do sudeste da Ásia e cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). Pertence ao gênero *Saccharum*, da família *Poaceae* com pelo menos seis espécies; *S. officinarum*, *S. Spontaneum*, *S. barberi*, *S. Sinense*, *S. Robustum*, *S. Edule* (JAMES, 2004). A família *Saccharum officinarum* (Figura 1) foi trazida pelos Portugueses ao Brasil no início do século XV (LUNELLI et al., 2010).



Figura 1. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (“Maravilhoso Mundo da Nutrição: Sabor Doce”, 2011).

A cultura produz em curto período um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética (LIMA et al., 2001). A sua contribuição socioeconômica é de grande interesse devido à capacidade da planta de sintetizar sacarose, alta resistência a doenças e pragas, fácil adaptação à terra e ao clima; qualidades estas que foram conseguidas por meio de modificações genéticas da mesma (JAMES, 2004; LIMA et al., 2001).

Por outro lado, a avaliação ambiental do ciclo de vida da cana-de-açúcar tem mostrado vantagens em comparação a outras fontes renováveis de açúcares tais como milho e beterraba, em função da energia consumida, emissões de gases de efeito estufa, seu possível potencial de acidificação devido ao seu alto conteúdo de açúcar e ao deslocamento de combustíveis fósseis por energia

renovável a partir da fibra da cana-de-açúcar (RENOUF; WEGENER; NIELSEN, 2008).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database* (FAOSTAT), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. No último relatório em 2011, o Brasil registrou uma produção maior a 734 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (Tabela 1), superando a produção da Índia, China, Tailândia, Paquistão, México e Filipinas (FAOSTAT, 2013).

Tabela 1. Produção de cana-de-açúcar (FAOSTAT, 2013).

País	Produção (Toneladas)					
	2011	2010	2009	2008	2007	2006
Brasil	734006000	719157000	672157000	645300000	549707000	477411000
Índia	342382000	277750000	285029000	348188000	355520000	281172000
China	115123560	197212010	116251272	124917502	113731917	93306257
Tailândia	95950400	68807800	66816446	73501600	64365500	47658100
Paquistão	55308500	49372900	50045000	63920000	54741600	44665500
México	49735300	50421600	49492700	51106900	52089400	50675800
Filipinas	34000000	34000000	22932800	26601400	22235000	24345100

Embora o Brasil seja produtor de cana-de-açúcar há séculos, a sua importância no País só aumentou com a criação do Instituto de Açúcar e Alcool (IAA) pelo presidente Vargas em 1930; posteriormente, em 1975, o cultivo se expandiu pelo País com o Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), sendo o produto agrícola mais cultivado no Brasil, superando a produção de soja e milho, cuja produção vem crescendo gradualmente nos últimos anos (JAMES, 2004; SILVEIRA, 2005).

### 2.1.1 Subprodutos principais da cana-de-açúcar

A partir da cana-de-açúcar são obtidos o caldo, o bagaço e o melaço. Três subprodutos naturais usados como matéria-prima na indústria de açúcar, álcool, energia, bebidas, couros, papel e produtos químicos biodegradáveis como o ácido láctico (AMALRAJ et al., 2008; AQUINO et al., 2008; DUMBREPATIL et al., 2007; HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Isto mostra a importância desta planta na economia e no desenvolvimento do País, razão pela qual é alvo de constantes pesquisas (LUNELLI, 2010).

### 2.1.1.1 Caldo de cana-de-açúcar

O caldo é um líquido amarelo obtido a partir da moenda da cana-de-açúcar (Figura 2). Considerado o principal subproduto da cana-de-açúcar por ter a maior porcentagem de açúcar da mesma. O caldo de cana-de-açúcar tem aproximadamente 80% de água, 19% de açúcares além de outros componentes em baixas quantidades (Tabela 2). Dos açúcares presentes no caldo, a sacarose representa a maior quantidade com aproximadamente 18%, seguido de glicose e frutose, com aproximadamente 0,5% cada um (UMEBARA, 2010).



Figura 2. Caldo de cana-de-açúcar (VEGGIE IN SAMPA, 2012).

Tabela 2. Composição do caldo de cana-de-açúcar (UMEBARA, 2010).

Componentes	Porcentagem (%)
Água	±80,0
Açúcares	±19,0
- Sacarose	±18,0
- Glicose	±0,5
- Frutose	±0,5
Sais	0,4
Matéria orgânica	1,2
Proteínas	0,2
Ácidos combinados	0,5
Ácidos livres	0,03
Pectinas	0,04
Gomas	0,05
Gorduras	0,01
Ceras	0,03
Materiais corantes e vitaminas	0,04

Embora o caldo de cana-de-açúcar seja empregado como refresco natural e produção de açúcar (BHATTACHARYA et al., 2001), seu alto teor de açúcares faz dele uma matéria-prima vital nos processos fermentativos, nos quais se produz

etanol, bebidas alcoólicas e produtos químicos renováveis (AQUINO et al., 2008; LIMTONG; SRINGIEW; YONGMANITCHAI, 2007; TIMBUNTAM; SRIROTH; TOKIWA, 2006).

### 2.1.1.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço é um material fibroso de cor bege, obtido como subproduto abundante na indústria de açúcar e álcool, no processo de moenda da cana-de-açúcar (Figura 3). Nos últimos anos, o interesse da indústria pelos resíduos da agricultura como matérias-primas têm incrementado o apego para o bagaço (CTBE, [s.d.]).



Figura 3. Bagaço de cana-de-açúcar (BIOMASSA BR ENERGÍAS RENOVÁVEIS, 2012).

A sua composição química em porcentagem em base seca (Tabela 3) é de aproximadamente 43,6% de celulose, 33,5% de hemicelulose, 18,1% de lignina e uma porcentagem remanente de cinzas, cera e minerais (SOLIMAN; AHMED; FADL, 2011; SUN et al., 2004); composição que faz do bagaço uma boa fonte de carbono de baixo custo.

Tabela 3. Composição do bagaço de cana-de-açúcar em base seca (% w/w) (SUN et al., 2004).

Polissacarídeo	% w/w
Celulose	43,6
Hemicelulose	33,5
Lignina	18,1
Outros	4,8

O bagaço tem sido principalmente usado como fonte de energia (GRIFFIN, 2011), geralmente usado nas caldeiras das usinas de produção de açúcar e etanol e como precursor de celulose na fabricação de papel (AMALRAJ et al., 2008). É

empregado como fonte de alimento para bovinos; obtenção de produtos químicos renováveis, entre outros (GRIFFIN, 2011; HUANG et al., 2009; LAOPAIBOON et al., 2010; PANDEY et al., 2000; SOLIMAN; AHMED; FADL, 2011; TEXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007). Atualmente, é alvo de diversas pesquisas na bioconversão em etanol de segunda geração (ANDRADE, 2012; BAYONA, 2012; RABELO, 2010).

### 2.1.1.3 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar é uma massa viscosa de cor marrom (Figura 4) obtido como subproduto da indústria açucareira, no processo de cristalização e decantação, na fabricação de açúcar e álcool (CHAUHAN et al., 2011; LI et al., 2010; LUNELLI, 2010), com uma produção entre 40 kg a 60 kg por tonelada de cana-de-açúcar processada (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, [s.d.]).



Figura 4. Melaço de cana-de-açúcar (OUTRA MEDICINA, 2010).

A sua composição química é principalmente sacarose seguido por glicose e frutose, em um total de aproximadamente 61,04% de açúcares redutores totais (ART) (Tabela 4) (LUNELLI, 2010). Contém minerais como cálcio, cobalto, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, selênio, sódio, zinco e sulfitos (MELAÇOS BRASILEIROS, [s.d.]).

Tabela 4. Composição do melaço de cana-de-açúcar (LUNELLI, 2010).

Açúcar	Porcentagem (%)
Sacarose	54,50
Glicose	3,46
Frutose	3,08
ART	61,04

A sua importância como matéria-prima é cada dia maior na indústria devido ao seu baixo custo, alto teor de minerais e açúcares (BRETHAUER; WYMAN, 2010; CAZETTA et al., 2007), e não precisa de pré-tratamentos para liberar o açúcar, já que a sua maioria está na forma de sacarose, o que o torna ótimo para processos de fermentação (GHORBANI et al., 2011; LUNELLI, 2010). Seu uso tem incrementado, passando pela fabricação de rapadura, doces, alimento para animais e produção de etanol (GHORBANI et al., 2011; SILVA et al., 2011). Além disso, estudos recentes têm mostrado a importância da biomassa vegetal como fonte de carbono na produção de produtos químicos de alto valor agregado por fermentação; obtendo como resultado a penicilina e ácido láctico (CALABIA; TOKIWA, 2007; HASSANI; YEGANI; HASSANI, 2011).

Levando em conta os aspectos mencionados anteriormente, escolheu-se o melaço de cana-de-açúcar como fonte principal de matéria-prima na obtenção do ácido láctico via fermentativa, na presente pesquisa.

## 2.2 ÁCIDO LÁCTICO

O ácido láctico, também conhecido como ácido 2-hidroxiopropanóico, é o ácido orgânico com maior ocorrência na natureza dos carboidratos (DATTA; HENRY, 2006). Desempenho atribuído ao fato de ser um composto viável, por ser obtido a partir de uma variedade de bioprodutos agroindustriais de baixo custo; e polivalente, porque tem uma ampla faixa de aplicações na indústria; além de ser ecoamigável (JOHN et al., 2009). Ademais, o isômero L-ácido láctico é aceito como uma substância segura para o consumo humano (LIU; HAN; ZHOU, 2011).

O ácido láctico é o ácido orgânico mais importante. Descoberto por *Swedish Scientist C.W. Scheele* em 1780 a partir do leite azedo (REDDY et al., 2008). Em 1989, Lavoisier o considerou componente do leite e o chamou “*acide lactique*”, que se tornou a possível origem da terminologia atual do ácido láctico. Em 1857, Pasteur descobriu que não era o componente do leite, mas era um metabolito da fermentação gerado por alguns micro-organismos (WEE; KIM; RYU, 2006). Em

1881, foi comercializado por *Avery* em *Littleton*, USA (JOHN et al., 2009). No início dos anos 60, foi desenvolvido um método para sintetizar quimicamente o ácido láctico (WEE; KIM; RYU, 2006). Foi identificado como matéria-prima para a síntese de plásticos biodegradáveis na década de 40 e início dos anos. Desde 1982, o mercado de consumo do ácido láctico é dominado pelo setor de alimentos e bebidas 50. Em 1999, Hepner avaliou o aumento na produção do ácido láctico para 5-8% anual (REDDY et al., 2008). Finalmente, em 2012, estimou-se uma demanda global do ácido láctico de 367,3 mil toneladas devido ao crescimento de catalisadores primários na indústria e novas aplicações (PRWEB, 2012).

### 2.2.1 Características físico-químicas do ácido láctico

O ácido láctico é uma molécula bifuncional de característica ácido-álcool e com um átomo de carbono quiral que lhe confere isomeria espacial ótica. Portanto, existem dois enantiômeros (*L*)- e (*D*)-ácido láctico (Figura 5) os quais diferem no efeito de polarizar a luz; e uma mistura racêmica *DL* que é opticamente inativa (LASPRILLA et al., 2012). Dos isômeros do ácido láctico, o isômero *L*-ácido láctico é considerado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), o isômero *D*-ácido láctico não é metabolizado pelos animais, causando acidose e descalcificação (ADSUL; VARMA; GOKHALE, 2007).

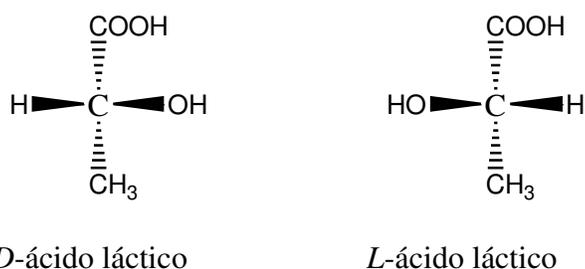


Figura 5. Enantiômeros do ácido láctico (REDDY et al., 2008).

Quimicamente, pode ser considerado como um ácido de Brønsted, monoprotico, fraco, de caráter ácido e básico; puro é um sólido branco cristalino com baixo ponto de fusão, miscível em água, álcool, glicerol e furfural e insolúvel em clorofórmio (LUNELLI, 2010), comercializado em solução aquosa de 85%-90%

(SIGMA-ALDRICH, [s.d.]), sua densidade varia linearmente com a concentração do ácido láctico na solução e com a temperatura (LUNELLI, 2010). Na Tabela 5, apresentam-se algumas propriedades físicas do ácido láctico (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Tabela 5. Propriedades físicas do ácido láctico (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Propriedade	Valor
Fórmula molecular	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Massa molar	90,08 g/mol
Ponto de fusão	L: 53 °C D: 53 °C
Ponto de ebulição	122 °C, 12 mmHg
Constante de dissociação, K <sub>a</sub> a 25°C	1,37x10 <sup>-4</sup>
Calor de combustão	1361 Kg/mol
Calor específico	190 J/mol/°C

Sua característica de álcool e ácido carboxílico lhe confere alta reatividade, participando em reações de desidratação, descarboxilação, condensação, redução, desidrogenação, esterificação e polimerização (Figura 6) (ZHANG; LIN; CEN, 2008). No entanto, a rota de interesse, neste trabalho, é a desidratação do ácido láctico para ácido acrílico.

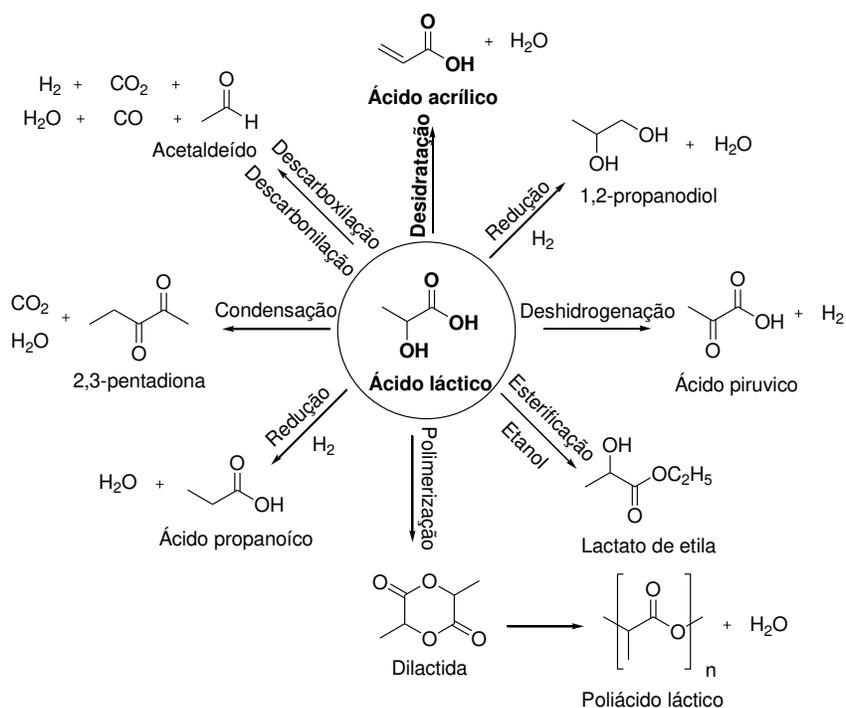


Figura 6. Possíveis reações do ácido láctico (Zhang, Lin e Cen, 2008; Zhang et al., 2008).

## 2.2.2 Obtenção de ácido láctico

De forma geral, o ácido láctico pode ser obtido por via sintética a partir de derivados do petróleo e por via fermentativa a partir de fontes renováveis como a cana-de-açúcar (LUNELLI, 2010). Embora a via sintética seja industrialmente mais antiga, atualmente se estima que 90% do ácido láctico produzido é obtido por via fermentativa (ADSUL; VARMA; GOKHALE, 2007).

### 2.2.2.1 Via sintética

A produção do ácido láctico via sintética baseia-se na produção do correspondente ácido a partir de fontes petroquímicas, geralmente (Figura 7).

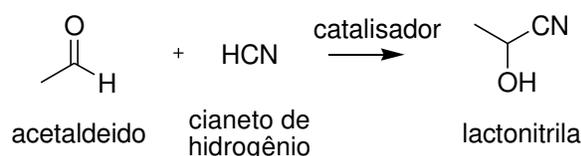


Figura 7. Produção de ácido láctico por síntese química (LUNELLI, 2010).

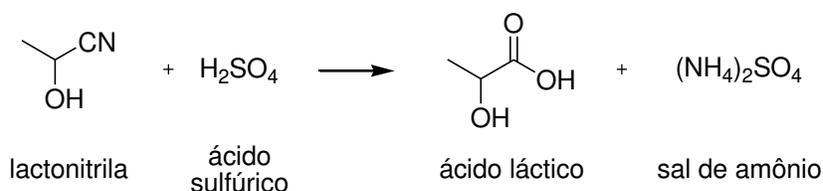
Neste processo, o acetaldeído e o cianeto de hidrogênio, em meio básico e em alta pressão são usados para produzir lactonitrila, que posteriormente é purificada por destilação. Logo, a lactonitrila é hidrolisada com ácido sulfúrico ou clorídrico para produzir ácido láctico e sal de amônio como subproduto (LI; CUI, 2010). Para purificar o ácido láctico, se adiciona metanol à solução anterior para obter lactato de metila, o qual é purificado por destilação e hidrolisado com água

na presença de um catalisador ácido para produzir ácido láctico. Finalmente, o ácido láctico é recuperado e purificado segundo as necessidades do produto; o metanol recuperado é reciclado ao processo (Figura 8) (LUNELLI, 2010; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

**Formação da lactonitrila**



**Oxidação da lactonitrila para ácido láctico**



**Purificação do ácido láctico (Esterificação/Hidratação)**

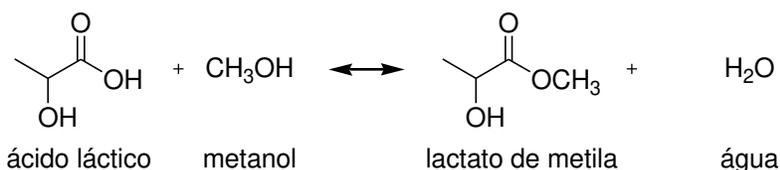


Figura 8. Reações presentes na produção de ácido láctico por síntese química (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

A vantagem do processo sintético é a obtenção do produto com baixo custo em comparação com o processo fermentativo (LIEW; TANAKA; MORITA, 1995). Mas a desvantagem neste processo é que o ácido láctico é produzido como uma mistura racêmica de *DL*-ácido láctico, o que dificulta a purificação dos isômeros (MOON; WEE; CHOI, 2012).

**2.2.2.2 Via fermentativa**

A produção de ácido láctico por métodos fermentativos data de milhares de anos, como é conhecido na cultura chinesa onde se usava para fermentar os alimentos para sua conservação (LIU; HAN; ZHOU, 2011). O processo fermentativo do ácido láctico é estudado desde 1935 usando diferentes tipos de

micro-organismos e condições operacionais de fermentação, como fonte de carbono, pH, temperatura e fontes de nitrogênio (LUNELLI, 2010). Atualmente, representa 90% da produção de ácido láctico comercial (ADSUL; VARMA; GOKHALE, 2007).

No processo fermentativo (Figura 9), o ácido láctico é obtido a partir de fontes renováveis com as seguintes características: baixo custo, baixos níveis de contaminantes, rápida taxa de produção, alto rendimento, pouca ou nenhuma formação de subproduto, capacidade de ser fermentado com pouco ou nenhum pré-tratamento e estar disponível o ano todo (WEE; KIM; RYU, 2006). Nesse sentido, as fontes renováveis mais comuns são a cana-de-açúcar (DUMBREPATIL et al., 2007), milho (CUI; LI; WAN, 2011), beterraba (CALABIA; TOKIWA, 2007), queijo (COELHO et al., 2011) e soja (QIN et al., 2010), entre outras (Tabela 6).

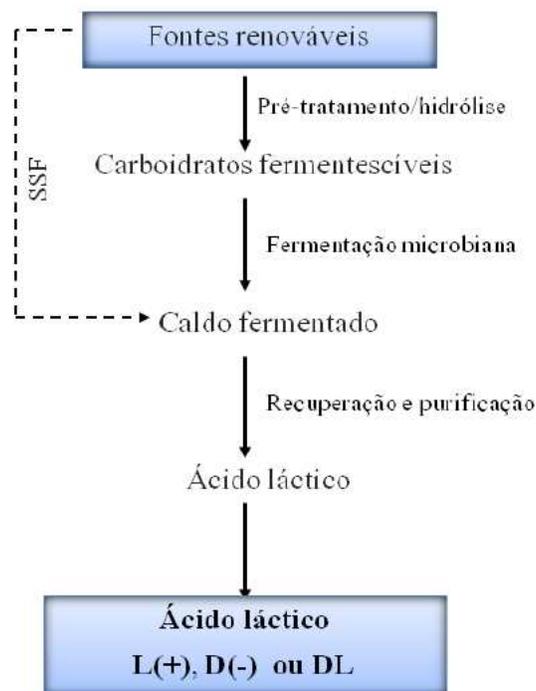


Figura 9. Produção do ácido láctico via processo fermentativo (LUNELLI, 2010).

A biomassa vegetal em alguns casos é pré-tratada para obter os carboidratos fermentáveis livres (sacarose, glicose, frutose) que são a base fundamental da fermentação.

Tabela 6. Reportes na literatura de pesquisas sobre produção biotecnológica do ácido láctico a partir de matérias-primas baratas (WEE; KIM; RYU, 2006).

Matéria-prima	Micro-organismo	Ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/L.h)
Melaço	Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130	90,0	3,8
	Enterococcus faecalis RKY1	95,7	4,0
Trigo	Lactobacillus lactis ssp. lactis ATCC 19435	106,0	1,0
	Enterococcus faecalis RKY1	102,0	4,8
Milho	Enterococcus faecalis RKY1	63,5	0,5
	Lactobacillus amilovorius ATCC 33620	10,1	0,8
Mandioca	Lactobacillus amilovorius ATCC 33620	4,8	0,2
Batata	Lactobacillus amilovorius ATCC 33620	4,2	0,1
Arroz	Lactobacillus sp. RKY2	129,0	2,9
Cevada	Lactobacillus casei NRRL B-441	162,0	3,4
	Lactobacillus amylophilus GV6	27,3	0,3
Celulose	Lactobacillus coryniformis ssp. torquens ATCC 256000	24,0	0,5
Resíduos de papel	Lactobacillus coryniformis ssp. torquens ATCC 256000	23,1	0,5
Madeira	Lactobacillus delbrueckii NRRL B-445	108,0	0,9
	Enterococcus faecalis RKY1	93,0	1,7
Soro de leite	Lactobacillus helveticus R211	66,0	1,4
	Lactobacillus casei NRRL B-441	46,0	4,0

Posteriormente, o carboidrato é fermentado pelo uso de bactérias do ácido láctico (*LAB*) escolhidas segundo o carboidrato a ser fermentado e a aplicação do ácido láctico produzido (LUNELLI, 2010; MAYO et al., 2010; MORONI; ARENDT; BELLO, 2011; WEE; KIM; RYU, 2006). Já na fermentação, os parâmetros como temperatura, agitação e pH são determinados segundo as características de trabalho do micro-organismo empregado na fermentação (LUNELLI et al., 2007).

Outro fator importante na fermentação é a fonte de nitrogênio que fornece proteína à bactéria e ajuda no crescimento e produção da mesma. Neste sentido, o extrato de levedura tem sido a fonte de nitrogênio mais representativa na literatura por causa do seu desempenho. Assim, Coelho *et al.* (2011) reportam melhores rendimentos e produtividade do extrato de levedura em comparação com a levedura autolisada, milhocina e proteína de algodão (pró-flo), mas o alto custo do extrato de levedura dá um efeito negativo para a produção de grandes quantidades do ácido láctico. Portanto, outros substratos têm sido estudados para substituí-lo (Tabela 7) (TIMBUNTAM; SRIROTH; TOKIWA, 2006).

Tabela 7. Bactérias do ácido láctico (LAB), desenvolvimentos recentes.

Bactéria	Biomassa vegetal ou substrato	Fonte de carbono	Fonte de Nitrogênio	T (°C)	pH	Rendimento (g AL/g glicose)	Produtividade [g/(L·h)]	Pureza óptica (%)	Isômero	Ref.
Lactobacillus delbrueckii Uc-3	Melaço de cana-de-açúcar	Glicose	Extrato de levedura	42-47	5,3-6,0	0,96	4,30	-	L	(DUMBREPATIL et al., 2007)
Lactobacillus delbrueckii	NCIM 2365 Cana-de-açúcar hidrolisada	Glicose	Extrato de levedura Leite em pó desnatado	42	4-6	0,87	1,6	-	L	(KADAM et al., 2006)
	Uc-3					0,98	3,2			
Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii (NCIM 2365)	Cana-de-açúcar	Glicose Frutose Sacarose	MRS	41	-	-	-	-	L	(RAMANJOOLOO et al., 2009)
Lactobacillus sp. FCP2	Caldo de cana-de-açúcar	Glicose Sacarose	Extrato de levedura Levedura autolisada Levedura seca Larvas de bicho da seda Resíduos de camarão	40	6	0,96	2,8	-	L	(TIMBUNTAM; SRIROTH; TOKIWA, 2006)
Bacillus SP. 2-6	Soja	Glicose	Extrato de levedura	50	6,0	-	3,53	94	L	(QIN et al., 2010)
Lactobacillus pentosus NRRL B-227				30		-	-	-		
Lactobacillus delbrueckii FAT 0846	Melaço de soja	Sacarose Glicose Frutose Galactose	-	45	6	-	-	-	L	(KARP et al., 2011)
Lactobacillus Plantarum NRRL B-4496				30		-	-	-		
L. agilis LPB 56				30		-	-	91		
Lactobacillus plantarum As.1.3	Glicose	Glicose	Malte sprout Milhocina NH <sub>4</sub> Cl NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> Diamina Citrato	55	6,8	0,98	13,0 3,20	-	L	(LIU et al., 2010)

Tabela 8. Continuação Tabela 7.

Bactéria	Biomassa vegetal ou substrato		Fonte de carbono	Fonte de Nitrogênio	T (°C)	pH	Rendimento (g AL/g glicose)	Produtividade [g/(L·h)]	Pureza óptica (%)	Isômero	Ref.
Leuconostoc mesenteroides NRRL B512	Cana-de-açúcar	Caldo	Glicose Sacarose	Levedura autolisada Extrato de levedura CSL Pro-flo	30	6,2	41,16	0,91	-	D	(COELHO et al., 2011)
		Melaço					38,4	0,85			
	Soro de queijo	43,8	0,80								
Sporolactobacillus sp. CASD	Glicose		Glicose	Farelo de Amendoim	42	6,2-6,5	0,93	3,8	99,3	D	(WANG et al., 2011)
Sporolactobacillus sp. CASD	Glicose		Glicose	Extrato de levedura	42	6,2-6,5	-	-	-	D	(ZHAO et al., 2010)
Lactobacillus delbrueckii JCM 1148	Cana-de-açúcar	Caldo	Glicose Frutose Sacarose	-	40	6	0,95	1,66	96,7	D	(CALABIA; TOKIWA, 2007)
		Melaço					0,9	1,48			
	Caldo de beterraba	0,88	1,16								
Lactobacillus plantarum	Melaço de cana-de-açúcar		Sacarose	Extrato de levedura	34	5	0,42	-	-	D,L	(LUNELLI et al., 2010)
L. rhamnosus							0,79	0,37			
L. brevis ATCC 367							0,67	0,36			
L. rhamnosus + L. brevis	Glicose/xilose (3:1)						0,73	0,40			
L. rhamnosus + L. brevis (12 h)			Glicose/ Xilose	Extrato de levedura	37	5	0,72	0,37	-	D,L	(CUI; LI; WAN, 2011)
L. rhamnosus							0,59	0,49			
L. brevis	Tratamento básico (NaOH) de palha de milho						0,54	0,45			
L. rhamnosus + L. brevis							0,70	0,58			
L. rhamnosus + L. brevis (12 h)							0,59	0,49			

\* produção (g/L)

O processo fermentativo pode ser realizado por fermentação batelada (CAZETTA et al., 2007), fermentação batelada alimentada (LUNELLI, 2010) ou fermentação contínua (PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999). Maiores concentrações são obtidas nas fermentações batelada e batelada alimentada e maior produtividade com fermentações contínuas (MOON; WEE; CHOI, 2012).

Em relação à separação e purificação de lactato, diversas técnicas como osmose reversa (LIEW; TANAKA; MORITA, 1995), reação química esterosseletiva com posterior separação por cromatografia (PAIK et al., 2011), extração por solventes (MARINOVA et al., 2004), cromatografia preparativa (THANG; NOVALIN, 2008), reação extrativa (JÄRVINEN et al., 2000), cromatografia de alta eficiência (ZHANG et al., 1998) e membranas (SCHLOSSER; KERTÉSZ; MARTÁK, 2005), têm sido estudadas.

A vantagem significativa sobre a síntese química é que a produção biológica pode usar matérias-primas baratas e ricas em carboidratos, já que o custo de matéria-prima é um dos fatores mais importantes na produção econômica do ácido láctico. Ainda assim, a eficiência e economia da fermentação do ácido láctico final são alvo de melhoria. Portanto, diversas pesquisas são enfocadas na busca de novas e eficazes fontes nutricionais, como também de novas técnicas de fermentação que permitam conversão do substrato e produtos com alto rendimento (REDDY et al., 2008). Outra vantagem na produção do ácido láctico pelo processo fermentativo é a possibilidade de obter um isômero (*D* ou *L*) com escolhido na fermentação (LASPRILLA et al., 2012; MOON; WEE; CHOI, 2012).

A principal desvantagem na produção do ácido láctico por via fermentativa é o alto custo de separação e produção (ESTELA et al., 2007). Quando são usados materiais refinados na produção, o custo da purificação do produto pode diminuir significativamente. No entanto, isto é ainda desfavorável, porque a purificação de carboidratos é ainda mais cara que o custo da produção (WEE; KIM; RYU, 2006). Não obstante, várias fontes renováveis têm sido empregadas na produção econômica do ácido láctico (Tabela 7).

## 2.3 Bactérias do ácido láctico

As fontes microbianas primárias do ácido láctico foram uma bactéria do ácido láctico e o fungo *Rhizopus*. No entanto, há séculos é evidenciado que os melhores micro-organismos capazes de produzirem ácido láctico são as bactérias (LUNELLI, 2010; MOON; WEE; CHOI, 2012; WEE; KIM; RYU, 2006). Micro-organismos que ganharam o nome de bactéria do ácido láctico, também conhecidas como LAB do inglês *Lactic acid bacteria*, nome dado para designar “organismos do leite azedo” (LUNELLI, 2010). Além disso, envolvem um grupo heterogêneo de micro-organismos que apresentam uma propriedade metabólica comum na produção do ácido láctico. São descritas como organismos anaeróbicos facultativos, Gram (+), não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausente, exigentes quanto aos fatores nutricionais, tolerantes a ácido, estritamente fermentativas com a formação do ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar, e aceitas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para o organismo humano (LIU; HAN; ZHOU, 2011; LUNELLI, 2010; MAYO et al., 2010).

As bactérias do ácido láctico pertencem aos gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, e *Leuconostoc*; sendo o gênero *Lactobacillus* um dos mais usados na produção industrial do ácido láctico (MAYO et al., 2010). São classificadas em dois grupos principalmente LAB homofermentativas e LAB heterofermentativas; nomes que foram propostos por Orla-Jensen em 1919 (KASCAK; KOMINEK; ROEHR, 2008).

No momento da escolha da LAB a trabalhar, têm que ser atendidas, além do substrato ou fonte de carboidrato, as condições de crescimento da bactéria como o meio de cultura (açúcares, fonte de nitrogênio, temperatura e pH), já que esses parâmetros são características de cada micro-organismo e um manuseio inadequado pode inibir o crescimento, diminuir o rendimento de produção do ácido, variar a pureza ótica ou até matar o micro-organismo. Portanto, são vários os trabalhos desenvolvidos no estudo dos efeitos desses fatores; especialmente

das fontes de carboidrato e nitrogênio (Tabela 7). Estudos têm mostrado a importância da cana-de-açúcar como fonte de carboidratos, devido à sua capacidade de sintetizar sacarose, ter alta resistência a doenças, pragas e fácil adaptação à terra e ao clima. Qualidades que lhe deram uma excelente contribuição socioeconômica (JAMES, 2004; LIMA et al., 2001).

### 2.3.1 LAB homofermentativas

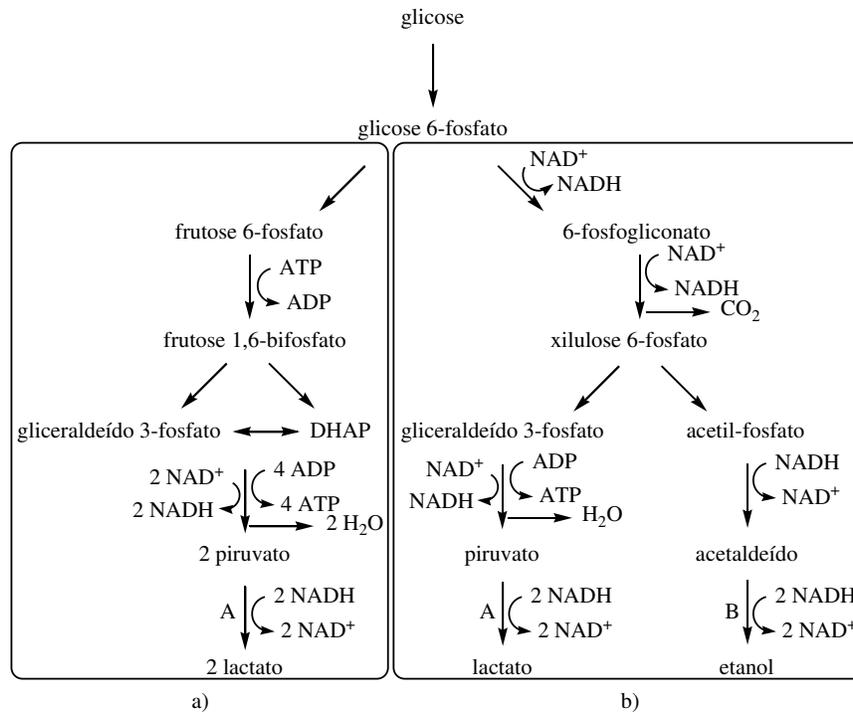
São bactérias que normalmente metabolizam glicose via frutose 6-fosfato (Figura 10) para produzir mais de 85% de ácido láctico, mas não a partir de derivados da hemicelulose como xilose ou arabinose (MACIEL FILHO, 2012; REDDY et al., 2008). Fermentam um mol de glicose para dois mols do ácido láctico, gerando um rendimento líquido de dois mols de ATP por molécula de glicose metabolizada (REDDY et al., 2008). A esse grupo pertencem os gêneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, e alguns *Lactobacillus* (*delbrueckii*, *helveticus*, *ramnosus* e *acidophilus*) (CUI; LI; WAN, 2011; MACIEL FILHO, 2012; MAYO et al., 2010).

### 2.3.2 LAB heterofermentativas

São bactérias que metabolizam glicose via 6-fosfogliconato, Figura 10, para produzir cerca de 50% do ácido láctico e subprodutos como etanol, ácido acético e CO<sub>2</sub>, fermentando um mol de glicose para um mol do ácido láctico, um mol de etanol e um mol de CO<sub>2</sub>; um mol de ATP é gerado por mol de glicose, diminuindo, assim, a quantidade de glicose metabolizada (REDDY et al., 2008). A esse grupo pertencem os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, e alguns *Lactobacillus* (*brevis*) (CUI; LI; WAN, 2011; MACIEL FILHO, 2012; MOON; WEE; CHOI, 2012).

Portanto, a identificação das bactérias do ácido láctico é um fator importante no desenvolvimento de processos econômicos para a produção do ácido láctico (MOON; WEE; CHOI, 2012). No entanto, a capacidade de uma bactéria de fermentar carboidratos específicos tem sido aproveitada para

aumentar a eficiência de conversão de substratos com o emprego de mistura de culturas (CUI; LI; WAN, 2011).



A:lactato desidrogenase; B: etanol desidrogenase

Figura 10. Principais caminhos de fermentação da glicose pela bactéria do ácido láctico. a) Via homofermentativa, b) Via heterofermentativa (Reddy et al., 2008).

## 2.4 Processo disponível

Além do conhecimento do comportamento da bactéria na fermentação, suas condições de trabalho, e nutrientes é importante saber que tipo de fermentação (batelada, batelada-alimentada ou contínua) pode ser realizada para obter alta produtividade e concentração elevada do ácido láctico (MOON; WEE; CHOI, 2012).

Na fermentação batelada, a biomassa e o meio de cultura são colocados no biorreator onde a fermentação é realizada com controle de pH, por adição de uma base, controle de temperatura e agitação constante até obter a produção máxima do ácido láctico (Figura 11). Ainda que este processo tenha limitações pelo dano sofrido pela bactéria devido ao acúmulo do ácido, na forma não dissociada, no

meio da fermentação (SERNA COCK; RODRIGUEZ DE STOUVENEL, 2007), uma série de fermentações têm sido feitas mediante este processo, especialmente em laboratório (QIN et al., 2010; WANG et al., 2011).

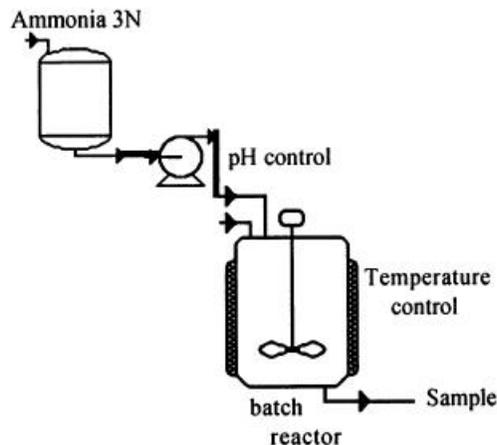


Figura 11. Biorreator batelada (PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999).

Lunelli (2010) reportou aumento na conversão de açúcar quando é trocado de processo batelada para batelada-alimentada. Resultado que pode ser explicado como um estresse osmótico nas células bacterianas por altas concentrações de açúcar no meio, portanto, uma alimentação sequencial em tempos adequados pode aumentar a conversão de substrato.

A fermentação batelada alimentada tem como base o processo batelada com a diferença que nele pulsos de substrato são feitos no transcurso da fermentação dependendo de como o ácido láctico é produzido.

Por outro lado, na fermentação contínua a preparação do meio de cultura e a retirada do ácido láctico fazem parte do processo. Portanto, tem-se um processo mais complexo (Figura 12).

Geralmente, a concentração e a produtividade do produto final estão intimamente relacionadas com a economia do processo de fermentação convencional; uma maior concentração pode ser encontrada em processos descontínuos ou em batelada-alimentada enquanto uma produtividade mais elevada pode ser conseguida em processo contínuo (MOON; WEE; CHOI, 2012).

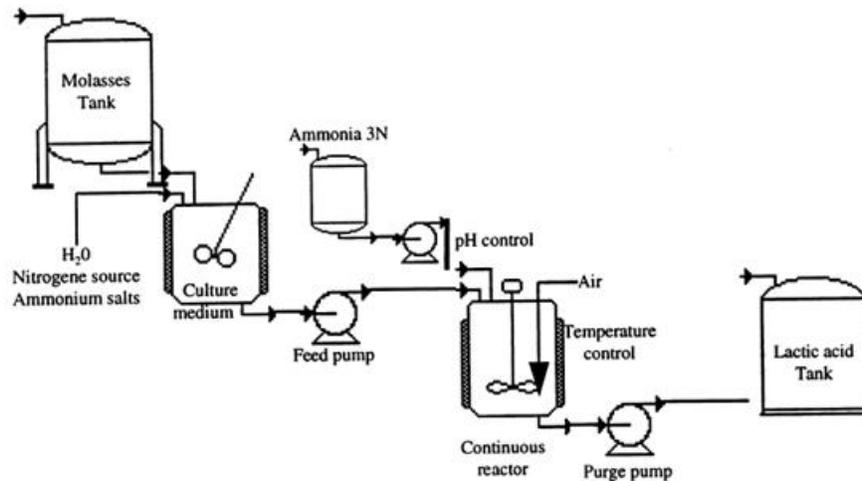


Figura 12. Biorreator contínuo (PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999).

Serna Cock e Roodriguez de Stouvenel (2007) reportam que, na maioria das vezes, a fermentação contínua dá maiores concentrações e maiores rendimentos em comparação à fermentação em batelada. Além disso, este processo pode ser melhorado 1,6 vezes com a reciclagem das células (WEE; RYU, 2009).

## 2.5 Aplicações do ácido láctico

Algumas razões pelas quais o ácido láctico é considerado o ácido carboxílico de maior aplicação é por sua versatilidade, rentabilidade e produção a partir de fontes renováveis. Há tempo, se sabe que o ácido láctico é usado na culinária para preservar os alimentos (LIU; HAN; ZHOU, 2011). A indústria de alimentos tem uma demanda, aproximadamente, de 85% e na indústria não alimentícia de 15%. É usado como acidulante, buffer, aromatizante ou inibidor de deterioração bacteriana em uma grande variedade de alimentos processados como doces, pães e produtos de panificação, refrigerantes, sopas, sorvetes, produtos lácteos, cerveja, maionese e ovos na indústria alimentaria, onde mais de 50% do ácido láctico produzido é utilizado como agente emulsionante na padaria. A sua capacidade de reter água lhe dá uso como hidratante em cosméticos e umectante em formulações farmacêuticas, principalmente em pomadas e loções

(JOHN et al., 2009). Além disso, é utilizado nas indústrias farmacêutica, têxtil, couro e produtos químicos industriais (JAWAD et al., 2012; JOHN et al., 2009; LU et al., 2010; MOON; WEE; CHOI, 2012; REDDY et al., 2008).

Por outro lado, o ácido láctico é atualmente de interesse devido ao seu uso potencial como matéria-prima, principalmente, na síntese de polímero plástico biodegradável como poliácido láctico (PLA) e poli(L-ácido láctico) (PLA) usados na área médica. Deste modo, o PLA pode ser usado como suturas e dispositivos de liberação controlada de drogas, e o PLLA usado principalmente em ortopedia (LASPRILLA et al., 2012). Ao mesmo tempo, o ácido láctico é considerado um produto químico viável, por ser facilmente convertido para uma gama de produtos químicos industriais importantes como óxido de propileno; propileno glicol; 2,3-pentanodiona; ésteres de lactato e ácido acrílico (MOON; WEE; CHOI, 2012). Na presente pesquisa o ácido láctico foi usado como um produto intermediário na síntese do ácido acrílico partindo da fermentação dos açúcares redutores (sacarose, glicose e frutose) do melão de cana-de-açúcar.

## **2.6 Produção global do ácido láctico**

Devido à alta demanda do ácido láctico no mercado sua produção tem incrementado rapidamente a cada ano, estimulando uma produção global em 2000, de 50.000 toneladas por ano (BURGOS-RUBIO; OKOS; WANKAT, 2000) e em 2007, de 60.000 toneladas por ano (ADSUL et al., 2007). Em 2009, de 130.000-150.000 toneladas por ano (WEE; RYU, 2009). Em 2011, estimou-se que sua produção aumentasse para 200.000 toneladas por ano principalmente pelo crescimento no mercado para produção de poliácido láctico (PLA) (KARP et al., 2011). Em 2012, sua capacidade de produção global foi estimada em 150.000 toneladas por ano, e se espera que continue aumentado como resultado da rápida expansão dos derivados do ácido láctico no mercado (MOON; WEE; CHOI, 2012).

## 2.3 ÁCIDO ACRÍLICO

O ácido acrílico ou ácido 2-propanóico ( $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ) é um produto químico industrial de valor considerável e com enorme demanda no mercado. A produção anual de monômero e os seus derivados de éster têm alcançado 4,2 milhões de toneladas, sendo classificado na posição 25 na lista de produtos químicos orgânicos (XU; ZHU; CHEN, 2011). Em 1847, o ácido acrílico foi preparado pela primeira vez, por oxidação de acroleína; posteriormente muitas outras rotas foram reveladas, sendo a oxidação catalítica de propeno a mais usada industrialmente (BAUER, 2003). Junto com seus ésteres, são conhecidos como acrilatos, que normalmente são líquidos incolores, inflamáveis, voláteis, levemente tóxicos. Na indústria é produzido sinteticamente por oxidação do propeno, derivado do petróleo, e se adiciona hidroquinona ou seus ésteres para inibir a polimerização do mesmo (OHARA et al., 2011). No entanto, nesta pesquisa o ácido acrílico foi obtido diretamente da desidratação catalítica do ácido láctico obtido inicialmente por fermentação dos açúcares redutores (sacarose, glicose e frutose) do melaço de cana-de-açúcar.

### 2.3.1 Propriedades físico-químicas do ácido acrílico

O ácido acrílico é um líquido incolor; forma agulhas cristalinas, em estado sólido; é altamente solúvel em água, álcool, ésteres, e muitos outros solventes orgânicos (OHARA et al., 2011). Suas propriedades físicas mais relevantes são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Propriedades físicas do ácido acrílico (OHARA et al., 2011).

Propriedade	Valor
Fórmula molecular	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$
Massa molar	72,06 g/mol
Ponto de fusão	13,5 °C
Ponto de ebulição	141 °C
Índice de refração	$n_D^{20}$ 1,4224, $n_D^{25}$ 1,4185
Viscosidade a 25 °C	1.149 mPa.s
Constante de dissociação, $K_a$ a 25°C	$5,5 \times 10^{-5}$ ; pKa = 4,26
Calor de combustão	1376 Kg/mol

Devido à sua estrutura química (Figura 13), sofre reações características de compostos insaturados e ácidos carboxílicos; sua elevada reatividade se deve aos dois centros insaturados conjugados. O átomo de carbono  $\beta$  polariza o grupo carbonila, comportando-se como um eletrófila, favorecendo a adição de uma variedade de nucleófilas, e por sua vez, ativa o hidrogênio do grupo vinil. Além disso, a ligação dupla C=C sofre reações de adição iniciadas por radicais como as reações de Diels-Alder e de polimerização. A função carboxila é sujeita às reações de deslocamento típicas de ácidos alifáticos e ésteres, tais como esterificação e transesterificação (OHARA et al., 2011).

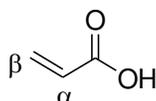


Figura 13. Ácido acrílico. Átomos de carbono  $\alpha$  e  $\beta$  insaturados.

### 2.3.2 Obtenção do ácido acrílico

Embora na maioria dos trabalhos se apresente a obtenção do ácido acrílico por meio de duas vias (Química ou sintética e fermentativa), no presente trabalho se divide a produção do ácido acrílico em três partes: Via sintética, fermentativa e semissintética. Na via sintética se trata a produção do ácido acrílico a partir de derivados do petróleo, especialmente de propeno; a via fermentativa compreende a produção do ácido acrílico diretamente, a partir de fontes renováveis; e a via semissintética envolve a produção do ácido acrílico via sintética a partir do ácido láctico obtido de fontes renováveis, ainda que em estudos prévios seja usado ácido láctico comercial ou seu éster. No entanto, Para o desenvolvimento do presente trabalho foi empregada.

Este importante ácido orgânico é usado para produzir polímeros, têxteis e uma variedade de produtos industriais e de consumo (LEE et al., 2010).

### 2.3.2.1 Via sintética

A via sintética para produção do ácido acrílico vem sendo bastante desenvolvida, sendo conhecidos vários processos, ainda que alguns deles não sejam atualmente utilizados. Portanto, são conhecidos os processos descritos abaixo.

#### a. Processo baseado em acetileno

Consiste no uso de acetileno como matéria-prima principal, que reage à pressão atmosférica e 40 °C na presença do ácido clorídrico e de carbonila de níquel (Figura 14); sendo R igual a um grupo hidrogênio, alquila ou arila. Esse processo foi descoberto por W. REPPE em 1939 e usado por Röhm & Haas e Toa Gosei Chemical, que o modificaram para o processo não estereoseletivo de Reppe; posteriormente esses dois métodos foram abandonados pela elevada toxicidade e natureza corrosiva da carbonila de níquel (OHARA et al., 2011).

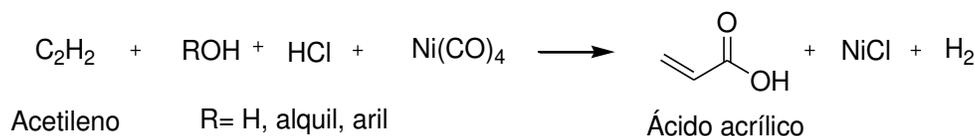


Figura 14. Produção sintética do ácido acrílico via acetileno (OHARA et al., 2011).

#### b. Processo Reppe de alta pressão

Processo empregado pela empresa BASF e Badische Corp. Consiste na reação de acetileno, monóxido de carbono e água em presença de brometo de níquel-brometo de cobre (III) a aproximadamente 14 MPa e 200 °C (Figura 15). No entanto, os problemas de segurança e de poluição no controle da carbonila de níquel (formado no processo) e o custo elevado de acetileno apresentam-se como desvantagens. Portanto, foi substituído pela oxidação direta de propeno; embora, a BASF ainda produz parte do seu ácido acrílico por este processo (OHARA et al., 2011).

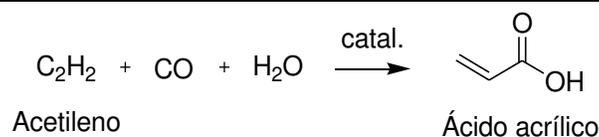


Figura 15. Produção sintética do ácido acrílico via reação Reeppe de alta pressão (OHARA et al., 2011).

*c. Hidrólise de acrilonitrila*

A hidrólise ácida da acrilonitrila em elevadas temperaturas (200-300°C) produz ácido acrílico, tendo como intermediário a acrilamida (Figura 16) (BELLO, 2008). Este método foi economicamente pouco atraente devido ao baixo rendimento baseado no propeno e as grandes quantidades de resíduos de  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ . Foi abandonado pelas empresas Uginde Kuhlmann, Mitsubishi Petrochemical, e Mitsubishi Rayon. No entanto, ainda é operado por Asahi Chemical (OHARA et al., 2011).



Figura 16. Produção sintética do ácido acrílico via hidrólise de acrilonitrila (OHARA et al., 2011).

*d. Processo a partir do ceteno*

Trata da produção do ácido acrílico a partir da condensação de ceteno (produzido a partir da pirólise do ácido acético) e formaldeído para produzir  $\beta$ -propilactona, e posterior na geração do ácido acrílico com ácido fosfórico (Figura 17). O processo parou de ser usado por Celanese e B. F. Goodrich, depois da descoberta das propriedades cancerígenas da propilactona (BELLO, 2008; OHARA et al., 2011).

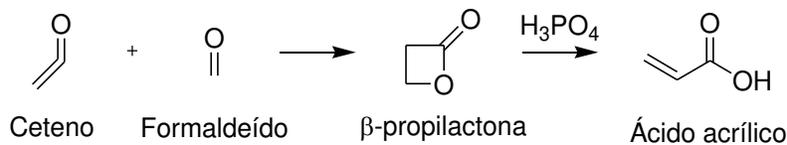


Figura 17. Produção sintética do ácido acrílico via ceteno (OHARA et al., 2011).

e. Processo baseado no etileno cianohidrina

Processo baseado na desidratação e hidrólise, com ácido sulfúrico, de eteno cianohidrina; obtido pela adição de óxido de eteno e cianeto de hidrogênio (Figura 18) (BELLO, 2008). Este processo foi utilizado pela Union Carbide e pela Röhm & Haas, mas foi abandonado por ter que trabalhar com HCN e por gerar resíduos de  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$  (OHARA et al., 2011).

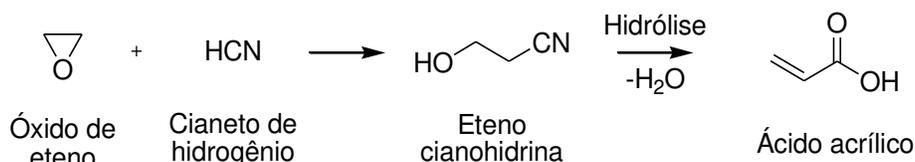


Figura 18. Produção sintética do ácido acrílico via eteno cianohidrina (BELLO, 2008).

f. Oxidação de propeno

Este processo envolve a oxidação catalítica de propeno em fase vapor; com ar e vapor da água para produzir ácido acrílico. Geralmente o produto que sai do reator é absorvido em água, extraído com um solvente apropriado e destilado para obter ácido acrílico glacial. Atualmente, o ácido acrílico comercial é produzido por este método; que por sua vez pode ser realizado em único estágio ou em dois estágios (OHARA et al., 2011). O processo é usado pelas companhias BASF, Nippon Shokubai, Mitsubishi, Dow (Celanese), Sumitomo e LG Chemical (BELLO, 2008).

- Processo em único estágio

No processo em único estágio, a reação se faz em um único reator, no qual, uma reação exotérmica é realizada. Nele, o propeno é oxidado para acroleína na presença de oxigênio e um catalisador heterogêneo; dessa maneira, a acroleína é oxidada nas mesmas condições para ácido acrílico (Figura 19) (LEE et al., 2010).

Como desvantagens, o processo apresenta rendimentos relativamente baixos, de 60% a 70%, e o catalisador (Tabela 10) usado possui um curto período

de vida útil devido à sublimação do óxido de telúrio, um promotor da reação, na temperatura de operação (BELLO, 2008).

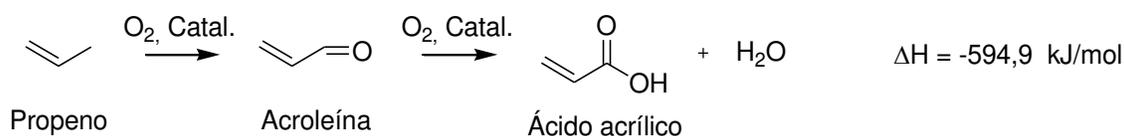


Figura 19. Produção sintética do ácido acrílico via oxidação de propeno em único estágio (BELLO, 2008).

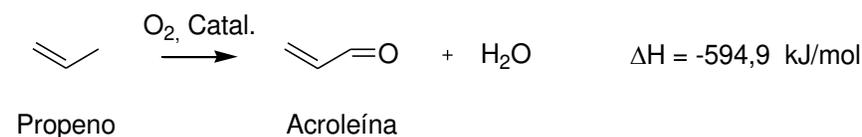
Tabela 10. Catalisadores para a oxidação do Propeno em estágio único usados por Nippon Shokubai (BELLO, 2008).

Catalisador	Rendimento (%)	Temperatura (°C)
Mo-W-Te-Sn-Co-O	65	350
Nb-W-Co-Ni-Bi-Fe-Mn-Si-Z-O	73	325

- *Processo em dois estágios*

Como o próprio nome já diz, este processo está dividido em duas etapas ou estágios (Figura 20), permitindo a otimização do processo e elevados rendimentos.

Estágio 1:



Estágio 2:

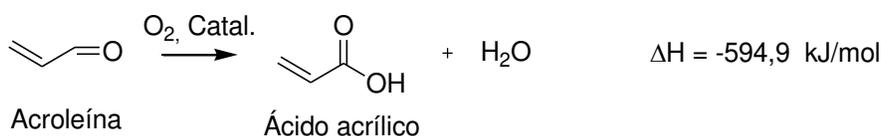


Figura 20. Produção sintética do ácido acrílico via oxidação de propeno em dois estágios (BELLO, 2008).

Seu princípio é o mesmo do processo com único estágio, sendo produção do ácido acrílico a partir da oxidação do propeno. Porém, neste processo, o propeno é oxidado parcialmente para acroleína em um estágio em condições de temperatura e catalisador características da oxidação (Tabela 11). Logo, no

segundo estágio a acroleína é oxidada para ácido acrílico em outras condições da reação (Tabela 12) (BELLO, 2008).

Tabela 11. Catalisadores do primeiro estágio (BELLO, 2008).

Catalisador	Rendimento (%)		Temperatura (°C)
	Acroleína	Ácido acrílico	
Mo <sub>12</sub> Bi <sub>1</sub> Co <sub>4</sub> Ni <sub>4,5</sub> Si <sub>6,3</sub> Mg <sub>0,2</sub>	75,8	16,2	350
Mo <sub>12</sub> Bi <sub>1</sub> Fe <sub>2</sub> Co <sub>3</sub> Ni <sub>1</sub> P <sub>2</sub> K <sub>0,2</sub>	88,0	3,0	305
Mo <sub>12</sub> Bi <sub>1</sub> Fe <sub>1</sub> W <sub>2</sub> Co <sub>4</sub> Si <sub>1,35</sub> K <sub>0,06</sub>	90,2	6,0	325

Tabela 12. Catalisadores do segundo estágio (BELLO, 2008).

Catalisador	Conversão (%)	Rendimento (%)	Temperatura (°C)
Mo <sub>12</sub> V <sub>4,6</sub> Cu <sub>2,2</sub> W <sub>2,4</sub> Cr <sub>0,6</sub>	100,0	98,0	220
Mo <sub>12</sub> V <sub>3</sub> W <sub>1,2</sub> Ce <sub>3</sub>	100,0	96,1	288
Mo <sub>12</sub> V <sub>2</sub> W <sub>2</sub> Fe <sub>3</sub>	99,0	91,0	230

### 2.3.2.2 Via fermentativa

O ácido acrílico é encontrado em uma grande variedade de bactérias e algas, mas seu papel biológico é incerto nesses micro-organismos, e os detalhes da biossíntese do ácido acrílico nesses organismos ainda não é completamente conhecida (XU; ZHU; CHEN, 2011).

No intento de explicar o porquê a produção do ácido acrílico a partir de fontes renováveis não é viável, Straathof *et al.* (2005) propõem uma série de possíveis rotas metabólicas para produção do ácido acrílico a partir de açúcar como fonte de carbono. Na Figura 21 são apresentadas as rotas que conduzem à fermentação do açúcar para produzir, essencialmente, piruvato como intermediário fundamental na produção de diversos sub-intermediários; sendo a via do lactato a rota mais provável para a produção do acrilato. No entanto, a concentração de acrilato nunca é maior de 1% da concentração inicial do substrato.

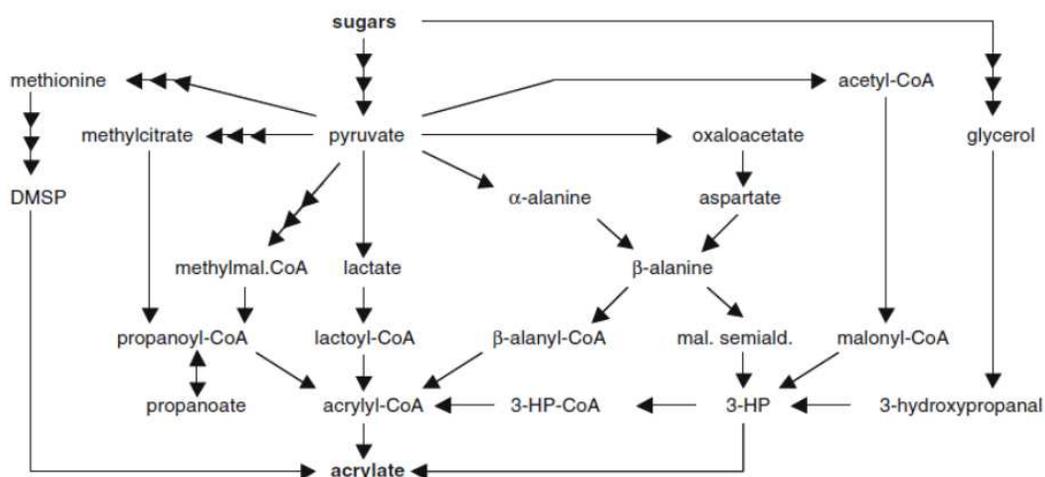


Figura 21. Rotas metabólicas hipotéticas para a biossíntese de acrilato a partir de açúcares (STRAATHOF et al., 2005).

Análise baseada em três hipóteses, principalmente: na formação do acrylil-CoA como intermediário na fermentação do lactato não é viável, já que dois terços do lactato são reduzidos para propanoato e um terço é oxidado para acetato e CO<sub>2</sub>; quando o 3-HP sintetiza *3-HP-CoA*, este é desidratado para acrylil-CoA e posteriormente reduzido para propanoil-CoA; além disso, o acrilato produzido é tóxico para a maioria dos micro-organismos. Portanto, à medida que o acrilato é obtido, o micro-organismo morre (STRAATHOF et al., 2005).

Uma tentativa para produzir ácido acrílico via fermentação anaeróbica a partir do ácido láctico como intermediário foi descrita por Gao, Ma e Xu (2011), como mostra a Figura 22.

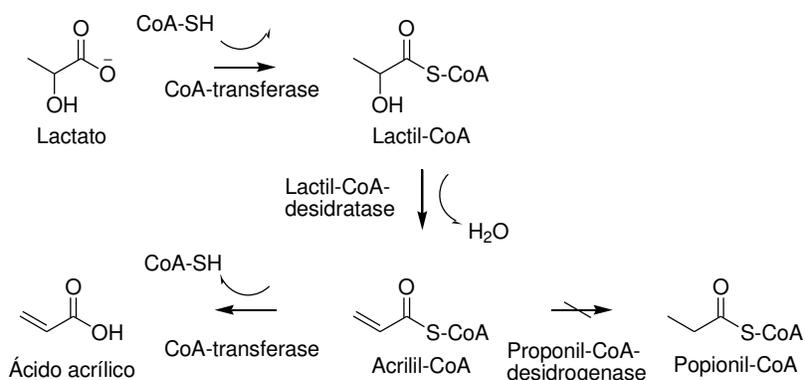


Figura 22. Produção de ácido acrílico via fermentação do ácido láctico (GAO; MA; XU, 2011).

Nesta rota, o lactil-CoA é primeiramente gerado pela enzima CoA-transferase e posteriormente desidratação para acrilil-CoA pela enzima lactil-CoA-desidratase, quando a bactéria *Clostridium propionicum* é empregada. Portanto, quando *Clostridium propionicum* é usada, o acrilil-CoA é normalmente catalisado para propionil-CoA pela enzima propionil-CoA desidrogenase bloqueando a produção do ácido acrílico. Não obstante, o ácido 3-butínico pode inibir atividade da propionil-coA desidrogenase. No entanto, a concentração de ácido acrílico nunca excede 1% das concentrações dos substratos.

### 2.3.2.3 Via semissintética

Considerando-se os preços do ácido láctico 1300 – 1600 US\$/ tonelada (NNFCC, 2011) e de ácido acrílico em torno de 2369 – 3557 US\$/ tonelada (SUNSIRS, 2011), a tendência no aumento do preço do barril de petróleo, o desenvolvimento que tomaram os processos biotecnológicos baseados na biomassa vegetal como fonte de carbono, a incapacidade de obter ácido acrílico diretamente por fermentação, o desenvolvimento do ácido láctico nos processos fermentativos, sua similitude estrutural com o ácido acrílico, as possíveis reações nas que participa para gerar diversos compostos químicos (Figura 23) (ZHANG; LIN; CEN, 2008) e a importância do acrilato e seus ésteres na indústria (ZHANG et al., 2008), têm marcado a via semissintética para a produção de ácido acrílico como uma rota economicamente promissora.

Na Figura 23, apresenta-se um caminho global para produção de ácido acrílico por via semissintética a partir de glicose como fonte de carbono na fermentação do ácido láctico.

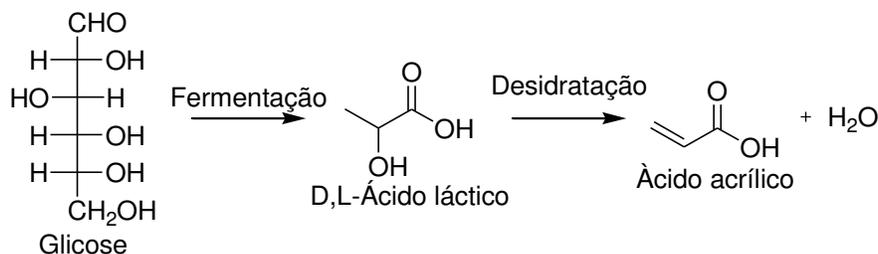


Figura 23. Obtenção de ácido acrílico via semissintética (LUNELLI, 2010; ZHANG; LIN; CEN, 2008).

Como se apresentou anteriormente, as rotas de obtenção de ácido láctico via fermentativa são bem conhecidas, portanto, o objetivo da síntese do ácido acrílico por via semissintética se centra no desenvolvimento de métodos adequados para a desidratação do ácido láctico obtido por fermentação, para obter ácido acrílico com alto rendimento e baixo custo, embora os estudos preliminares para o desenvolvimento do método sejam explorados com ácido láctico comercial. Portanto, Na presente pesquisa se usaram catalisadores baseados em zeolita básicas (NaY) como agentes desidratantes na síntese de ácido acrílico a partir do ácido láctico comercial e ácido láctico obtido no laboratório via fermentativa.

Em 1958, Holmen e colaboradores publicaram, em um livro de patentes, a conversão do ácido láctico para ácido acrílico com catalisadores de fosfatos e sulfatos alcançando uma seletividade de 68% a 400°C (WANG et al., 2008). Logo, uma série de catalisadores baseados em sulfatos e fosfatos tem sido testada; mas ninguém conseguiu superar esses resultados. No entanto, na desidratação do ácido láctico para ácido acrílico não é possível obter rendimentos altos devido a reações paralelas como descarboxilação e descarbonilação que competem com a desidratação e diminuem a seletividade para o ácido acrílico (FAN; ZHOU; ZHU, 2009).

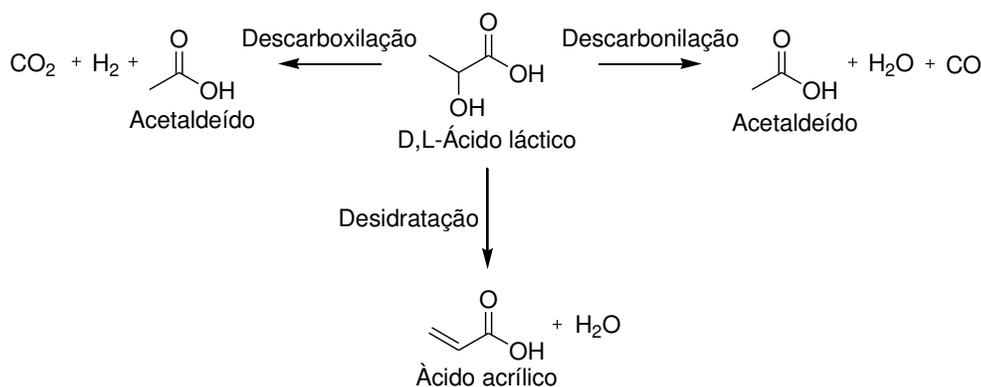


Figura 24. Principais reações do ácido láctico (FAN; ZHOU; ZHU, 2009).

A fim de melhorar a conversão para ácido acrílico, é aconselhável proteger o grupo de carboxila mediante a esterificação do ácido láctico com um álcool como

metanol ou etanol, desidratação do éster e posterior desesterificação para ácido acrílico (Figura 25) (LUNELLI et al., 2007).

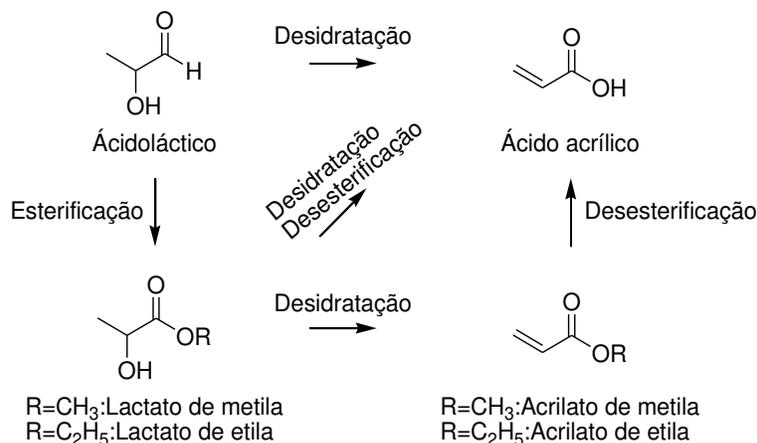


Figura 25. Possíveis rotas de obtenção do ácido acrílico a partir de ácido láctico por desidratação catalítica (LEE et al., 2010; LUNELLI et al., 2007; ZHANG; LIN; CEN, 2008; ZHANG et al., 2008, 2009).

Desse ponto de vista, Lunelli (2010) reporta a esterificação de lactato de sódio obtido na fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Lactobacillus plantarum* por destilação reativa, usando resina de troca catiônica, Amberlyst 15, para acidificar o lactato e posterior esterificação do ácido láctico com metanol em presença do ácido sulfúrico.

Outros autores descrevem a desidratação/desesterificação de lactato de metila comercial com uso de catalisadores como NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ZHANG et al., 2009), CaSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ZHANG; LIN; CEN, 2008; ZHANG et al., 2008) e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> (LEE et al., 2010), obtendo ácido acrílico e acrilato de metila como produtos principais, geralmente (Tabela 13). As possíveis rotas envolvidas nestas reações são apresentadas na Figura 25.

Nos últimos anos, uma série de catalisadores baseados em zeólitas NaY tem sido reportada na desidratação do ácido láctico e seus ésteres (GAO; MA; XU, 2011). As zeólitas são alumino-silicatos cristalinos com elementos dos grupos I e II, particularmente Na, K, Mg, Ca, Sr e Ba. Sua fórmula empírica é descrita como:

$$M_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot ySiO_2 \cdot wH_2O \quad (1)$$

Onde M é o íon trocável, n é o estado de oxidação, y é igual a 2 ou mais e w é o conteúdo de água nos canais da zeólita. A unidade básica da estrutura são os tetraedros de  $[\text{SiO}_4]^{4-}$  e  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  que se ligam entre si compartilhando seus átomos (Figura 26). A substituição de átomos de Si (IV) por Al (III) é responsável pela carga negativa da estrutura conferindo-lhe a propriedade especial de trocar cátions e absorver moléculas nos canais vazios resultantes da rede tridimensional na formação de tetraedros (OVIEDO, 2010). A liberação de água desses canais, a temperatura próxima de 550°C, não afeta a sua estrutura (YAN et al., 2011). Desse modo, os canais vazios podem ser preenchidos novamente por água ou outras moléculas, o que permite que ocorra a troca de cátions durante a passagem de soluções aquosas pelos canais; ou seja, permitindo a troca de íons da solução por íons da estrutura. O uso de zeólitas é bem conhecido na indústria do petróleo, onde são usadas como catalisadores em diversas reações (YAN et al., 2010).

Tabela 13. Produção de ácido acrílico e acrilato de metila por desidratação de lactato de metila.

Catalisador	Temperatura (°C)	Gás de arraste	% Conversão	%Seletividade		Ref.
				Acrilato	Acetaldeído	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340	-	78,9	Ácido: 30,8 Ester: 9,0	12,3	
	380	-	99,5	Ácido: 24,6 Ester: 27,4	15,2	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	340	-	45,5	Ácido: 7,6 Ester: 3,4	9,8	(ZHANG et al., 2009)
	380	-	88,6	Ácido: 6,7 Ester: 8,9	14,5	
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	340	-	92,2	Ácido: 1,9 Ester: 7,8	7,3	
	380	-	99,4	Ácido: 1,7 Ester: 17,2	9,3	
CaSO <sub>4</sub> CuSO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400	Sem N <sub>2</sub>	75,4 63,0	Ácido: 48,8 Ácido: 51,0	23,8 25,8	(ZHANG et al., 2008)
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> /SiO <sub>2</sub>	370	N <sub>2</sub>	73,6	Ácido: 70,5	20,7	(LEE et al., 2010)
CaSO <sub>4</sub> CuSO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	330	CO <sub>2</sub>	-	Ácido: 63,4	19,6	(ZHANG; LIN; CEN, 2008)

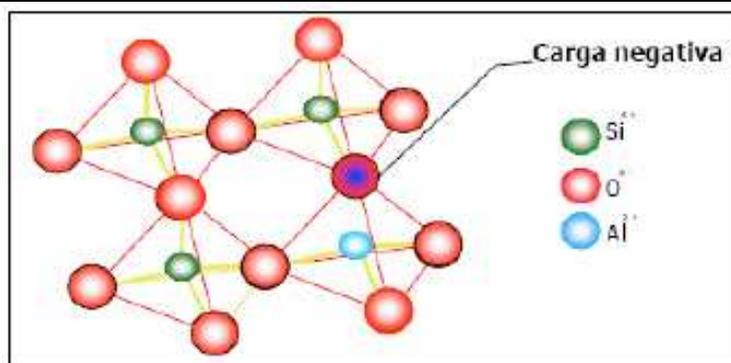


Figura 26. Balanço de cargas na estrutura tetraédrica da zeólita (OVIEDO, 2010).

Recentemente, o grupo de Huang desenvolveu uma série de catalisadores baseados em modificações de zeólita NaY com potássio ou terras raras (lântano, cério, samário e európio) para obtenção de ácido acrílico por desidratação direta do ácido láctico (Tabela 14) (GAO; MA; XU, 2011).

Sun *et al.* (2010) usaram uma gama de zeólitas modificadas por sais de potássio na desidratação do ácido láctico para ácido acrílico (Tabela 14), encontrando melhores resultados com o catalisador KI/NaY. 97,6% de conversão do ácido láctico e 67,9% de seletividade para o ácido acrílico. Além do ácido acrílico, identificaram acetaldéido, ácido propanóico, 2,3-pentadiona, coque e outros compostos como subprodutos da reação.

Yan *et al.* (2010) estudaram a desidratação do ácido láctico com zeólitas modificadas por lântano, bário e combinações das mesmas (Tabela 14), encontrando em todas as reações conversão de 100% e seletividade para o ácido láctico entre 21,6% e 41,6%, tendo o melhor resultado com o catalisador Ba-D-La/NaY. Como subprodutos, identificaram principalmente acetaldéido.

Sun *et al.* (2009) estudaram o efeito que tem a quantidade de potássio na zeólita NaY quando é usada na desidratação do ácido láctico (Tabela 14), encontrando uma seletividade máxima de 50,0% e 98,8% com o catalisador 2,8K/NaY.

Tabela 14. Desidratação do ácido láctico para ácido acrílico usando zeólita NaY (Conversão e seletividade).

Matéria-prima	Catalisador	Condições de reação			% Conversão	Seletividade/mol						Ref.
		T	t	Gás de arraste		Ácido acrílico	Acetaldeído	Ácido propanóico	2,3-pentanodiona	Coque	Outros	
Ácido láctico 29% w Catalisador 1,5 g	NaY	598 K 325 °C	2 h	N <sub>2</sub>	96,3	35,9	20,2	-	8,0	29,4	6,5	(SUN et al., 2010)
	KF/NaY				91,2	39,9	17,1	-	-	19,3	23,7	
	KCl/NaY				97,1	53,8	10,0	3,9	10,4	17,4	4,5	
	KBr/NaY				97,1	59,9	9,2	-	8,1	15,7	7,1	
	KI/NaY				97,6	67,9	-	-	7,9	13,0	11,2	
	KNO <sub>3</sub> /NaY				98,0	58,2	6,8	2,6	10,0	17,8	4,6	
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /NaY				94,8	51,6	20,2	-	-	18,1	10,1	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaY				94,5	49,7	6,0	-	6,5	20,9	16,9	
	K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /NaY				94,4	48,5	14,8	-	6,5	14,8	15,4	
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaY				95,1	46,7	14,7	-	4,9	13,8	19,9	
KOH/NaY	96,3	44,2	-	-	-	13,8	42,0					
Ácido láctico 38% w Catalisador 1.5 g (30–50 mesh)	NaY	235°C	-	N <sub>2</sub>	100	21,6	23,1	1,4	0	-	53,9	(YAN et al., 2010)
	La-Ba/NaY				100	28,4	27,2	0,0	0,0	44,4		
	La-C-Ba/NaY				100	41,5	25,9	0,0	4,7	28,0		
	La-D-Ba/NaY				100	41,1	35,9	0,0	5,0	18,0		
	Ba-C-La/NaY				100	39,4	27,2	0,0	3,7	29,8		
Ba-D-La/NaY	100	41,6	35,5	0,0	4,6	18,3						
Ácido láctico 29% w Catalisador 1.5 g	NaY	598 K 325 °C	TOS: 360 min	N <sub>2</sub>	96,1	14,8	10,8	-	-	-	-	(SUN et al., 2009)
	0,35K/NaY				95,6	20,6	10,2	-	3,5	-		
	0,7K/NaY				96,4	31,2	8,3	2,1	4,8	-		
	1,4K/NaY				97,5	39,8	6,6	4,1	9,4	-		
	2,1K/NaY				98,2	40,2	4,7	4,0	10,1	-		
	2,8K/NaY				98,8	50,0	2,8	3,8	10,0	-		
3,5K/NaY	98,8	41,3	1,4	3,5	140,6	-						
Ácido láctico 38% w Catalisador 1.5 g (30–50 mesh)	NaY	623 K	-	N <sub>2</sub>	100	34,8	16,1	1,6	-	-	47,5	(WANG et al., 2008)
	0,5%La/NaY				100	45,3	10,4	2,1	-	42,2		
	1%La/NaY				100	43,8	6,8	1,7	-	47,7		
	2%La/NaY				100	56,3	12,3	1,6	-	29,8		
	3%La/NaY				100	50,2	11,9	2,3	-	35,6		
	4%La/NaY				100	44,9	18,5	3,4	-	33,2		
	NaY				100	34,8	16,1	1,6	-	47,5		
	2%La/NaY				100	56,3	12,3	1,6	-	29,8		
	2%Ce/NaY				100	45,8	9,5	2,0	-	42,7		
	2%Sm/NaY				100	36,0	12,8	2,0	-	49,2		
2%Eu/NaY	100	40,2	16,1	3,3	-	40,4						

Por outro lado, Wang *et al.* (2008) usaram zeólitas modificadas com lântano, cério, samário e európio na desidratação do ácido láctico. Reportaram melhores resultados quando a zeólita NaY modificada com lântano foi empregada. Reportaram 100% de conversão para todos os experimentos e um máximo de 56,3% de seletividade para o ácido láctico.

Os catalisadores baseados em zeólita NaY além de desidratar ácido láctico podem desidratar ésteres do presente ácido, ampliando seu uso e importância na produção de acrilatos.

Com o uso de zeólitas NaY e KNaY, Shi *et al.* (2007) conseguiram desidratar lactato de metila para acrilato de metila com porcentagem de conversão do lactato de 88,6 e 83,0, seletividade do acrilato de 32,1 e 45,7, e rendimentos de 28,4 e 37,9, respectivamente.

Por outro lado, durante a desidratação do ácido láctico para ácido acrílico em reatores tubulares é usado gás de arraste como N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>, que funcionam como diluentes da matéria-prima e facilitam o transporte dos produtos no reator, inibindo, assim, a formação de coque. No entanto, maiores rendimentos têm sido encontrados com uso de CO<sub>2</sub> como gás de arraste, efeito que pode ser devido a seu papel especial no processo de desidratação. No processo, as reações de descarbonilação e descarboxilação competem com a desidratação, e conseqüentemente, acetaldeído e CO<sub>2</sub> são formados como subprodutos. Por tanto, quando o CO<sub>2</sub> é usado como gás de arraste, um excesso de CO<sub>2</sub> inibe a reação de descarbonilação/descarboxilação melhorando a seletividade da desidratação (ZHANG *et al.*, 2009).

Baseados nos mecanismos de reação para a desidratação do ácido láctico, Sun *et al.* (2010) propuseram que o mecanismo da desidratação com estes tipos de catalisadores começa com a formação do estado de transição gerado entre a molécula de ácido láctico, átomos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, e os sítios ácidos e básicos do catalisador, átomos O<sub>2</sub> e K<sup>+</sup>, seguido da perda dos grupos β-próton e o α-hidroxila mediante o mecanismo de eliminação E2 gerando uma molécula de ácido acrílico

com posterior geração de uma molécula da água que é eliminada do catalisador (Figura 27).

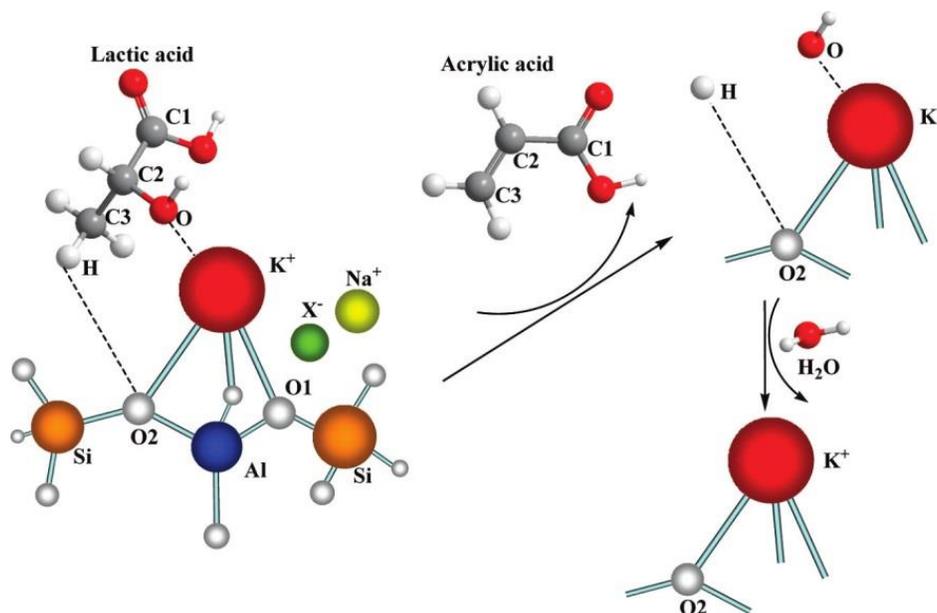


Figura 27. Mecanismo proposto na desidratação do ácido láctico para ácido acrílico, sobre zeólita NaY modificadas por KX (SUN et al., 2010).

### 2.3.3 Usos do ácido acrílico

Geralmente, o ácido acrílico é consumido na forma de polímero. Sua demanda cresce na fabricação de dobras-superadsorventes para uso em fraldas e produtos de higiene, no qual são usados 80%-85% da sua produção. Seus polímeros e sais (incluindo polímeros superabsorventes, detergentes, tratamento de água e dispersantes) são responsáveis por 34% do consumo total; como acrilato de n-butila 32%, acrilato de etila 18%, acrilato de 2-etil-hexila 6%, acrilato de metila 7% e outros 3% (BAUER, 2003).



---

# CAPÍTULO 3

## METODOLOGIA

---

Os experimentos para a produção de ácido láctico e ácido acrílico foram desenvolvidos no Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado, LOPCA/FEQ/UNICMAP. Laboratório que dispõe de uma excelente infraestrutura, equipamentos de última geração e pessoal com excelente capacitação. Na continuação se descrevem as metodologias empregadas no presente trabalho.

### 3.1 PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

Levando em conta a importância do melaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para processos fermentativos e sua abundância na indústria açucareira (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, [s.d.]; MELAÇOS BRASILEIROS, [s.d.]), decidiu-se usar esse subproduto da cana-de-açúcar como matéria-prima na produção de ácido láctico via fermentativa. Posteriormente, foram escolhidas a fonte de nitrogênio, as bactérias do ácido láctico, segundo reportes da literatura (Tabela 7) e as condições de operação (agitação, temperatura e pH), segundo as características de cada bactéria empregada, produzindo assim ácido láctico, *D*, *L* e *DL*. No entanto, para a síntese de ácido acrílico só foi usado o ácido láctico obtido com a bactéria *Lactobacillus plantarum* (*L*-ácido láctico), o qual foi obtido com maior concentração (50,59 g/L). Propondo para estudos posteriores, estudar o efeito da estereoquímica do ácido láctico na desidratação catalítica do mesmo.

Posteriormente, realizou-se um estudo prévio (em *Shaker*), sem controle de pH, para avaliar a produção do ácido láctico segundo o efeito da concentração de sacarose, extrato de levedura e temperatura de trabalho para cada bactéria selecionada. Por último, os melhores parâmetros encontrados para cada bactéria foram reproduzidos em biorreator de 7 L com controle de pH.

#### 3.1.1 Substrato

Para a produção do ácido láctico, foi usado o melaço de cana-de-açúcar, não hidrolisado, obtido da Usina Iracema. Trata-se de uma matéria-prima de baixo

custo, abundante na região de São Paulo e de alto conteúdo de açúcares, especialmente sacarose.

### 3.1.2 Micro-organismos

Levando em conta a produção do ácido láctico, sua estereoquímica (*L*, *D* e *DL*), o substrato (melaço de cana-de-açúcar) e os resultados (rendimento e produtividade do ácido láctico) reportados na literatura nos últimos anos (Tabela 16), foram escolhidas as bactérias *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum* na produção do ácido láctico *L*, *D* e *DL* respectivamente. Bactérias que foram adquiridas da Fundação André Tosello (FAT).

#### 3.1.2.1 *Lactobacillus delbrueckii*

Para a produção de *L*-ácido láctico foi escolhida a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* (Tabela 15). Uma bactéria do ácido láctico homofermentativa que apresenta bons rendimentos na produção de *L*-ácido láctico a partir do caldo e do melaço de cana-de-açúcar com temperatura de trabalho de 42 °C e pH de 4-6 (DUMBREPATIL et al., 2007; KADAM et al., 2006).

Tabela 15. Caracterização da *Lactobacillus delbrueckii*, LAB N. CCT 3744, segundo a FAT (2013).

Nome	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> , (Leichmann) Beijerinck
N. CCT	3744
Cepa tipo	Sim
Histórico	< JCM 1032 < T. Mitsuoka S1-42 < ATCC 9649 < R.P. Tirrsler 730 (strain Calvert) < M. Rogosa; =DSM 20074 =IFO 3202 =NCDO 213 =NCIMB 8130 =ATCC 9649 =CCT 1377 =NRIC 1012
Informações	Type strain [794, 8881]. Murein: A11.31 Assay of alanine [1095] and pyridoxal 50.0 [794] 881 16S rRNA (M58814) [897]
Isolamento	Sour grain mash
Taxonomia	Firmicutes, subdivision A2 (with low GC content of DNA)
Crescimento	MRS; 37 °C
Preservação	FR -80 °C T03/08/D
Depósito	Aberto

Tabela 16. Reportes mais relevantes das bactérias do ácido láctico empregadas no presente trabalho.

Bactéria	Substrato	Fonte de carbono	Fonte de Nitrogênio	T (°C)	pH	Rendimento (g LA/g glicose)	Produtividade [g/(L·h)]	Isômero	Ref.
Lactobacillus delbrueckii NCIM 2365	Cana-de-açúcar hidrolisada	Glicose	Extrato de levedura	42	4-6	0,87	1,6	L	(KADAM et al., 2006)
Lactobacillus delbrueckii Uc-3						0,98	3,2		
	Glicose	Glicose			6,8-5,8	77,8**	-		
	Frutose	Frutose			6,6-5,8	77,3**	-		
Lactobacillus delbrueckii NCIM 2365	Sacarose	Sacarose	Extrato de levedura	41	6,8-5,2	58,9**	-	L	(RAMANJOOLOO et al., 2009)
	Sacarose hidrolisada	Glicose Frutose Sacarose			6,4-5,3	78,4**	-		
	Caldo de cana-de-açúcar	Glicose Frutose Sacarose			-	25*	0,21		
	Caldo de Cana-de-açúcar	Sacarose	Extrato de levedura	30	6,2	41,16*	0,91	D	(COELHO et al., 2011)
	Melaço de Cana-de-açúcar					38,8*	0,85		
	Soro de queijo	Lactose				43,8*	0,80		
Leuconostoc mesenteroides NRRL B512			Extrato de levedura			59,2*	2,3		
	Caldo de Cana-de-açúcar	Sacarose	Levedura autolisada	30	6,2	44,48*	1,61		
			Milhocina			36*	1,25		
			Proteína de algodão			26,4*	1,31		
Lactobacillus plantarum	Melaço de cana-de-açúcar	Sacarose	Extrato de levedura	34	5	0,42	-	DL	(LUNELLI, 2010)
Lactobacillus plantarum As.1.3	Glicose	Glicose	Malte	55	6,8	16*	13,0	DL	(LIU et al., 2010)
			Milhocina			12*	3,20		

\* produção (g/L), \*\* porcentagem molar ((mol ácido láctico/mol de sacarídeo)x100)

### 3.1.2.2 *Leuconostoc mesenteroides*

Para a produção de *D*-ácido láctico foi escolhida a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (Tabela 17). Uma bactéria do ácido láctico heterofermentativa que já foi reportada na produção *D*-ácido láctico a partir do caldo e melaço de cana-de-açúcar em condições de temperatura e pH de 32 °C e 6,0, respectivamente (COELHO et al., 2011).

Tabela 17. Caracterização da LAB N. CCT 4357, segundo a FAT (2013).

Nome	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , (Tsenkovskii) van Tieghem
N. CCT	4357
Cepa tipo	Não
Histórico	< Costa, F.; =NRRL B-512
Isolamento	Sugar cane juice
Taxonomia	Firmicutes, subdivision A2 (with low GC content of DNA)
Crescimento	TJA; 26 °C
Preservação	LY; -80°C T04/02/A
Depósito	Aberto

### 3.1.2.3 *Lactobacillus plantarum*

Conforme as experiências realizadas no laboratório (LOPCA/FEQ/UNICMAP) (LUNELLI, 2010), foi escolhida a bactéria *Lactobacillus Plantarum* (Tabela 18) para a obtenção de (*DL*)-ácido láctico ou racemato. Trata-se de um micro-organismo conhecido como bactéria do ácido láctico heterofermentativa, flexível e versátil, encontrado em uma variedade de nichos ambientais, incluindo alguns laticínios, carnes, vegetais ou de fermentação de plantas (KLEEREBEZEM et al., 2003).

Tabela 18. Caracterização da LAB N. CCT 3751, segundo a FAT (2013).

Nome	<i>Lactobacillus plantarum</i> , (Orla-Jensen) Bergey et al.
N. CCT	3751
Cepa tipo	Sim
Histórico	< JCM 1149 < ATCC 14917 < P. A. Hansen p 39< Roy. Techn. Coll. Copenhagen < S. Orla-Jensen 39 ( <i>Streptobacterium plantarum</i> ); =DSM 20174 =IAM 12477 =NCDO 1752 =NRIC 1067 =CCT 2687
Informações	Type strain [841]. Serological group D [793]. Murein: A31. Teichoic acid: ribitol 45.0 [794], 44.0 [937] 5S rRNA [768], 16S rRNA [897]
Isolamento	Pickled cabbage
Taxonomia	Firmicutes, Subdivision A2(with low GC content of DNA)
Crescimento	MRS; 30 °C
Preservação	LY; -80 °C T03/07/C1-5
Depósito	Aberto

### 3.1.3 Fonte de nitrogênio

Utilizou-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio, por seu alto desempenho apresentado na literatura (LIU et al., 2010; TIMBUNTAM; SRIROTH; TOKIWA, 2006).

### 3.1.4 Estudos prévios

Neste estudo, as bactérias selecionadas foram inoculadas seguindo as condições de crescimento indicadas pela FAT. Posteriormente, o melão foi fermentado em *Shaker* variando as condições de concentração de sacarose, extrato de levedura e temperatura para cada bactéria, coletando amostras a cada 6 h, 10 h e 24 h para sua posterior análise.

Para evitar possíveis contaminações entre micro-organismos, o manuseio dos micro-organismos foi realizado em bancada de fluxo laminar vertical com recirculação de ar (Figura 28).



Figura 28. Bancada de fluxo laminar vertical com recirculação de ar Pachane modelo PA 050.

O material usado e os meios de cultura empregados antes da inoculação e fermentação foram esterilizados em autoclave vertical, marca Phoenix Lufenco (Figura 29). Mesmo assim, no final de cada ensaio, todo material usado foi esterilizado.



Figura 29. Autoclave Phoenix Lufanco modelo. AV-50 PLUS.

Na continuação, descreve-se a metodologia utilizada para a realização de todos os ensaios.

### 3.1.4.1 Inóculo

Todas as colônias foram adquiridas da FAT e recebidas em tubos de ensaio com 7 mL de meio MRS ágar. Portanto, para cada bactéria adquirida, passou-se uma alíquota da bactéria para um novo tubo com meio MRS ágar inclinado por 48 horas, nas condições de crescimento de cada bactéria (Tabela 19) em incubadora, marca QUIMIS (Figura 30).

Tabela 19. Temperaturas de crescimento das bactérias usadas, segundo a FAT (2013).

Bactéria	Temperatura de crescimento (°C)
Lactobacillus delbrueckii	37
Leuconostoc mesenteroides	26
Lactobacillus plantarum	28



Figura 30. Estufa microprocessada de cultura e bacteriologia marca QUIMIS, modelo Q316M5.

Posteriormente, uma pequena quantidade foi inoculada em tubo contendo 10 mL de meio MRS líquido, que foram mantidos nas mesmas condições. Logo, 5

mL dessa solução foram transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL com 45 mL de meio MRS caldo e mantidos por 2 dias em suas respectivas temperaturas de crescimento (Figura 31).

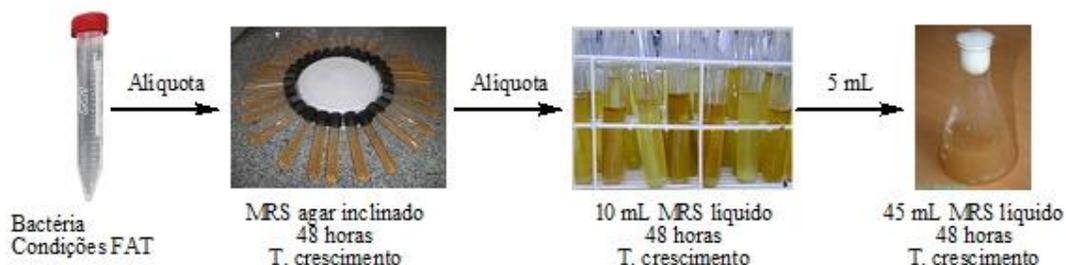


Figura 31. Inoculação para fermentação em Shaker.

### 3.1.4.2 Fermentação

Prepararam-se 300 mL de meio de fermentação contendo 14% de inóculo (preparado anteriormente) e quantidades conhecidas de melaço e extrato de levedura (Tabela 20) em um Erlenmeyer de 500 mL.

Tabela 20. Concentrações de sacarose e extrato de levedura estudada.

Fatores	Concentrações (g/L)		
Sacarose	15	25	35
Extrato de levedura	2	4	6

Posteriormente, a fermentação foi feita em um *Shaker* da marca MARCONI (Figura 32) durante 24 horas, 150 rpm e temperatura de estudo para cada bactéria (Tabela 20 e Tabela 21), a fim de realizar uma análise exploratória sobre o comportamento dessas bactérias. Durante a fermentação, amostras de 4 mL foram retiradas a cada 4 h, 10 h e 24 h. Os experimentos foram separados por temperaturas, tendo um total de nove ensaios (Erlenmeyer) com diferentes concentrações de sacarose e extrato de levedura para cada nível de temperatura estudada (Tabela 20). Portanto, para cada nível de temperatura se realizaram 9 ensaios e se tomaram 27 amostras, tendo ao final das fermentações um total de 81 ensaios e 243 amostras. Amostras que foram analisadas por cromatografia de alta eficiência (HPLC).



Figura 32. Câmara Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital (*Shaker*) marca MARCONI, modelo MA 832.

Tabela 21. Temperaturas estudadas para cada bactéria.

Micro-organismo	Níveis de temperatura (°C)		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	40	43	46
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	29	32	35
<i>Lactobacillus plantarum</i>	31	34	37

### 3.1.5 Fermentação de melaço de cana-de-açúcar para ácido láctico

Após serem avaliados, os efeitos da concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura de trabalho para cada bactéria nos estudos prévios, escolheram-se os melhores resultados obtidos para cada bactéria e se realizou a fermentação de melaço de cana-de-açúcar em biorreator com controle de pH igual a 5.

Como foi descrito nos estudos prévios, os micro-organismos foram manuseados em bancada de fluxo laminar vertical com recirculação de ar (Figura 28) e o material usado nos meios de cultura empregados antes da inoculação e fermentação foram esterilizados em autoclave vertical, marca Phoenix Lufenco (Figura 29). Mesmo assim, no final de cada ensaio, todo material usado foi esterilizado.

A seguir, descreve-se a metodologia empregada para todos os ensaios.

#### 3.1.5.1 Inóculo

Um procedimento similar ao usado para a preparação do inóculo nos estudos de parâmetros em *Shaker* foi usado neste ensaio (Figura 33).

Cada colônia adquirida da FAT foi repicada para um novo tubo com meio MRS ágar inclinado por 48 horas, nas condições de crescimento de cada bactéria (Tabela 19) em incubadora, marca QUIMIS (Figura 30). Posteriormente, uma pequena quantidade foi inoculada em tubo contendo 10 mL de meio MRS líquido, mantido nas mesmas condições. Logo, 5 mL dessa solução foram transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL com 45 mL de meio MRS caldo e mantidos por 2 dias em suas respectivas temperaturas de crescimento (Tabela 19). Por último, esta solução foi transferida para um Erlenmeyer de 1000 mL com 450 mL de meio MRS caldo e mantido em *Shaker* (Figura 32) por 30 h, 150 rpm e temperatura de trabalho de cada bactéria. O esquema geral da inoculação se apresenta na Figura 33.

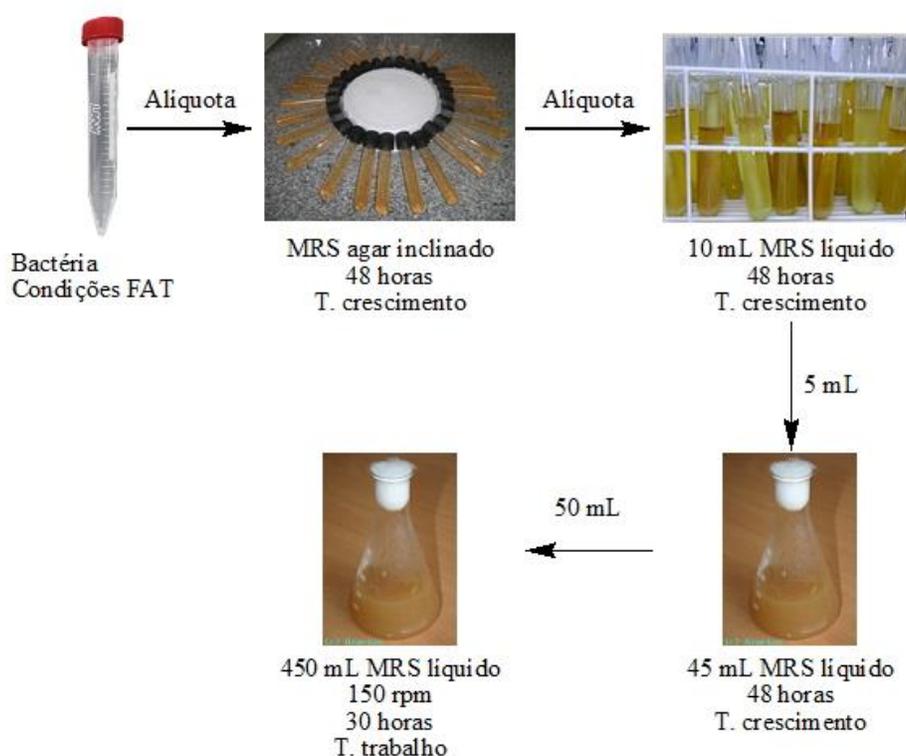


Figura 33. Inoculação para fermentação em biorreator.

### 3.1.5.2 Fermentação

Depois de estabelecidas as melhores condições para a produção do ácido láctico (*L*, *D* e *DL*) segundo cada micro-organismo, fermentou-se melaço de cana-

de-açúcar em fermentador New Brunswick, modelo BioFlo 415 (Figura 34) com capacidade total de 7000 mL e autoclave. Portanto, foram preparados 3000 mL de meio de fermentação contendo 14% de inóculo, concentrações de sacarose e extrato de levedura, previamente determinadas em *Shaker* (Tabela 30, Tabela 32 e Tabela 34).

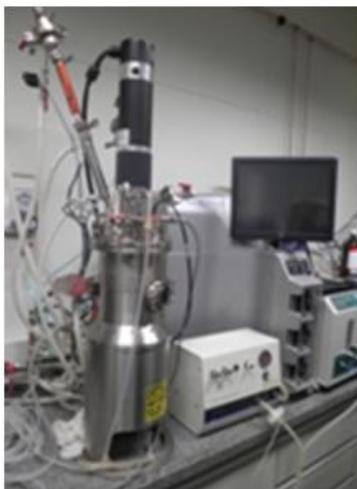


Figura 34. Fermentador New Brunswick, modelo BioFlo 415.

Previamente à fermentação, o melaço foi esterilizado no biorreator. Logo, durante 40 h – 46 h, a fermentação foi mantida para 200 rpm, com controle do pH em 5 com solução de NaOH 4M e temperatura de trabalho determinada nos estudos prévios (Tabelas 30, 32 e 34). Durante a fermentação, coletaram-se amostras a cada duas horas para estudar a formação de produto e diminuição de reagentes. Mesmo assim, pulsos de melaço (relativo ao volume total e volume de amostrar retiradas) foram dados à fermentação.

### 3.1.6 Métodos analíticos

As amostras obtidas das fermentações, tanto em *Shaker* como em biorreator, foram aquecidas em banho maria por cerca de 5 minutos para matar os micro-organismos e evitar interferências no estudo. Logo, foram estocadas em *freezer* para serem analisadas posteriormente.

Para a análise das concentrações dos açúcares e a biomassa, 2 mL de cada amostra foi centrifugada em centrífuga, marca Eppendorf (Figura 35), separando o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante foi usado para as análises de açúcares e ácido láctico, e o precipitado para a análise da biomassa.



Figura 35. Centrífuga Eppendorf modelo 5810R.

### 3.1.6.1 Análise de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico

Soluções do sobrenadante diluídas 1:1 com água destilada foram filtradas em membranas Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenadas em tubos Eppendorfs de 1,5 mL para posterior quantificação da concentração dos açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) e ácido láctico através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System (Figura 36) equipado com uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H e detector de índice de refração (RID).



Figura 36. Cromatógrafo Agilent, modelo 1260 *Infinity Quaternary LC System*.

A metodologia usada foi adaptada de Lunelli (2010). Uma solução do ácido sulfúrico (5 mM, pH 2,16) filtrada em membrana Millipore e desgaseificada por 30 minutos em banho de ultrassom, foi usada como fase móvel. No cromatógrafo foram injetadas 15 µL de amostra, a 25 °C, com taxa de fluxo de 0,6 mL/minuto; cada corrida tomou um tempo de 20 minutos com 30 segundos de intervalo entre cada uma.

Antes da análise, o método foi calibrado injetando soluções de concentrações conhecidas de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico (Tabelas 22 e 23) no cromatógrafo. Logo, com os dados de concentração (g/L) e área do pico de cada analito se calibrou o método (Apêndice A). Posteriormente, as amostras coletadas foram caracterizadas com base nesta calibração.

Tabela 22. Padrões usados na caracterização do caldo de melação fermentado.

Padrão	% Pureza	Marca	Código do Produto
Sacarose	99,5	Sigma-Aldrich	84097-250G
Glicose	99,5	Sigma-Aldrich	G7528-250G
Frutose	99,5	Sigma-Aldrich	15760-100G
Ácido láctico	90	Fluka	69785-1L

Tabela 23. Soluções padrões usados na caracterização do caldo de melação fermentado.

Solução	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Ácido láctico (g/L)
1	0,22	0,03	0,03	0,25
2	2,23	0,25	0,26	2,53
3	6,69	0,74	0,78	7,58
4	11,15	1,23	1,30	12,64
5	17,84	1,97	2,09	20,22
6	22,30	2,46	2,61	25,27

### 3.1.6.2 Análise da biomassa

A concentração de biomassa foi determinada pelo método gravimétrico. Então, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado para 4000 rpm por 10 min. A biomassa foi colocada em tubos Eppendorfs de 1,5 mL, previamente pesados e secos (105 °C, 4 h) e se secaram em uma estufa marca SP Labor (Figura 37) a 105 °C durante 4 h.



Figura 37. Estufa de secado estático com circulação e renovação de ar marca SP Labor, modelo SP-102/336.

### 3.1.6.3 Análise da esteroquímica do ácido láctico

Para a análise da esteroquímica do ácido láctico obtido na fermentação de melaço de cana-de-açúcar pelas bactérias *Lactobacilos delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacilos plantarum*, usou-se o kit *D-Lactic acid/L-Lactic acid UV-method*, Cat. No. 11 112 821 035, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis.

## 3.2 PRODUÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO

Neste estudo, o ácido acrílico sintetizado a partir da desidratação de soluções do ácido láctico (152 g/L). Usando ácido láctico comercial e ácido láctico obtido da fermentação do melaço de cana-de-açúcar com *Lactobacillus plantarum*. Esse último foi escolhido por ter apresentado maior concentração de ácido láctico no caldo de melaço de cana-de-açúcar fermentado e por apresentar uma esteroquímica (*DL*) similar ao ácido láctico comercial.

Posteriormente, os catalisadores usados foram escolhidos, preparados e caracterizados segundo reportes recentes e relevantes sobre desidratação de ácido láctico.

Na continuação, apresenta-se a metodologia usada na desidratação de ácido láctico, partindo da seleção e preparação dos catalisadores testados, com

posterior desidratação de ácido láctico e finalizando com os métodos analíticos usados.

### 3.2.1 Seleção de catalisadores

Com base nos últimos reportes sobre desidratação do ácido láctico (Tabela 14) foram escolhidos dois catalisadores promissores na produção do ácido acrílico, KI/NaY e KBr/NaY. Assim, propôs-se o catalisador  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  como possível agente desidratante do ácido láctico (LEE et al., 2010; SUN et al., 2009; YAN et al., 2010). Este último, apresenta uma modificação do catalisador  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{SiO}_2$  reportado por Lee *et al.* (2010) na desidratação de lactato de metila para ácido acrílico.

### 3.2.2 Preparação dos catalisadores

Seguindo os trabalhos de Lee *et al.* (2010); Sun *et al.* (2009, 2010) e Yan *et al.* (2010), os catalisadores foram preparados usando o método de impregnação.

#### 3.2.2.1 Zeólita NaY comercial

100 g da Zeólita NaY (pó branco e fino, Sigma-Aldrich) foi passada por peneiras de 32, 48, 60 e 150 mesh, em um peneirador marca Produtest (Figura 38).



Figura 38. Peneirador marca Produtest.

Devido ao tamanho de partícula da zeólita, sua totalidade passou por todas as peneiras; coletando um pó fino e branco na parte inferior no peneirador. A zeólita foi armazenada em recipiente fechado.

### 3.2.2.2 Zeólita NaY modificado

Em um béquer de 500 mL foram adicionados 250 mL de solução 1N de  $\text{NaNO}_3$  e se adicionaram, vagarosamente, 10 gramas da zeólita NaY comercial previamente peneirada e seca em estufa de secador estático com circulação e renovação de ar, modelo SP-102/336, marca SP Labor (Figura 39) a  $100^\circ\text{C}$  durante 12 horas. A suspensão foi agitada em *Shaker* (Figura 32) com velocidade de agitação de 200 rpm durante 12 horas a  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente, a suspensão foi filtrada a vácuo e lavada três vezes com 10 mL de água deionizada. Logo, secou-se o catalisador para  $100^\circ\text{C}$  durante 17 horas, em um cadinho. Imediatamente, foi calcinada em mufla, marca QUIMIS (Figura 39) a temperatura de  $550^\circ\text{C}$  durante 6 horas; aumentando a temperatura da mufla  $50^\circ\text{C}$  cada 10 minutos até conseguir a temperatura de calcinação. Para conseguir um total de 40 gramas do material, o ensaio foi realizado em quadruplicada, no mesmo tempo, e no final se misturaram as zeólitas assim preparadas. Finalmente, o catalisador foi rotulado e armazenado em recipiente fechado.

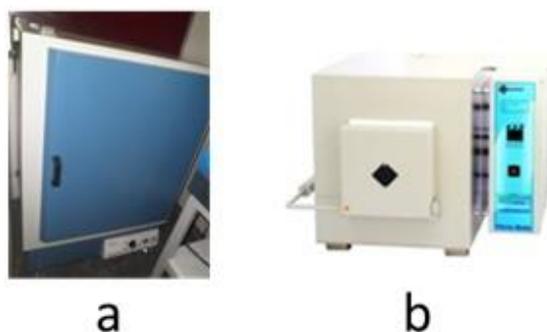


Figura 39. a) Estufa de secado estático com circulação e renovação de ar, modelo SP-102/336, marca SP Labor. b) Forno mufla microprocessado, modelo Q3 18M, marca QUIMIS.

### 3.2.2.3 Catalisadores KI/NaY e KBr/NaY

No caso dos catalisadores KI/NaY e KBr/NaY, a síntese foi realizada em béquer de 50 mL, pesaram-se 10 g de zeólita NaY modificada e se adicionaram 22 mL de solução de sal de potássio (KI, KBr) de concentração 0,4 mol/L. A suspensão foi agitada em um agitador magnético de múltiplas posições sem aquecimento marca IKA (Figura 40) durante 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão foi seca em câmara incubadora refrigerada com agitação orbital, marca MARCONI (Figura 32) sem agitação durante 12 horas a 70°C. Logo, os catalisadores foram calcinados em forno mufla micro processado marca QUIMIS (Figura 39) a temperatura de 550°C durante 6 horas, aumentando a temperatura da mufla 50°C a cada 10 minutos até atingir 550°C. Finalmente, cada catalisador foi rotulado e armazenado em recipientes fechados.



Figura 40. Agitador magnético de múltiplas posições sem aquecimento, modelo RO5, marca IKA.

### 3.2.2.4 Catalisador $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$

Em um béquer de 50 mL, adicionou-se 2 g de zeólita NaY modificado, 8 g de fosfato de tri-cálcio anidro (Sigma-Aldrich), e 22 mL de água deionizada. A suspensão foi agitada em um agitador magnético de várias posições (Figura 40), sem aquecimento, durante 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão foi seca em câmara incubadora refrigerada com agitação orbital marca MARCONI (Figura 32), sem agitação, durante 12 horas a 70°C. Logo, o catalisador foi calcinado em forno mufla micro processado, marca QUIMIS (Figura 39), a temperatura de 550°C durante 6 horas, aumentando a temperatura da mufla

50°C a cada 10 minutos até conseguir a temperatura de calcinação. Finalmente, o catalisador foi rotulado e armazenado em recipientes fechados.

### 3.2.3 Desidratação catalítica do ácido láctico

A desidratação do ácido láctico para ácido acrílico, sobre catalisadores suportados em zeólita NaY, foi realizada em reator de leito fixo (Figura 41).



Figura 41. a) Equipamento usado na desidratação do ácido láctico; b) Sistema de alimentação; c) Reator tubular coberto com um revestimento de aquecimento; d) sistema de esfriamento.

O reator está constituído por um sistema de alimentação equipado por uma bureta de 50 mL onde foi colocado o ácido láctico, uma bomba (HPL 515) para controlar o fluxo de alimentação no reator, uma entrada lateral para a entrada do gás de arraste, um reator tubular de 10,75 mm de diâmetro interno e 130 mm de comprimento coberto com um revestimento de aquecimento, onde foi depositado o catalisador e fixado com lã de vidro nos extremos, um sistema de resfriamento constituído por um béquer com água, gelo e cloreto de sódio, onde foi colocado um tubo de ensaio com saída lateral para condensar a amostra e liberar o gás de arraste.

Na reação, o reator foi recheado com 1,16 g de lã de vidro na parte inferior, 2,16 g de catalisador e 2,24 g de lã de vidro no topo. Acoplado no equipamento (Figura 41), o catalisador foi pré-tratado a 300 °C durante meia hora com fluxo de Ar (30 mL/min). Logo, a solução do ácido láctico (152 g/L) foi bombeada para o reator com ajuda de CO<sub>2</sub> (30 mL/min) usado como gás de arraste. Então, amostras do produto foram coletadas a cada 20 minutos por três horas. A metodologia foi repetida no estudo de todos os catalisadores usados na desidratação do ácido láctico comercial e fermentado.

### 3.2.4 Métodos analíticos

Na continuação, descrevem-se os métodos usados na caracterização dos catalisadores e dos ácidos orgânicos principais obtidos na desidratação do ácido láctico.

#### 3.2.4.1 Caracterização dos catalisadores

Para a caracterização dos catalisadores foram realizados ensaios de difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica acoplada à espectroscopia de raios X (MEV/EDS), no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP).

A análise da estrutura cristalina dos catalisadores foi realizada em um difratômetro de raios X marca Philips Analytical X Ray, modelo X'Pert-MPD (Figura 42) com irradiação de CuK $\alpha$  de 1,54060 Å, com voltagem de 40 kV, corrente de 40 pA; 2 $\theta$ : 10-70 graus, passo: 0,02 graus, velocidade 0,011 graus/segundo.



Figura 42. Difratômetro de raios X, modelo X'Pert, marca Philips.

A morfologia e a microanálise elementar foram determinadas por um microscópio eletrônico de varredura com detector de energia dispersiva de raios X (MEV/EDS), modelo Leo 440i, marca LEO Electron Microscopy/Oxford (Figura 43). Utilizou-se tensão de aceleração igual a 20 kV e corrente de 600 pA.



Figura 43. Microscópio eletrônico de varredura com módulo de energia dispersiva de raios x (MEV/EDS), modelo MEV: Leo 440i, modelo EDS: 6070, marca MEV/EDS: LEO *Electron Microscopy*.

Previamente à análise da morfologia e sua composição elementar, foi feito um recobrimento de ouro nos catalisadores, em um *Sputter Coater* POLARON, modelo SC7620, marca VG *Microtech* (Figura 44). Utilizou-se para o cálculo da estimativa da espessura da camada de Au:  $\text{Espessura} = K \cdot i \cdot V \cdot t$ , onde  $K=0,17 \text{ \AA} / \text{mA} \cdot \text{Volt} \cdot \text{s}$ ;  $i=3 \text{ mA}$ ;  $V=1 \text{ Volt}$  e  $t=180 \text{ s}$ . Portanto, obteve-se uma espessura de 92  $\text{\AA}$ .



Figura 44. Sputter Coater POLARON, modelo SC7620, marca VG *Microtech*.

#### 3.2.4.2 Caracterização do produto da desidratação

A quantificação dos ácidos orgânicos láctico, acético, propanóico e acrílico foi feita por análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System (Figura 36) equipado com uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H. Antes da caracterização do

produto da desidratação, o método usado foi calibrado com padrões de ácido láctico, ácido acético e ácido acrílico.

As amostras foram preparadas centrifugando aproximadamente 2 mL de cada amostra para 25 °C, 10 minutos e 8000 rpm em uma centrífuga marca Eppendorf (Figura 35) e posterior filtração em membranas de celulose de 0,22 µm marca Millipore. Logo, as amostras foram diluídas para relação 10:1 em água tipo Milli-Q.

Solução do ácido sulfúrico (5 mM, pH 2,16), filtrada em membrana Millipore e degaseificada por 30 minutos em banho ultrassom, foi usada como fase móvel. No cromatógrafo foi injetada 15 µL de amostra, a 30 °C, com taxa de fluxo de 0,6 mL/minuto; cada corrida tomou um tempo de 30 minutos e 30 segundos de intervalo entre cada corrida.

---

# CAPÍTULO 4

## RESULTADOS E

## DISCUSSÕES



Neste capítulo se apresentam os resultados obtidos tanto da produção do ácido láctico, a partir de melaço de cana-de-açúcar, como da síntese do ácido acrílico por desidratação catalítica do ácido láctico. Mesmo assim, se discutem os resultados obtidos em cada estudo.

## 4.1 PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

Na continuação, se apresentam os resultados obtidos da produção do ácido láctico com cada bactéria nos estudos prévios e os resultados obtidos na fermentação em biorreator.

### 4.1.1 Estudos prévios

Neste estudo, avaliou-se o efeito da concentração de sacarose, extrato de levedura e temperatura de fermentação para cada uma das bactérias: *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*. Bactérias produtoras do ácido láctico *D*, *L* e *DL*, respectivamente.

#### 4.1.1.1 *Lactobacillus delbrueckii*

As concentrações do ácido láctico obtidas dos parâmetros estudados (Tabela 24) para essa bactéria após 24 horas de fermentação se apresentam na Figura 45 e na Tabela 25.

Tabela 24. Parâmetros estudados nos estudos prévios de *Lactobacillus delbrueckii*.

Pârametros	Níveis		
Tempo de fermentação (h)	6	10	24
Temperatura (°C)	40	43	46
Concentração de sacarose (g/L)	14,09	23,49	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	2	4	6

Na Figura 45, são indicados os parâmetros com barras de cores, destacando as concentrações de extrato de levedura (2 g/L, 4 g/L e 6 g/L) de cor azul e as concentrações de sacarose na cor verde. Logo dos ensaios as concentrações de sacarose usadas nos ensaios em *Shaker* foram recalculadas

por análise em HPLC obtendo concentrações de 14,09 g/L, 23,29 g/L e 32,88 g/L, respectivamente. A temperatura (40 °C, 43 °C e 46 °C) se apresenta na cor roxa, e as concentrações obtidas do ácido láctico na cor vermelha. Dados apresentados para 24 horas de fermentação; já que para 6 e 10 horas de fermentação as concentrações do ácido láctico foram baixas (3 g/L a 6 g/L).

Tabela 25. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando *Lactobacillus delbrueckii*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
40	14,09	2	7,2	43	23,49	6	8,6
40	14,09	4	7,7	43	32,88	2	8,8
40	14,09	6	8,5	43	32,88	4	9,0
40	23,49	2	8,6	43	32,88	6	10,0
40	23,49	4	8,8	46	14,09	2	10,3
40	23,49	6	9,5	46	14,09	4	5,1
40	32,88	2	10,0	46	14,09	6	6,5
40	32,88	4	10,1	46	23,49	2	6,3
<b>40</b>	<b>32,88</b>	<b>6</b>	<b>10,3</b>	46	23,49	4	5,0
43	14,09	2	7,1	46	23,49	6	6,2
43	14,09	4	7,9	46	32,88	2	6,2
43	14,09	6	8,4	46	32,88	4	5,1
43	23,49	2	8,4	46	32,88	6	5,7
43	23,49	4	7,2	-	-	-	-

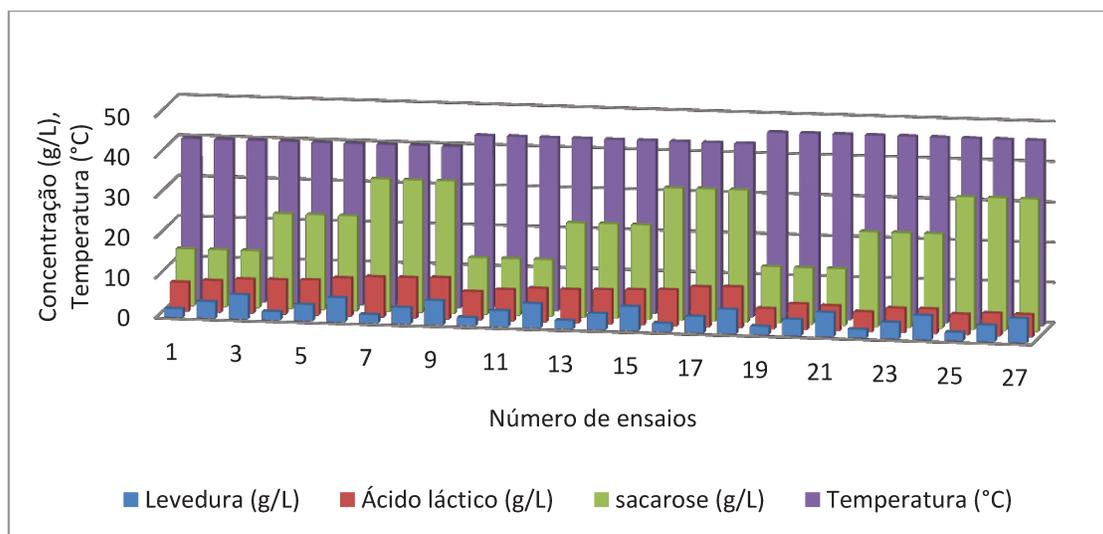


Figura 45. Resultados obtidos nos estudos prévios, em *Shaker*, para *Lactobacillus delbrueckii* a 24 horas de fermentação.

Observando-se nas barras de cor vermelha (Figura 45), é possível determinar que a melhor produção do ácido láctico (10,32 g/L) foi obtida com temperatura de 40 °C, concentração de sacarose de 32,88 g/L, concentração de extrato de levedura de 6 g/L e 24 horas de fermentação.

Para a análise dos efeitos da temperatura, da sacarose, do extrato de levedura e do tempo de fermentação, escolheu-se um parâmetro (tempo) a analisar e os outros (temperatura, sacarose, levedura) foram fixados para seus valores mais relevantes (Figura 46) segundo os resultados da Figura 45 e a Tabela 25.

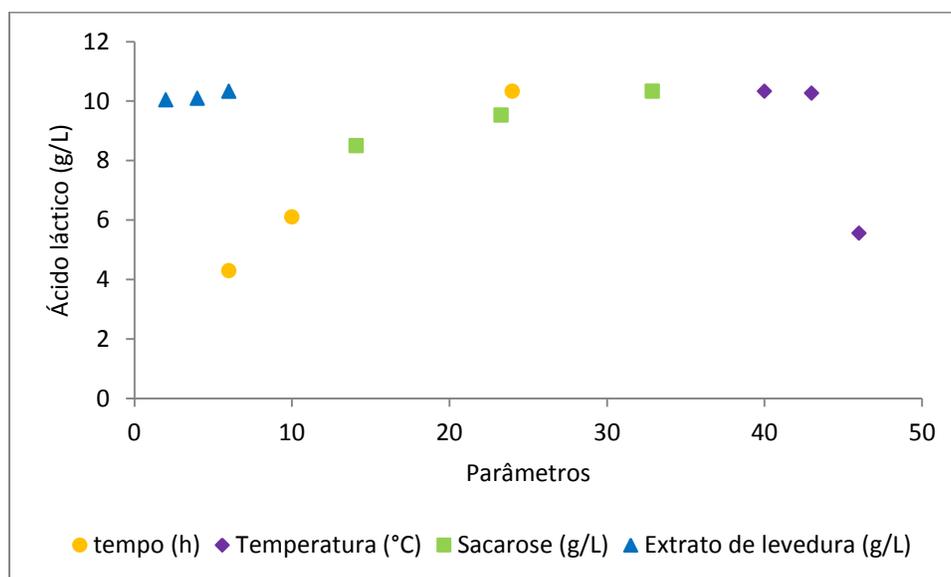


Figura 46. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a *Lactobacillus delbrueckii* na produção do ácido láctico.

Por simplicidade, o primeiro parâmetro analisado foi o tempo de fermentação, porque para todos os conjuntos de parâmetros estudados os melhores resultados na produção do ácido láctico foram obtidos em 24 horas (Figura 45). Comportamento é apreciado na Figura 46 quando outros parâmetros foram fixados para: 40 °C; 32,88 g/L de sacarose e 6 g/L de extrato de levedura. Resultado esperado, já que à medida que o tempo da fermentação transcorre, o ácido láctico produzido é acumulado no ensaio.

A temperatura foi analisada fixando os outros parâmetros para: 24 horas de fermentação; 32,88 g/L de sacarose e 6 g/L de extrato de levedura (Figura 46). Esse parâmetro teve um efeito acentuado na bactéria. Sendo que à medida que a temperatura foi aumentada (40 °C, 43 °C e 46 °C), a concentração do ácido láctico diminuiu consideravelmente (10,33 g/L, 10,00 g/L e 5,66 g/L). Portanto, se estima que o aumento da temperatura impediu o crescimento bacteriano, motivo pelo qual se encontrou pouca concentração do ácido láctico (Tabela 25).

Para a análise da concentração de sacarose se fixou a temperatura para 40 °C, a concentração de extrato de levedura para 6 g/L, e o tempo de fermentação para 24 horas (Figura 46). Para essas condições, a sacarose mostrou um efeito moderado, com concentrações do ácido láctico de 8,50 g/L, 9,52 g/L e 10,33 g/L. Efeito que foi coerente com as concentrações de sacarose usadas no melaço (14,09 g/L, 23,29 g/L e 32,88 g/L), mostrando uma relação aproximadamente constante de 1 g/L do ácido láctico por cada 10 g/L de sacarose aumentada no melaço.

Por último, fixou-se a temperatura para 40 °C, a concentração de sacarose para 32,88 g/L, e o tempo de fermentação para 6 horas para a análise da concentração de extrato de levedura (Figura 46). Parâmetro que teve leve efeito na concentração do ácido láctico (10,04 g/L, 10,10 g/L e 10,33 g/L). Portanto, nas condições estudadas, as bactérias sempre estiveram com boa quantidade de nutrientes (Tabela 25).

Com os resultados obtidos, optou-se por usar temperatura de 40 °C, concentração de sacarose de 32,88 g/L, concentração de extrato de levedura de 4 g/L e tempo de fermentação superior a 24 horas, na fermentação de melaço de cana-de-açúcar com *Lactobacillus delbrueckii*, em biorreator BioFlo 415.

#### 4.1.1.2 *Leuconostoc mesenteroides*

Na Figura 47 e na Tabela 26, se mostram os resultados obtidos dos parâmetros estudados (Tabela 27) para essa bactéria após 24 horas de

fermentação. Indica-se na Figura 47 os parâmetros de estudo e a concentração do ácido láctico obtido, com barras de cores, como foi apresentado no estudo anterior; os ensaios para 6 horas e 10 horas mostraram concentrações bem baixas do ácido láctico.

Tabela 26. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando *Lactobacillus delbrueckii*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
29	14,09	2	5,3	32	23,49	6	7,8
29	14,09	4	5,1	32	32,88	2	9,0
29	14,09	6	4,7	<b>32</b>	<b>32,88</b>	<b>4</b>	<b>8,9</b>
29	23,49	2	6,2	32	32,88	6	9,2
29	23,49	4	6,0	35	14,09	2	5,6
29	23,49	6	6,0	35	14,09	4	6,7
29	32,88	2	6,8	35	14,09	6	6,3
29	32,88	4	7,0	35	23,49	2	8,1
29	32,88	6	7,0	35	23,49	4	7,7
32	14,09	2	5,3	35	23,49	6	7,6
32	14,09	4	5,2	35	32,88	2	8,7
32	14,09	6	5,3	35	32,88	4	8,6
32	23,49	2	6,1	35	32,88	6	8,3
32	23,49	4	6,7	-	-	-	-

Tabela 27. Parâmetros estudados nos estudos prévios de *Leuconostoc mesenteroides*.

Pârametros	Níveis		
Tempo de fermentação (h)	6	10	24
Temperatura (°C)	29	32	35
Concentração de sacarose (g/L)	14,09	23,49	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	2	4	6

Observando-se as barras de cor vermelha, é possível determinar que a melhor produção do ácido láctico (9,2 g/L) foi obtida com temperatura de 32 °C, concentração de sacarose de 32,88 g/L, concentração de extrato de levedura de 6 g/L e 24 horas de fermentação.

A análise dos efeitos paramétricos foi realizada de forma similar àquela feita para o *Lactobacillus delbrueckii*.

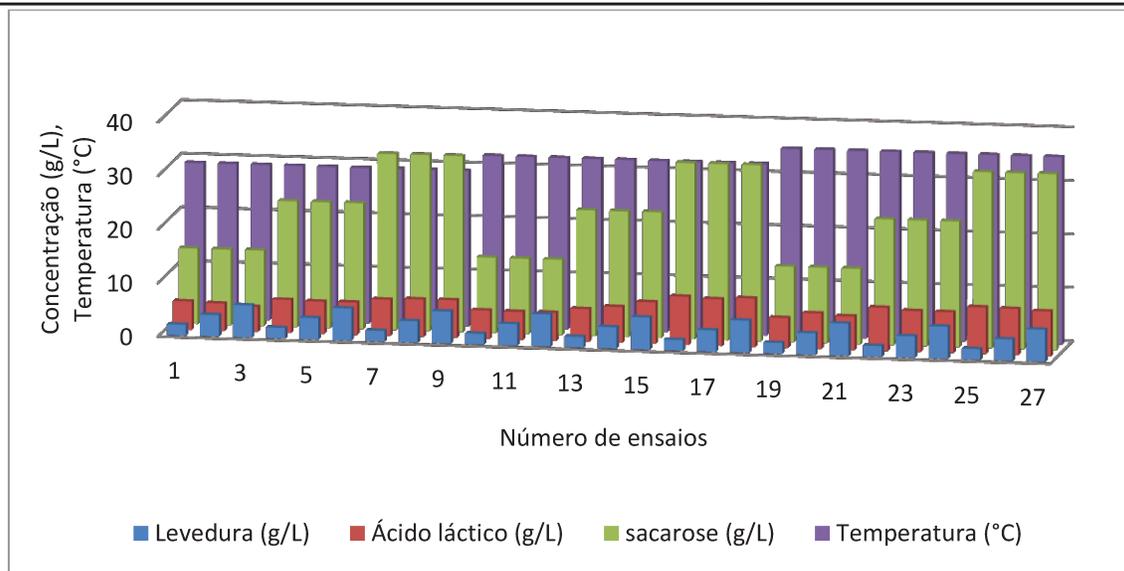


Figura 47. Resultados obtidos nos estudos prévios, em *Shaker*, para *Leuconostoc mesenteroides* a 24 horas de fermentação.

Portanto, para a análise do tempo de fermentação, a temperatura, a concentração de sacarose e a concentração de extrato de levedura foram mantidas para 32 °C, 32,88 g/L e 6 g/L, respectivamente (Figura 48). Observando-se que no maior tempo de fermentação se obteve um aumento na concentração do ácido láctico produzido. Por conseguinte, o tempo de fermentação favorece a produção, como é de se esperar (Tabela 26).

A fim de analisar a temperatura, se fixaram os outros parâmetros para: 24 horas de fermentação; 32,88 g/L de sacarose e 6 g/L de extrato de levedura (Figura 48). Encontrando para 29 °C, 32 °C e 35 °C concentrações do ácido láctico de 7,03 g/L, 9,16 g/L e 8,34 g/L, respectivamente. Por conseguinte, se encontrou uma temperatura ótima de 32 °C. Para temperatura inferior ou superior o efeito é desfavorável para a fermentação.

Para a análise da concentração de sacarose na fermentação, foi fixado o tempo da fermentação para 24 horas, a temperatura para 32 °C e a concentração de extrato de levedura para 6 g/L. Observou-se um efeito significativo do presente parâmetro na fermentação com aumento da concentração do ácido láctico em função da sacarose. No entanto, a diferença da concentração do ácido láctico

obtido entre as duas maiores concentrações da sacarose é inferior à diferença entre as duas primeiras concentrações de sacarose. Por conseguinte, a concentração de sacarose de 32,88 g/L foi ótima no estudo (Tabela 26).

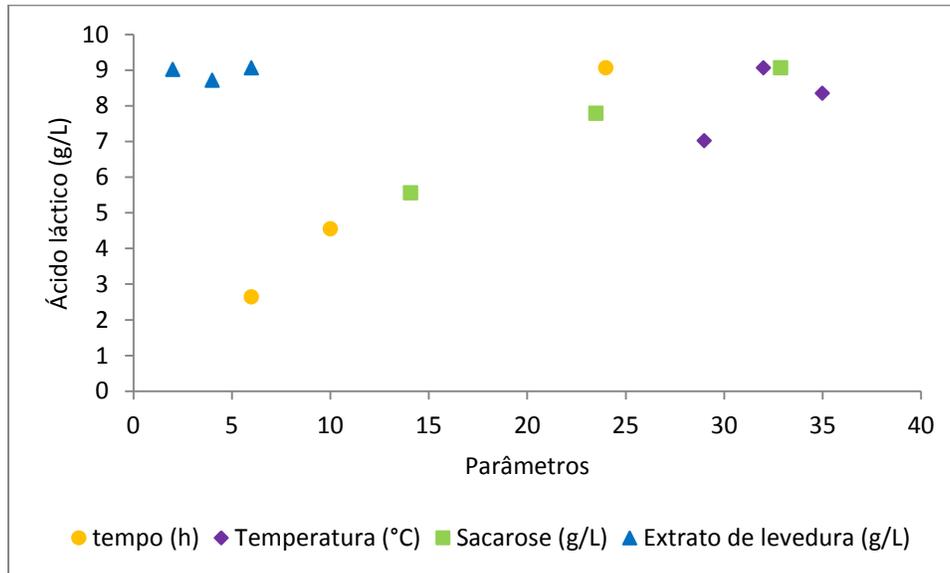


Figura 48. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a *Leuconostoc mesenteroides* na produção do ácido láctico.

A análise com tempo de fermentação de 24 horas, temperatura de 32 °C e concentração de sacarose de 32,88 g/L foi analisado o efeito da concentração de extrato de levedura na produção do ácido láctico. Como é observado na Figura 48, esse parâmetro teve pouco efeito no presente estudo com uma diferença de 0,34 g/L do ácido láctico entre o menor e o maior valor (Tabela 26).

Baseado nos resultados obtidos se decidiu trabalhar com temperatura de 32 °C, concentração de sacarose de 32,88 g/L, concentração de extrato de levedura de 4 g/L e tempo de fermentação superior a 24 horas, na fermentação de melaço de cana-de-açúcar com *Leuconostoc mesenteroides*, em biorreator BioFlo 415.

#### 4.1.1.3 *Lactobacillus plantarum*

As concentrações do ácido láctico obtidos dos parâmetros estudados (Tabela 28) para essa bactéria a 24 horas de fermentação se apresentam na Figura 49 e na Tabela 29.

Tabela 28. Parâmetros estudados nos estudos prévios de *Lactobacillus plantarum*.

Pârametros	Níveis		
Tempo de fermentação (h)	6	10	24
Temperatura (°C)	31	34	37
Concentração de sacarose (g/L)	14,09	23,49	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	2	4	6

Tabela 29. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação usando *Lactobacillus plantarum*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
31	14,09	2	7,1	34	23,49	6	9,7
31	14,09	4	4,3	34	32,88	2	10,6
31	14,09	6	6,8	34	32,88	4	10,5
31	23,49	2	8,3	34	32,88	6	10,6
31	23,49	4	8,4	37	14,09	2	9,1
31	23,49	6	7,3	37	14,09	4	9,1
31	32,88	2	9,2	37	14,09	6	10,0
31	32,88	4	9,8	37	23,49	2	10,6
31	32,88	6	10,3	37	23,49	4	10,8
34	14,09	2	7,8	37	23,49	6	10,9
34	14,09	4	8,2	37	32,88	2	11,4
34	14,09	6	8,2	<b>37</b>	<b>32,88</b>	<b>4</b>	<b>11,5</b>
34	23,49	2	8,8	37	32,88	6	11,8
34	23,49	4	10,0	-	-	-	-

Os ensaios para 6 horas e 10 horas mostraram concentrações bem baixas do ácido láctico, portanto não são apresentados na Figura 49.

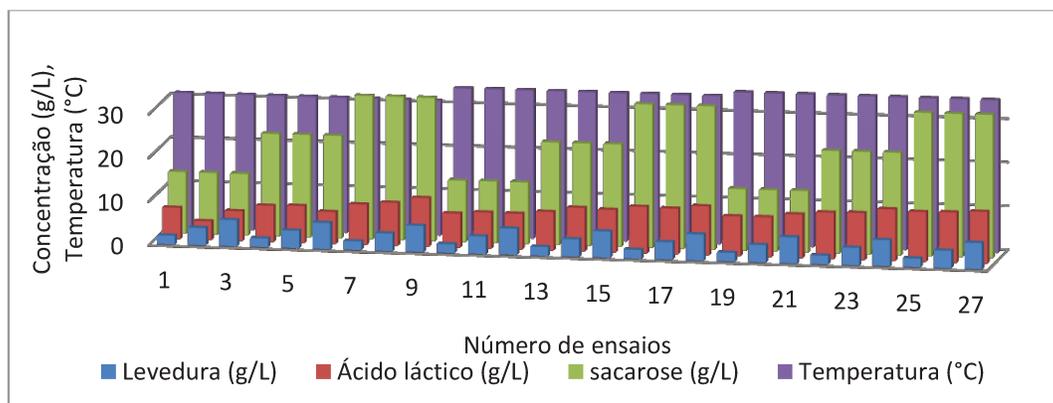


Figura 49 . Resultados obtidos nos estudos prévios, em *Shaker*, para *Lactobacillus plantarum* a 24 horas de fermentação.

Observando-se as barras vermelheias, é possível determinar que a melhor produção do ácido láctico foi obtido com temperaturas de 34 °C e 37 °C (Figura 49). No entanto, a concentração máxima do ácido láctico foi de 11,88 g/L, obtida com 24 horas de fermentação, 37 °C, 32.88 g/L de sacarose e 6 g/L de extrato de levedura (Tabela 29).

A análise dos efeitos paramétricos (Figura 50) foi realizada de forma similar à análise feita para o *Lactobacillus delbrueckii* e *Leuconostoc mesenteroides*. Essa análise permite observar que o fator que teve maior influência na produção do ácido láctico foi o tempo de fermentação (2 h, 6 h e 24 h), reportando 5,98 g/L, 8,84 g/L e 11,88 g/L, respectivamente. A temperatura teve um leve efeito, com produção do ácido láctico de 10,30 g/L, 10,63 g/L e 11,88 g/L, respectivamente, nos níveis superiores de concentração de sacarose e extrato de levedura. A sacarose produz um pequeno efeito, com concentrações do ácido láctico de 9,98 g/L, 10,94 g/L e 11,88 g/L, respectivamente, nos níveis superiores de temperatura e concentração de extrato de levedura. Igualmente, a concentração de extrato de levedura produziu leve efeito na produção do ácido láctico, com concentrações de 11,40 g/L, 11,54 g/L e 11,88 g/L, respectivamente, nos níveis superiores de temperatura e concentração de sacarose.

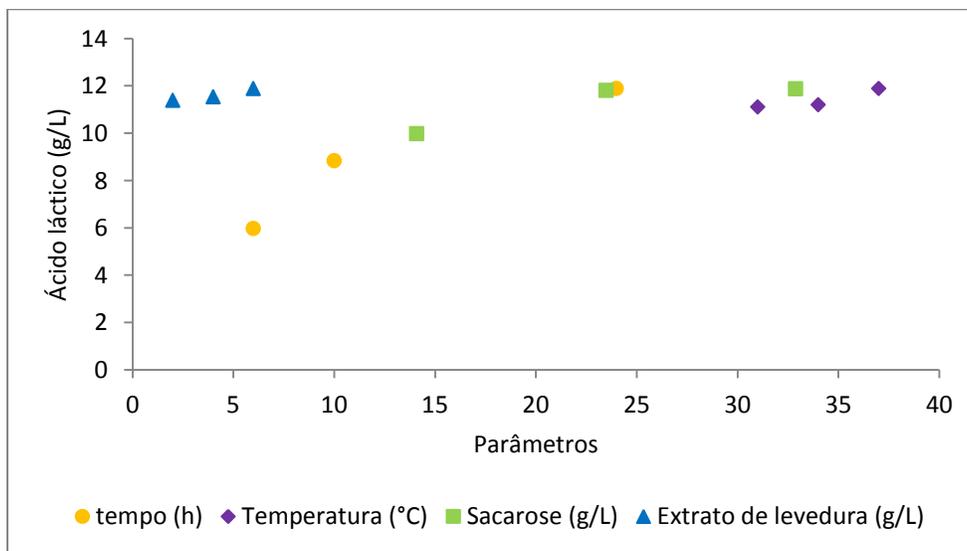


Figura 50. Efeitos do tempo, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e temperatura sob a *Lactobacillus plantarum* na produção do ácido láctico.

Em vista dos resultados anteriores, decidiu-se trabalhar com temperatura de 37 °C, concentração de sacarose de 32,88 g/L, concentração de extrato de levedura de 4 g/L e tempo de fermentação superior a 24 horas, na fermentação de melaço de cana-de-açúcar com *Lactobacillus plantarum*, em biorreator BioFlo 415.

#### 4.1.2 Fermentação de melaço de cana-de-açúcar em biorreator BioFlo 415

Para a fermentação do melaço de cana-de-açúcar em nível de bancada, foram levados em consideração os parâmetros estudados em estudos prévios, onde foram avaliados e determinados os melhores parâmetros para cada bactéria.

De acordo com a metodologia descrita para a fermentação de melaço de cana-de-açúcar em nível de bancada ou biorreator, optou-se por fornecer pulsos de melaço, a fim de se manter uma concentração de sacarose que fosse a mais próxima possível da inicial. Com ajuda do software do biorreator (Figura 34) foi determinado o tempo propício para a geração do pulso segundo o gráfico online na tela do biorreator, do funcionamento da bomba de alimentação de NaOH 4N que controlava o pH para 5, automaticamente.

##### 4.1.2.1 Produção do ácido láctico por fermentação com *Lactobacillus delbrueckii*

Determinados os parâmetros da fermentação (Tabela 30), essa foi realizada em escala de bancada com monitoramento online da bomba de alimentação de solução de NaOH 4N, pH e temperatura para 200 rpm de agitação (Figura 51).

Tabela 30. Parâmetros da fermentação com *Lactobacillus delbrueckii*.

Pârametros	Níveis
Temperatura (°C)	40
Concentração de sacarose (g/L)	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	6
pH	5
Agitação (rpm)	200

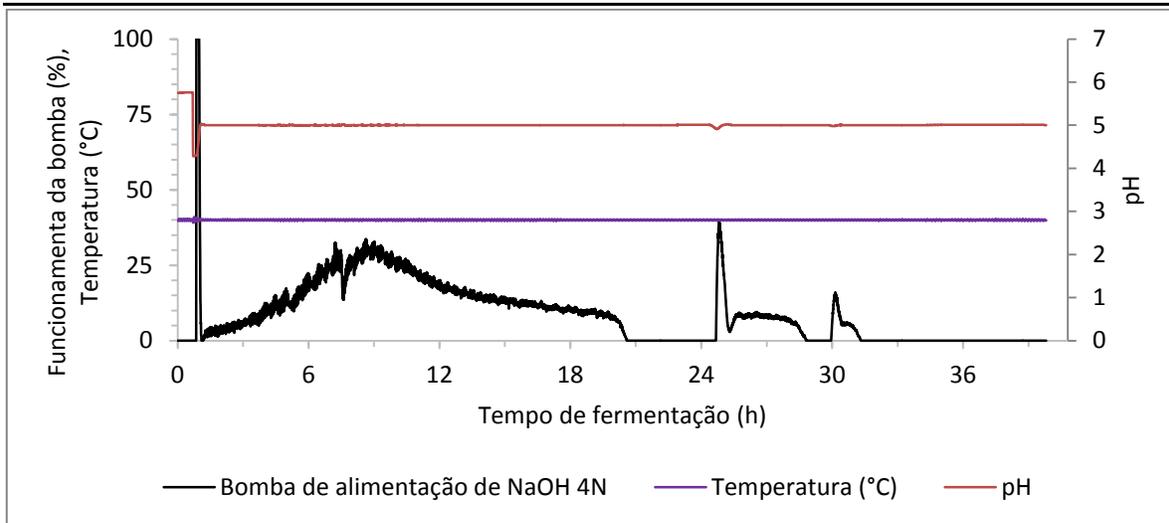


Figura 51. Monitoramento on-line da fermentação de meloço de cana-de-açúcar com *Lactobacillus delbrueckii*.

Na Figura 51, observa-se que durante a fermentação a temperatura e o pH foram mantidos constantes para 40 °C e 5, respectivamente. No entanto, observa-se o funcionamento da bomba de alimentação de solução de NaOH entre aproximadamente 1 hora e 20 horas de fermentação. Funcionamento correspondente ao controle do pH modificado pela geração do ácido láctico no biorreator. Tempo depois se observou inatividade da bomba de alimentação; por isto se decidiu dar um pulso de meloço (72 mL, 173 g/L de sacarose) de sacarose que foi consumido em aproximadamente 4 horas. Finalmente, realizou-se outro pulso de meloço (28 mL, 173 g/L de sacarose), o qual gera pouca atividade na bomba. A fermentação foi dada por terminada depois de 39,72 horas.

Durante a fermentação, as amostras foram coletadas a cada 2 horas, aproximadamente. Na Tabela 31 e na Figura 52, apresentam-se os resultados obtidos e a produtividade do ácido láctico em função do tempo de fermentação.

É importante ressaltar que quando o meloço foi esterilizado no biorreator, observou-se perda de líquido pelas mangueiras do dreno do mesmo; concentrando os componentes do meloço. Por isto, encontrou-se que logo depois da inoculação, as concentrações de sacarose, glicose e frutose aumentaram de 33,51 g/L, 1,57 g/L e 1,91 g/L para 43,35 g/L, 1,97 g/L e 2,48 g/L, respectivamente (Tabela 31).

Tabela 31. Resultados obtidos na fermentação láctea com *Lactobacillus delbrueckii*.

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/L.h)
00,0	33,51	1,57	1,91	-	0,17	-
00,0*	43,35	1,97	2,48	0,98	2,11	-
02,18	41,89	1,71	2,41	1,24	4,59	2,10
04,17	39,65	1,34	2,16	1,80	6,16	-
06,17	36,53	0,24	0,71	2,17	15,51	2,52
08,07	33,69	0,35	0,44	2,24	18,56	2,30
10,08	31,04	0,39	0,36	-	22,09	2,19
12,17	24,13	0,37	0,37	2,85	29,03	2,39
14,42	15,53	0,33	0,33	3,21	34,08	2,36
16,42	11,11	0,34	0,31	-	35,56	2,17
18,42	8,33	0,30	0,32	3,20	39,90	2,17
20,42	4,82	0,27	0,33	3,19	42,35	2,07
22,42	1,40	0,25	0,33	-	44,74	2,00
24,05	0,67	0,25	0,31	-	45,44	1,89
24,23**	0,55	0,24	0,33	3,01	45,23	1,87
24,58	0,55	0,25	0,33	3,18	45,00	1,83
26,50	0,80	0,25	0,33	-	46,16	1,74
28,50	1,61	0,28	0,39	2,90	48,25	1,69
29,75**	0,61	0,26	0,57	2,86	48,28	1,62
30,75	0,60	0,25	0,26	2,75	49,48	1,61
31,75	0,62	0,26	0,25	-	49,74	1,57
32,75	0,56	0,25	0,26	2,93	50,21	1,53
39,72	0,69	0,27	0,23	3,00	50,21	1,26

\*inoculação, \*\*pulso.

Na Figura 52, observa-se a mudança das concentrações dos açúcares, ácido láctico e a biomassa em função do tempo durante a fermentação. É possível observar que durante as 6 horas iniciais, a glicose e frutose foram fermentadas quase em sua totalidade. Entretanto, a sacarose a qual representa a maior quantidade de açúcar presente no melaço tomou cerca de 23 horas para ser fermentada na sua totalidade; logo a cada pulso a sua concentração na fermentação foi pouco percebida (Figuras 51 e 52). A produção do ácido láctico foi bem maior na primeira etapa, antes dos pulsos, onde a concentração molar dos açúcares foi maior. Quanto a biomassa, observou-se um crescimento microbiano entorno de 2,9 g/L após de 18 horas de fermentação.

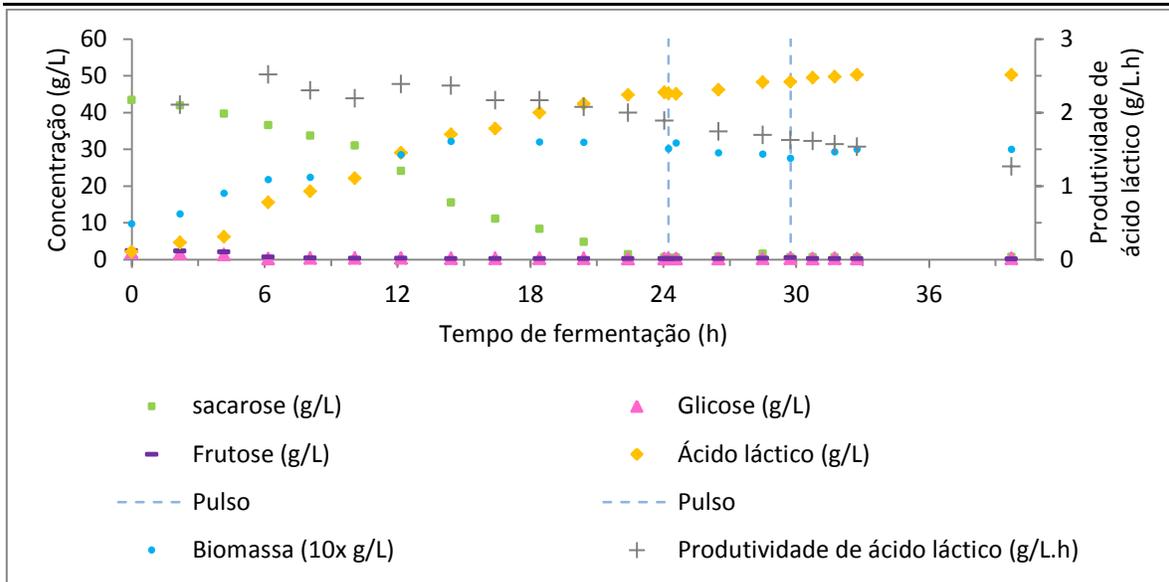


Figura 52. Resultados da fermentação láctea com *Lactobacillus delbrueckii* em função do tempo.

Em geral, ainda que os pulsos de melaço exerçam pouca influência na produção do ácido láctico nas condições estudadas se conseguiu quase total fermentação de sacarose com concentração máxima do ácido láctico de 50,21 g/L, produtividade máxima de 2,52 g/L.h e final 1,26 g/L.h.

#### 4.1.2.2 Produção do ácido láctico por fermentação com *Leuconostoc mesenteroides*

Após serem determinados os parâmetros (Tabela 32), a fermentação foi realizada em escala de bancada com monitoramento online da bomba de alimentação de solução de NaOH 4N, pH e temperatura para 200 rpm de agitação (Figura 53).

Tabela 32. Parâmetros da fermentação com *Leuconostoc mesenteroides*.

Pârametros	Níveis
Temperatura (°C)	32
Concentração de sacarose (g/L)	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	4
pH	5
Agitação (rpm)	200

Na Figura 53, apresenta-se o monitoramento da bomba de alimentação de NaOH, temperatura e pH da fermentação em nível de bancada, durante 39,50 horas.

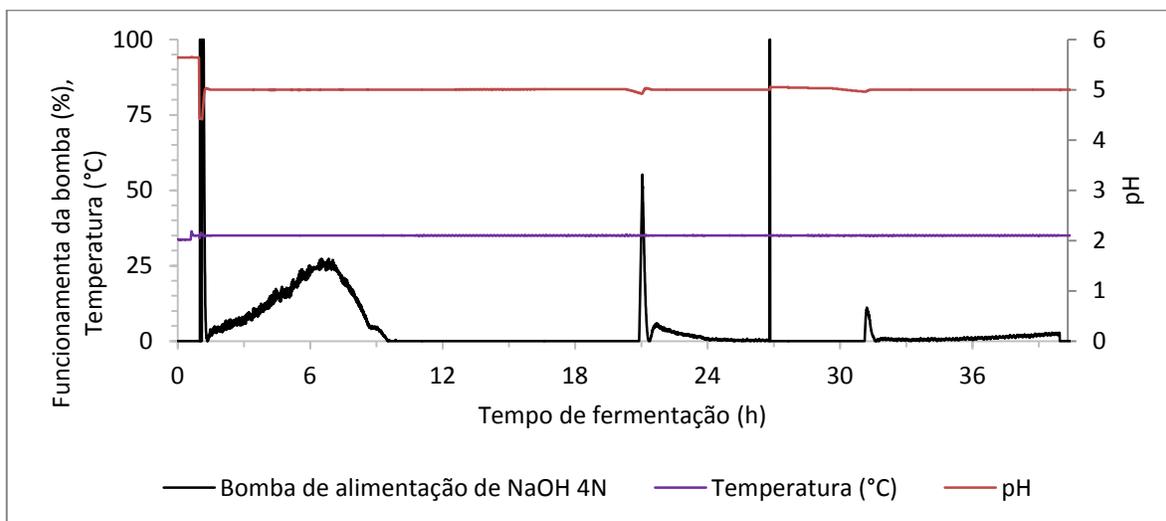


Figura 53. Monitoramento on-line da fermentação de meloço de cana-de-açúcar com *Leuconostoc mesenteroides*.

Na Figura 53, observa-se um funcionamento da bomba de alimentação de NaOH entre 1 hora e 10 horas, aproximadamente, correspondente à adição de base para o controle do ácido láctico gerado do meloço (26,78 g/L de sacarose) usado na primeira etapa da fermentação. A atividade da bomba entre 21 horas e 27 horas se apresentou como resposta ao primeiro pulso de meloço (90 mL, 221,62 g/L de sacarose), e a atividade entre 31 horas e 40 horas, aproximadamente, é devida ao controle do ácido gerado pelo segundo pulso de meloço (40 mL, 221,62 g/L de sacarose) na fermentação.

Por outro lado, foi observada uma pequena variação do pH no início da fermentação e de cada pulso. No entanto, durante a fermentação não se observaram variações da temperatura.

A quantificação das amostras tomadas durante a fermentação permitiu calcular, em função do tempo, o consumo de sacarose, glicose e frutose, e a produção de biomassa, ácido láctico e sua produtividade (Tabela 33).

Tabela 33. Resultados obtidos na fermentação láctea com *Leuconostoc mesenteroides*.

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/L.h)
0,00	31,76	4,74	5,4	-	0,22	-
0,00*	26,78	4,23	5,16	-	0,91	-
1,00	25,04	3,84	5,07	0,65	2,11	-
3,08	21,76	3,43	5,49	0,80	3,01	0,97
5,07	14,44	3,51	8,50	1,10	5,68	1,12
7,17	4,92	2,91	11,82	1,72	8,67	1,21
9,15	1,09	0,43	13,00	1,95	12,27	1,34
11,02	0,60	<0,03	12,88	2,03	13,04	1,18
13,08	0,60	<0,03	12,52	1,95	12,87	0,98
15,25	0,59	<0,03	12,69	1,88	12,91	0,85
19,20	0,62	<0,03	12,52	1,95	12,90	0,67
19,53	0,63	<0,03	12,50	-	12,96	-
21,58**	1,27	1,54	13,68	2,03	13,31	0,62
23,17	1,66	2,32	14,71	-	13,81	0,60
24,08	1,43	2,23	14,78	1,78	13,79	0,57
26,17	1,32	2,09	14,80	-	13,92	0,53
27,75	1,34	2,05	15,03	1,88	14,31	0,52
28,85	1,23	2,03	14,98	1,95	14,25	-
28,98**	1,12	2,00	14,93	2,13	14,12	0,49
29,80	1,38	2,32	15,13	2,05	14,29	0,48
31,33	1,55	2,80	15,46	2,03	14,13	0,45
33,38	1,54	2,73	15,62	2,00	14,60	0,44
35,40	1,39	2,57	15,64	1,90	14,57	0,41
37,68	1,34	2,34	15,73	1,89	15,02	0,40
39,50	1,63	1,94	15,62	1,90	15,84	0,40

\*inoculação, \*\*pulso.

Antes da fermentação, fizeram-se ensaios de esterilização de água no biorreator para saber o volume de líquido médio perdido durante na esterilização, encontrando que se perdem entre 150 -200 mL de líquido por cada 3 L de água esterilizada. Portanto, decidiu-se adicionar 150 mL de água no biorreator antes da esterilização para compensar o volume perdido e evitar a concentração dos componentes do melaço por perda de água, fenômeno observado na fermentação anterior. No entanto, na caracterização do melaço, logo a esterilização e inoculação, encontrou-se uma concentração de sacarose inferior (26,78 g/L) à

inicial (31,76 g/L), igualmente aconteceu com a concentração de glicose e frutose (Tabela 33).

Na Figura 54 se apresentam os resultados obtidos (Tabela 33) em função do tempo.

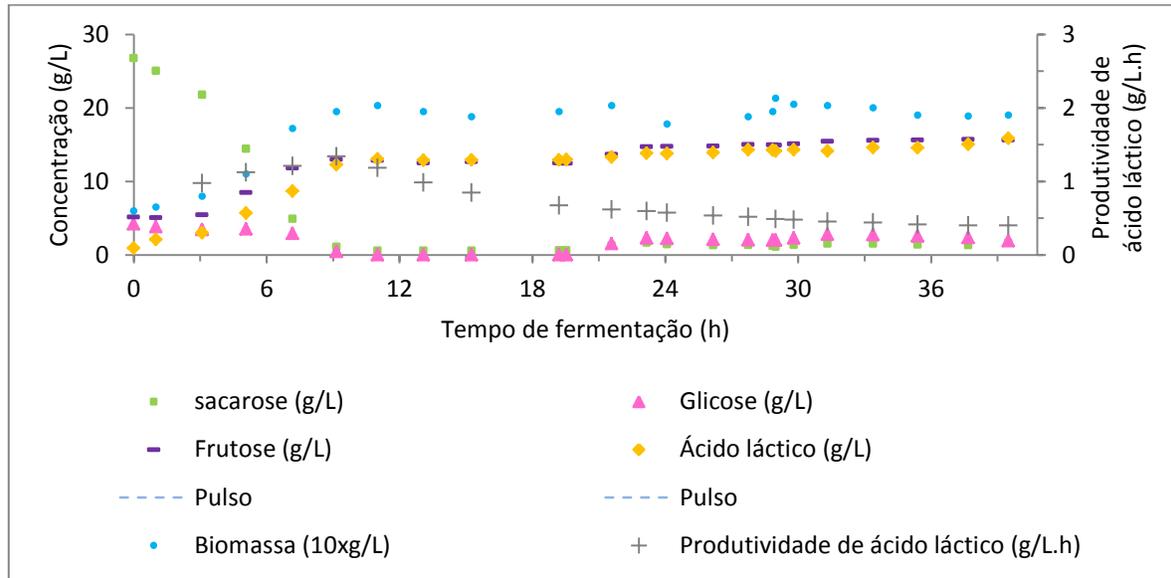


Figura 54. Resultados da fermentação láctea com *Leuconostoc mesenteroides* em função do tempo.

Observa-se na Figura 54 que, aproximadamente, nas primeiras 9 h da fermentação, a concentração de sacarose e glicose foram consumidas quase na sua totalidade. No entanto, aprecia-se um aumento na concentração de frutose (13,00 g/L) dando a entender que, durante a fermentação, a sacarose se fragmenta para glicose e frutose, sendo possível a fermentação somente da glicose. Em consequência, observa-se um aumento na concentração de frutose (13,00 g/L). Por sua vez, a produção de biomassa e ácido láctico atingiu quase seu valor máximo (1,95 g/L e 12,27 g/L, respectivamente), com produtividade do último de 1,34 g/L. Portanto, pode-se dizer que essa é a etapa mais importante da fermentação. Entre as 8 h e 21 h, todas as concentrações têm pouca mudança. No entanto, observa-se uma queda da produtividade do ácido láctico para 0,62 g/L.h. Logo do primeiro pulso (21,58 h), a concentração de sacarose é consumida (28,85 h). No entanto, observa-se que a concentração de frutose aumenta

levemente junto com a concentração do ácido láctico (14,98 g/L e 14,25 g/L, respectivamente).

Além da análise anterior, se estima que a produção de ácido láctico durante a fermentação possa ter sido afetada pelo valor de pH usado, já que a valores próximos de pH=5 a *Leuconostoc mesenteroides* produz dextrana mais frutose (Queiróz, 1987).

Depois do segundo pulso, os resultados têm pouca mudança com concentrações finais (39,5 h) de 1,63 g/L de sacarose, 1,94 g/L de glicose, 15,62 g/L de frutose, 1,9 g/L de biomassa e 15,84 g/L do ácido láctico e produtividade de 0,40 g/L.h.

#### 4.1.2.3 Produção do ácido láctico por fermentação com *Lactobacillus plantarum*

Na Tabela 34 se apresentam os parâmetros da fermentação determinados em estudos prévios. A fermentação foi realizada em escala de bancada com monitoramento online da bomba de alimentação de solução de NaOH 4N, pH e temperatura para 200 rpm de agitação (Figura 55).

Tabela 34. Parâmetros da fermentação com *Lactobacillus plantarum*.

Parâmetros	Níveis
Temperatura (°C)	37
Concentração de sacarose (g/L)	32,88
Concentração de extrato de levedura (g/L)	4
pH	5
Agitação (rpm)	200

O monitoramento da fermentação em função da bomba de alimentação de NaOH, temperatura e pH da fermentação se apresenta na Figura 55. A primeira atividade da bomba corresponde à adição de solução de NaOH 4N para o controle do ácido gerado pela fermentação dos açúcares usados no início da fermentação. Atividade que teve uma duração de 19,5 horas aproximadamente. Posteriormente, deu-se um pulso de 100 mL de melaço (223,55 g/L de sacarose) que contribuíram para a atividade da bomba de alimentação de base entre 24 horas e 44 horas

aproximadamente. A temperatura foi constante durante a fermentação. No entanto, o pH teve uma pequena variação no momento do pulso que foi controlada rapidamente. A fermentação foi dada por terminada depois de 46,40 horas, tempo no qual não se observou atividade da bomba de alimentação de base durante 2 horas aproximadamente.

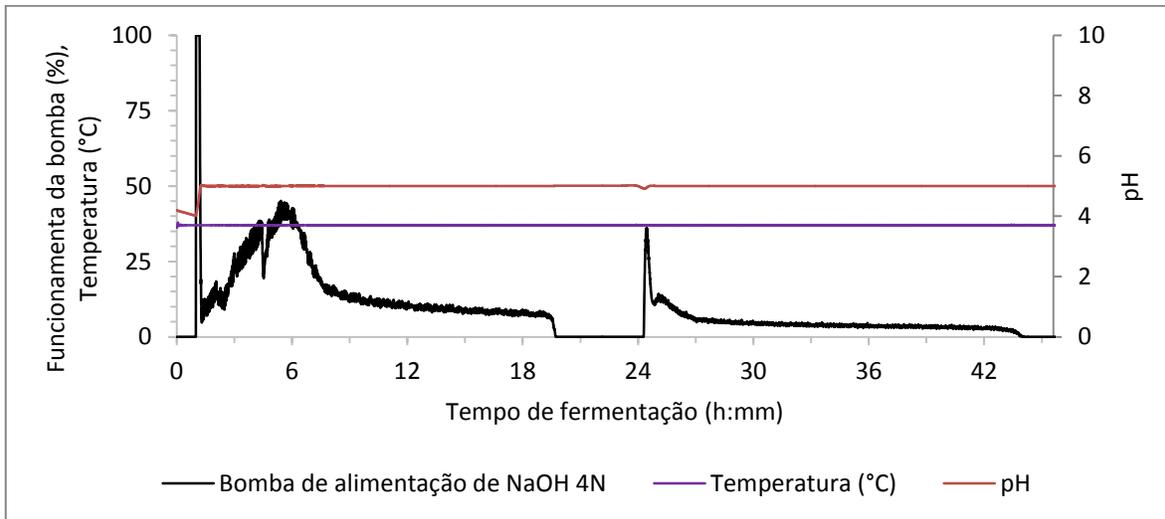


Figura 55. Monitoramento on-line da fermentação de meloço de cana-de-açúcar com *Lactobacillus plantarum*.

Os resultados da quantificação das amostras coletadas durante o tempo de fermentação são mostrados na Tabela 35 e na Figura 56.

Durante a fermentação láctea com *Lactobacillus plantarum*, observou-se alta afinidade da bactéria na fermentação de sacarose glicose e frutose, açúcares que são fermentados quase na sua totalidade, e produção do ácido láctico (Figura 56). A glicose e a frutose usadas no início da fermentação foram praticamente fermentadas nas primeiras 6 horas; e a sacarose em aproximadamente 22 horas. Intervalo no qual se obteve o máximo valor de produtividade do ácido láctico (2,86 g/L.h). Uma vez fermentados os açúcares, neste período, obtiveram-se concentrações de 0,19 g/L de sacarose, 0,15 g/L de glicose, 0,49 g/L de frutose, 3,00 g/L de biomassa e 41,46 g/L do ácido láctico; com produtividade de 1,72 g/L.h. Posterior ao pulso (24,20 h), a concentração do ácido láctico aumentou proporcionalmente ao conteúdo de açúcares adicionados. No final da fermentação (46,40 h), obtiveram-se concentrações de 0,08 g/L de sacarose, 0,12 g/L de

glicose, 1,12 g/L de frutose, 2,85 g/L de biomassa e 50,59 g/L do ácido láctico; com produtividade de 1,09 g/L.h.

Tabela 35. Resultados obtidos na fermentação láctea com *Lactobacillus plantarum*.

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/L.h)
0,00	31,26	4,53	5,56	-	0,29	-
0,00*	26,43	3,51	4,69	-	1,30	-
2,25	24,29	3,08	4,66	1,05	5,03	-
4,42	23,42	2,23	4,12	1,50	8,96	2,03
6,25	22,00	0,67	0,48	1,85	15,26	2,44
8,32	15,84	0,52	0,26	-	22,80	2,74
9,82	11,91	0,50	0,14	2,40	28,04	2,86
12,27	8,40	0,39	0,28	2,50	32,00	2,61
14,27	6,03	0,24	0,43	2,60	34,41	2,41
16,32	3,88	0,15	0,40	2,77	36,65	2,25
18,28	2,52	0,12	0,40	-	38,81	2,12
20,30	0,99	0,12	0,42	2,80	40,64	2,00
22,32	0,19	0,15	0,48	2,95	41,75	1,87
24,12	0,19	0,15	0,49	3,00	41,46	1,72
24,20**	0,20	0,15	0,48	2,80	40,92	-
25,65	2,57	0,35	0,61	3,05	41,86	1,63
27,75	5,30	0,20	0,56	3,20	43,86	1,58
30,03	5,18	0,18	0,59	3,07	44,90	1,49
31,67	4,38	0,17	0,67	3,05	45,99	1,45
33,75	3,61	0,13	0,73	2,85	46,95	1,39
35,65	2,81	0,13	0,87	2,58	47,75	1,34
37,75	1,98	0,13	0,97	2,90	48,59	1,29
39,78	1,41	0,13	1,05	3,05	49,23	1,24
41,85	0,93	0,13	1,13	2,77	50,15	1,20
43,80	0,42	0,12	1,13	2,73	50,60	1,16
45,85	0,09	0,12	1,12	2,86	50,58	1,10
46,40	0,08	0,12	1,12	2,85	50,59	1,09

\*inoculação, \*\*pulso.

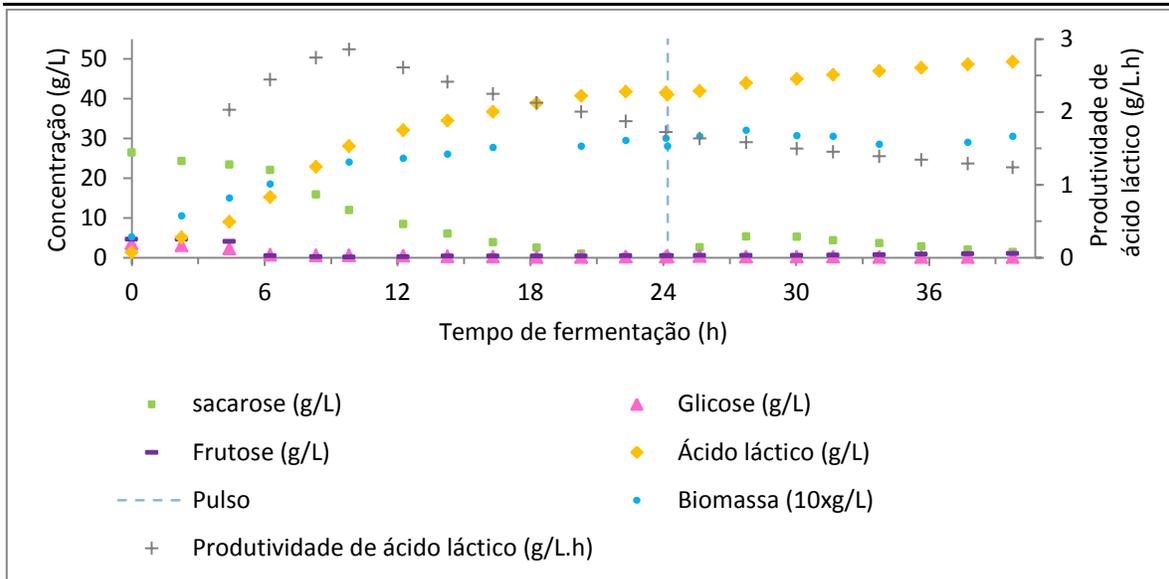


Figura 56. Resultados da fermentação láctea com *Lactobacillus plantarum* em função do tempo.

No final dos ensaios, os resultados obtidos da fermentação de melado de cana-de-açúcar com as bacterias *Lactobacillus delbrueckii* e *Leuconostoc mesenteroides* foram apresentados no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa (Apêndice C).

## 4.2 PRODUÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO

Na continuação, descrevem-se os resultados na produção do ácido acrílico a partir da desidratação dos ácidos lácticos fermentado e comercial, com catalisadores baseados em modificações de zeólita NaY, segundo a metodologia descrita no item 3 deste trabalho.

### 4.2.1 Preparação e caracterização de catalisadores

Após a modificação da zeólita comercial com nitrato de sódio e a preparação dos catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ , obtiveram-se sólidos brancos e finos como se mostra na Figura 57.



Figura 57. Catalisadores usados na desidratação do ácido láctico: a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e e)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

A análise da estrutura cristalina (Figura 58) dos catalisadores NaY comercial, NaY modificada, KBr/NaY e KI/NaY; realizada por difração de raios X permitiu identificar linhas a  $2\theta$  de  $6,0^\circ$ ;  $10,2^\circ$ ;  $11,9^\circ$ ;  $15,7^\circ$ ;  $20,4^\circ$ ;  $23,7^\circ$ ;  $27,1^\circ$  e  $31,4^\circ$  características da estrutura da zeólita NaY (RÍOS R. et al., 2012; SUN et al., 2010). Isto comprova que durante o processo de impregnação e calcinação, a estrutura cristalina da zeólita se manteve nestes catalisadores, como é reportado na literatura (YAN et al., 2011). Não obstante, no difratograma do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  essas linhas têm pouca intensidade (Figura 58) e linhas a  $2\theta$  de  $27,8^\circ$ ;  $31,04^\circ$ ;  $32,48^\circ$ ;  $34,38^\circ$  se apresentam com maior intensidade. Comportamento que pode ser devido à relação fosfato/zeólita (80:20) usada para a síntese do catalisador; como tem sido reportado por Lee *et al.* (2010) na caracterização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{SiO}_2$ .

Posteriormente, foi realizado o estudo da morfologia dos catalisadores tomando imagens microeletrônicas (Figura 59) para 4000 kv em microscópio eletrônico de varredura com detector de energia dispersiva de raios X (MEV/EDS). Imagens que permitem observar aglomerações semiesféricas na superfície dos catalisadores NaY comercial, NaY modificada, KBr/NaY e KI/NaY, o que confirma que durante a modificações feitas na zeólita NaY, a sua superfície não sofreu mudanças consideráveis. No entanto, para o catalisador  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  se observaram pequenas aglomerações semiesféricas características da superfície

da zeólita, junto com aglomerações irregulares, características do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (LEE et al., 2010).

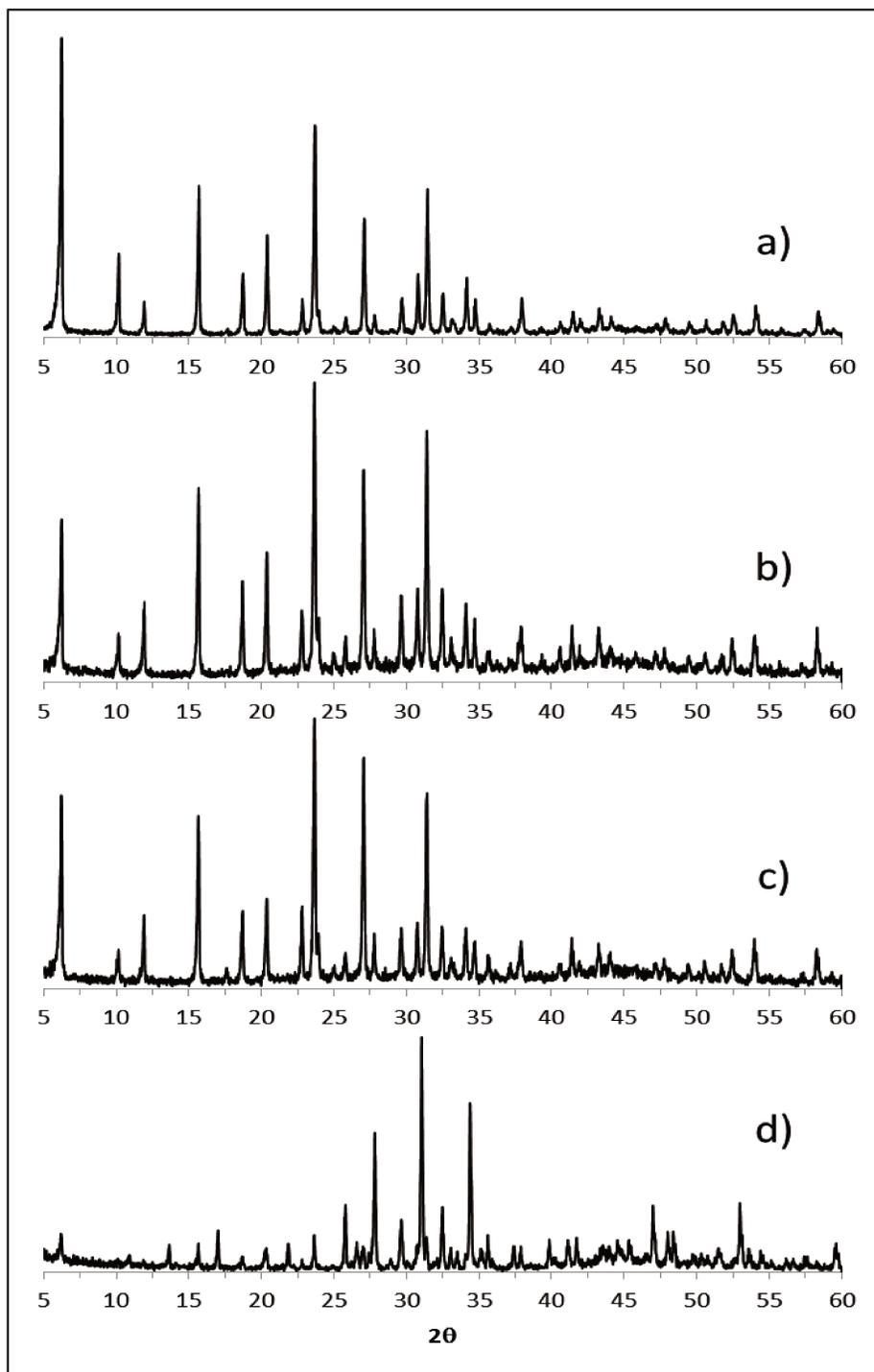


Figura 58. Difratoograma de raios X dos catalisadores: a) NaY modificada, b) KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

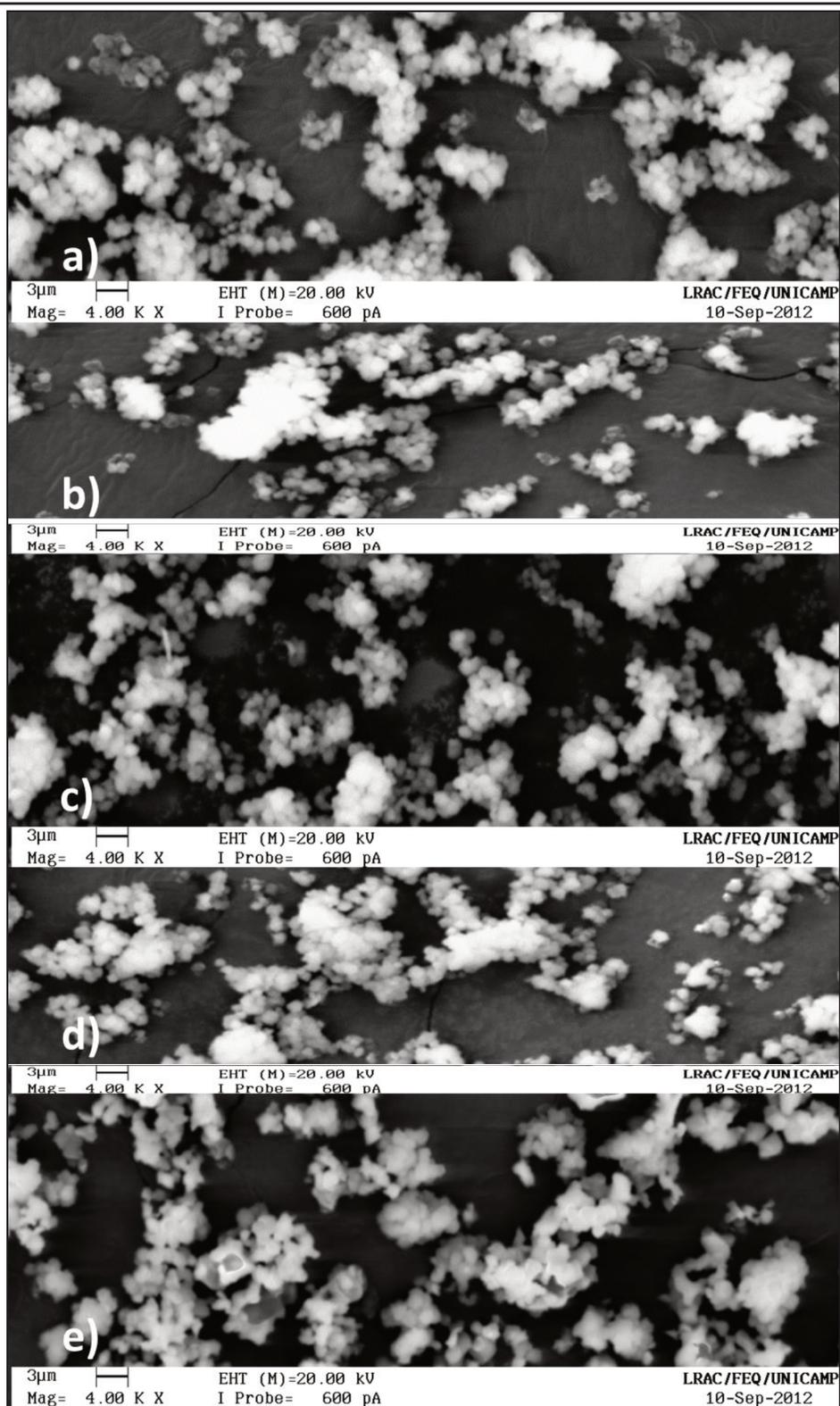


Figura 59. Imagem microeletrônica dos catalisadores: a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e e)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

Por meio das imagens microeletrônicas, se determinaram diâmetros médios de 1,28  $\mu\text{m}$ ; 1,29  $\mu\text{m}$ ; 1,23  $\mu\text{m}$ ; 1,28  $\mu\text{m}$  e 1,79  $\mu\text{m}$  para os catalisadores NaY comercial, NaY modificado, KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  respectivamente (Tabela 36). Encontrando que durante a modificação da zeólita NaY comercial para NaY modificada o tamanho da partícula foi praticamente mantida. No entanto, foi obtido menor diâmetro médio de partícula para as zeolitas NaY comercial, NaY modificada, KBr/NaY e KI/NaY em comparação com o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  (LEE et al., 2010), dita medida varia segundo o tamanho atômicos dos átomos inseridos no catalisador .

Tabela 36. Diâmetro médio de partícula dos catalisadores em  $\mu\text{m}$ .

Medição	NaY	NaY modificado	KBr/NaY	KI/NaY	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$
1	1,23	1,25	1,17	1,43	1,87
2	1,34	1,31	1,07	1,12	1,72
3	1,03	1,03	1,07	1,05	2,29
4	1,29	1,42	1,14	1,40	1,62
5	1,45	1,31	1,34	1,17	1,72
6	1,29	1,31	1,34	1,34	1,46
7	1,46	1,38	1,38	1,34	1,79
8	1,26	1,29	1,12	1,31	1,67
9	1,13	1,52	1,36	1,25	2,28
10	1,35	1,12	1,34	1,44	1,44
Med.	1,28	1,29	1,23	1,28	1,79
Desv.	0,13	0,14	0,13	0,13	0,28

A análise no microscópio eletrônico de varredura com detector de energia dispersiva de raios X (MEV/EDS), por sua vez, permitiu fazer a análise elementar dos catalisadores. Na Figura 60, apresentam-se os perfiz de EDS onde se observam os sinais característicos dos elementos O, Na, Al, Si, K, Br, I, Ca e P representativos para cada catalisador, além do C e Au presentes devido ao método usado no análise. Portanto, fica explícito que não existe a presença de outros elementos nos catalisadores, além de seus elementos representativos.

Na Tabela 37, apresenta-se a composição elementar e a relação silício-alumínio dos catalisadores aqui reportados. Dados que permitem confirmar que na síntese do catalisador NaY modificado se conseguiu um aumento de 0,14% de sódio com relação à zeólita NaY comercial. Alvo que foi proposto para aumentar a porcentagem de Na da forma iônica trocável antes do uso. Resultado que também

é apreciado na relação Si/Al a qual aumentou em 0,15%, passando de 2,75% para 2,80%. Enquanto para o conteúdo de sódio nas zeólitas que contém potássio, evidencia-se diminuição na porcentagem de sódio como consequência da substituição de íons  $\text{Na}^+$  por íons  $\text{K}^+$  mais estáveis (SUN et al., 2009).

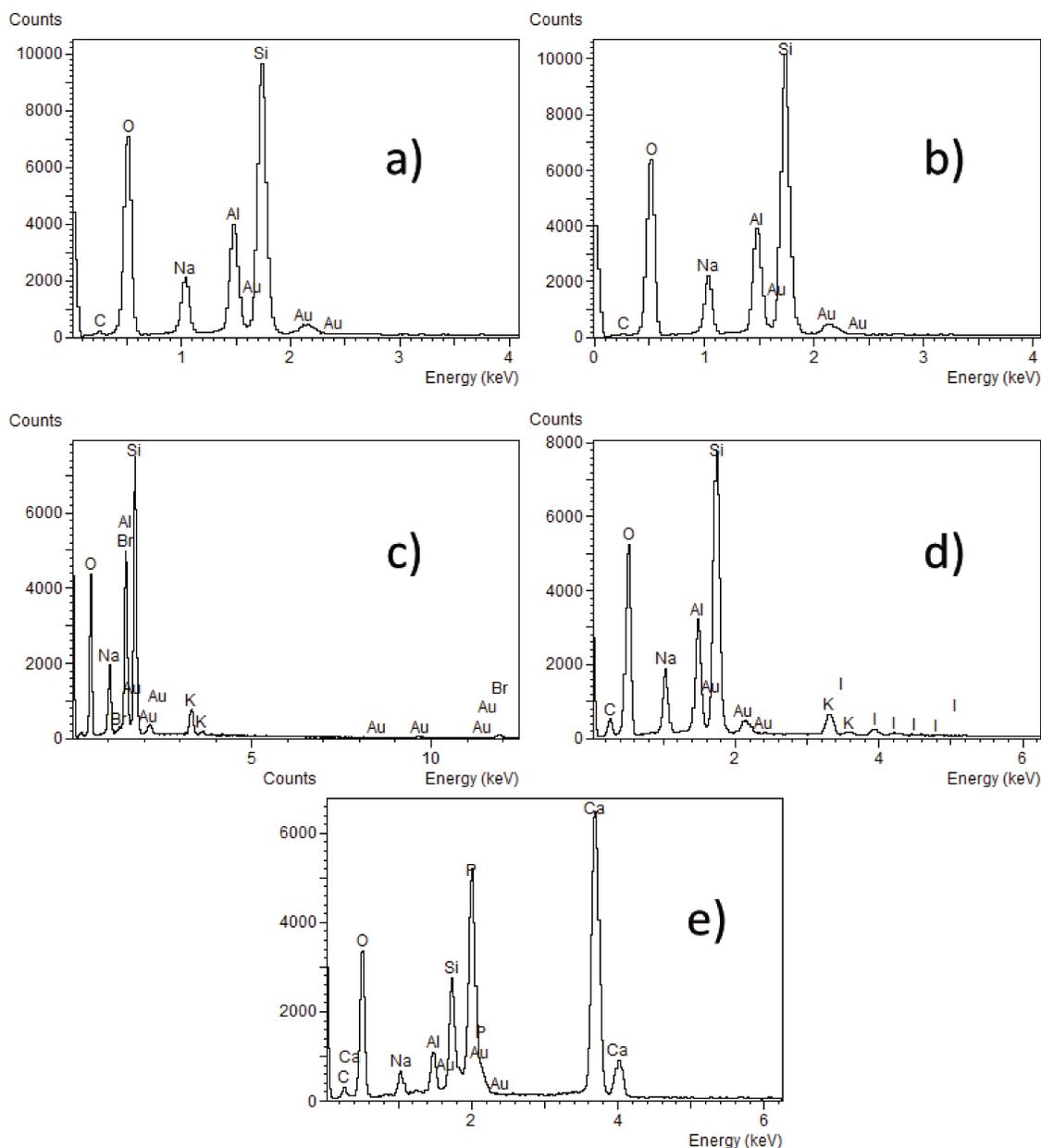


Figura 60. Perfil elemental dos catalisadores. a) NaY comercial, b) NaY modificado, c) KBr/NaY, d) KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

Tabela 37. Composição elementar dos catalisadores NaY, NaY modificado, KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

Elemento	NaY	NaY modificado	KBr/NaY	KI/NaY	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$
Na	18,50	18,64	16,03	11,87	5,15
Al	21,71	21,41	14,80	17,78	5,28
Si	59,79	59,96	49,85	57,37	12,92
K	-	-	6,19	7,25	-
Br	-	-	13,13	-	-
I	-	-	-	5,74	-
Ca	-	-	-	-	50,33
P	-	-	-	-	26,31
Si/Al	2,75	2,80	3,37	3,23	2,45

### 4.2.2 Desidratação do ácido láctico

O ácido acrílico foi sintetizado por desidratação catalítica do ácido usando catalisadores suportado em zeólita NaY (KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ ). No entanto, para avaliar os efeitos produzidos pelas condições de operação (lã de vidro, temperatura, reator, etc) na desidratação, fizeram-se ensaios sem catalisador. Mesmo assim, se realizaram ensaios com zeólita NaY comercial e zeólita modificada para avaliar o efeito da concentração de sódio da zeólita na reação. Não obstante, considerando os possíveis agentes desativantes como sais e açúcares presentes no ácido láctico fermentado, fizeram-se ensaios a priori usando ácido láctico comercial para avaliar a diferença (Figura 61).



Figura 61. Ácido láctico. a) comercial, b) obtido por fermentação.

Como resultado da pesquisa, apresentam-se a conversão do ácido láctico e seletividade para o acrílico; e os principais ácidos orgânicos obtidos como subprodutos (ácido acético e ácido propanóico). Resultados calculados como:

$$\text{Conversão de ácido láctico(\%)} = \frac{\text{moles de ácido láctico que reagem}}{\text{moles de ácido láctico na alimentação}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Selectividade(\%mol)} = \frac{\text{moles de carbono do produto definido}}{\text{moles de ácido láctico que reagem}} \times 100 \quad (3)$$

Outros subprodutos importantes (acetaldeído e 2,3-pentadiona) foram identificados por cromatografia gasosa (CG).

#### 4.2.2.1 Desidratação do ácido láctico comercial

De acordo com a metodologia reportada para a síntese do ácido acrílico e as análises feitas para a desidratação catalítica do ácido láctico fermentado, em primeiro lugar, apresentam-se os resultados da desidratação do ácido láctico comercial sem catalisador (Tabela 38, Figura 62).

Tabela 38. Desidratação do ácido láctico comercial sem catalisador.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,37	0,48	8,20	0,23	88,3
0,65	1,08	8,36	1,37	37,4
0,98	2,13	7,46	1,69	36,1
1,32	1,23	6,68	1,78	36,7
1,65	0,86	5,79	1,51	38,4
1,98	1,29	5,54	1,73	35,6
2,32	0,76	4,68	1,36	41,5
2,65	1,15	5,00	1,50	28,1
2,98	0,98	5,96	1,31	36,1

O presente ensaio permitiu observar uma rápida diminuição na conversão do ácido láctico em função do tempo. Comportamento que é causado pela instabilidade do ácido láctico nas condições de operação, incluindo temperatura do reator e componentes da lâ de vidro como óxidos de alumínio, silício, potássio e sódio, principalmente (AIDA et al., 2009; FACTORI, 2009). Mesmo assim, encontrou-se que nas condições de operação usadas na reação, a seletividade favorece para o ácido propanóico mostrando a necessidade de um catalisador seletivo para o ácido acrílico, como os suportados em zeólita básica do tipo NaY. Conseqüentemente, durante a desidratação o produto principal foi o ácido

propanóico, devido a possível hidrogenação do ácido acrílico (AIDA et al., 2009). Não obstante, a seletividade para o ácido acrílico não superou 1,78 % e para ácido acético 2,13% (Figura 62). A desidratação catalítica com zeólita NaY comercial mostrou conversões do ácido láctico de 100 % diminuindo para 83 % em 3,10 horas (Tabela 39).

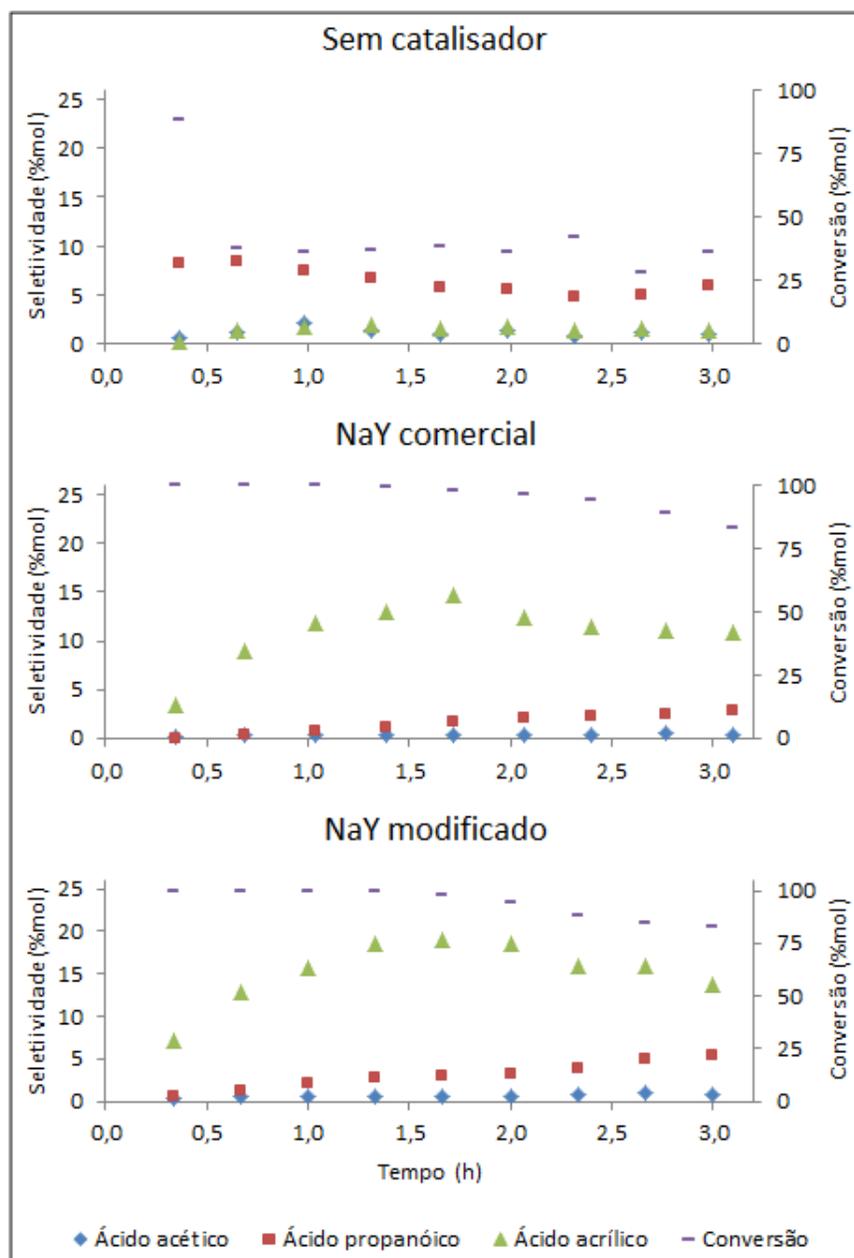


Figura 62. Desidratação do ácido láctico comercial sem catalisador, com zeólita NaY comercial e com zeólita NaY modificada.

Tabela 39. Desidratação do ácido láctico comercial com NaY comercial.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,35	0,09	0,03	3,38	100,0
0,68	0,27	0,30	9,00	100,0
1,03	0,38	0,72	11,81	100,0
1,38	0,42	1,11	13,05	99,7
1,72	0,41	1,70	14,68	97,8
2,07	0,36	1,96	12,50	96,5
2,40	0,35	2,32	11,37	94,0
2,77	0,48	2,48	11,01	89,3
3,10	0,41	2,83	10,95	83,5

Segundo SUN *et al.* (2009) e WANG *et al.* (2008), a desidratação é favorecida pelo conteúdo de óxido de silício, alumínio e sódio na zeólita, principalmente, que por sua vez favorecem a seletividade para ácido acrílico. Não obstante, esta seletividade não supera 14,68 % com desativação do catalisador depois de 1,71 horas de reação (Tabela 39, Figura 62).

Posteriormente, a desidratação foi levada a cabo usando zeólita NaY modificada (Tabela 37). Conseguindo um aumento na seletividade para ácido acrílico de 7,25 % em 0,33 horas, para 10,09 % em 1,67 horas, e diminuição para 13,65 % em 3,0 horas, enquanto as seletividades para o ácido acético e propanóico não superaram 0,9 % e 5,39 %, respectivamente, nas 3,0 horas de reação. Concordando com SUN *et al.* (2010), o aumento de sódio na zeólita é essencial para aumentar a seletividade na desidratação do ácido láctico para o ácido acrílico. No entanto, o tempo de vida útil do catalisador segue sendo um fator desvantajoso na reação (Tabela 40, Figura 62).

Avaliados os efeitos da zeólita na desidratação o seguinte passo foi avaliar o comportamento dos catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ , escolhidos, sintetizados e caracterizados segundo os reportes atuais mais relevantes na desidratação do ácido láctico e lactatos (LEE *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2010, 2011).

Tabela 40. Desidratação do ácido láctico comercial com NaY modificado.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,30	0,58	7,25	100,0
0,67	0,51	1,28	12,89	100,0
1,00	0,70	2,04	15,81	100,0
1,33	0,64	2,74	18,62	99,8
1,67	0,58	2,95	19,09	98,1
2,00	0,60	3,29	18,60	94,4
2,33	0,81	3,92	16,03	88,7
2,67	0,93	5,05	16,04	84,9
3,00	0,90	5,39	13,65	83,0

Logo, com o catalisador KBr/NaY, a seletividade foi encaminhada para a obtenção do ácido acrílico, principalmente (Tabela 41, Figura 63).

Tabela 41. Desidratação do ácido láctico comercial com KBr/NaY.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,27	0,09	4,07	99,8
0,67	0,53	0,79	11,84	99,9
1,00	0,72	1,63	18,69	99,5
1,33	0,55	1,84	22,00	98,5
1,67	1,19	3,50	25,66	94,9
2,00	0,85	3,16	23,42	89,9
2,33	0,69	3,51	23,69	86,7
2,67	0,83	3,82	22,90	82,7
3,00	0,78	4,16	22,26	77,3

As seletividades para o ácido acético e propanóico não superaram 1,19 % e 4,16, respectivamente. No entanto, a seletividade para o ácido acrílico aumentou de 4,07 % em 0,33 horas para um máximo de 25,66 % em 1,67 horas e diminuiu levemente para 22,26 % em 3,0 horas (Tabela 41). Enquanto a conversão caiu de 99,8 % em 0,33 horas para 89,9 em 3,0 horas (Figura 63).

No entanto, quando o KI/NaY foi usado como catalisador a seletividade para o ácido acrílico caiu levemente para 16,78 % 3,0 horas (Tabela 42). No entanto, a seletividade não caiu durante a desidratação. Enquanto para o ácido acético e propanóico a seletividade sempre foi baixa, não maiores a 0,87 % e 2,93 % nas 3,0 horas de reação. A conversão do ácido láctico diminuiu de 100% em

0,33 horas para 91 % em 3,0 horas (Figura 63). Embora, a seletividade com KI/NaY não caíra durante a desidratação, esta não superou a seletividade obtida com KBr/NaY (Figura 63).

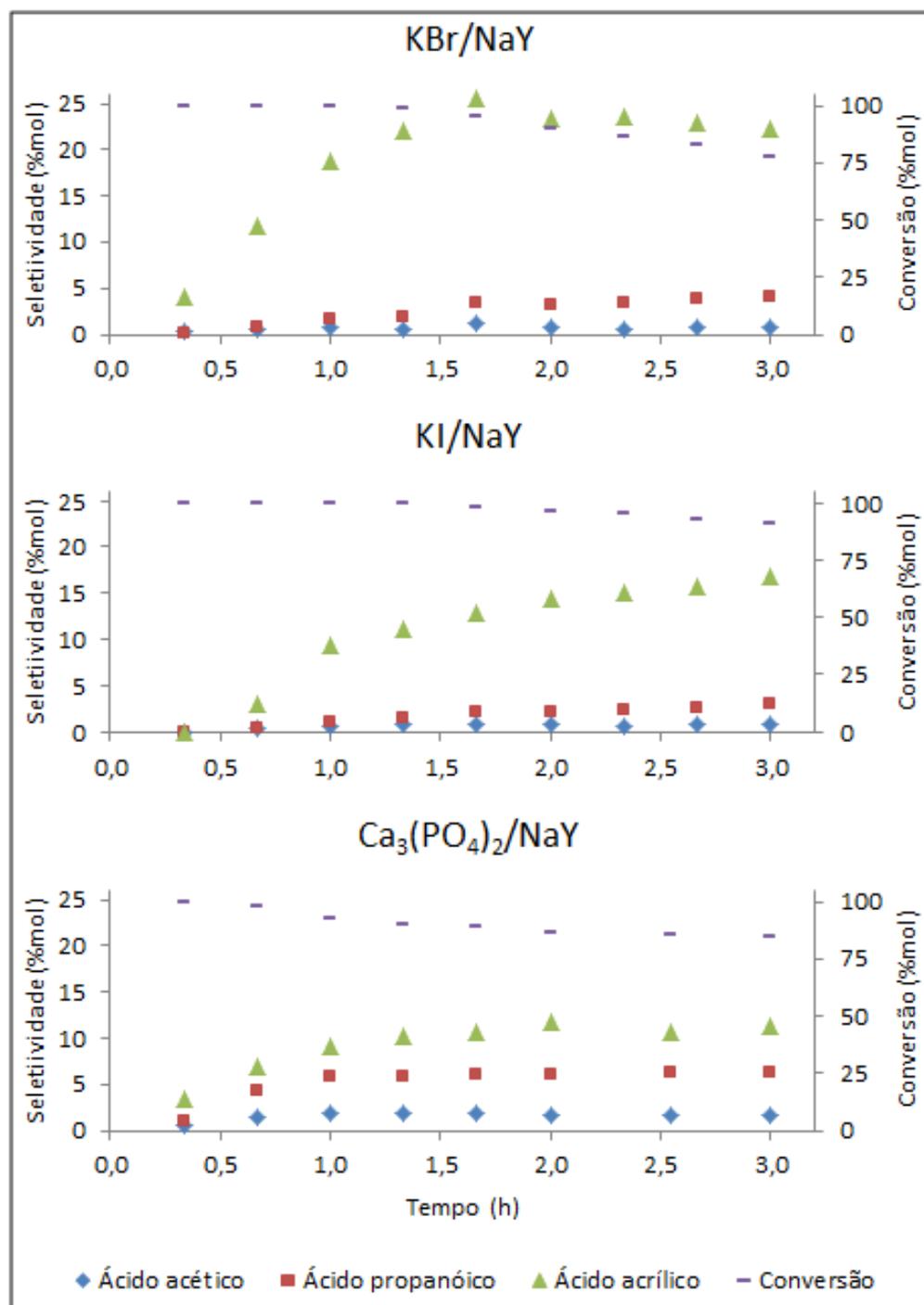


Figura 63. Desidratação do ácido láctico comercial com os catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Tabela 42. Desidratação do ácido láctico comercial com KI/NaY.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	<0,01	<0,01	<0,01	100,0
0,67	0,29	0,28	2,95	100,0
1,00	0,57	1,06	9,46	99,9
1,33	0,73	1,56	11,03	99,6
1,67	0,72	2,02	12,92	98,2
2,00	0,73	2,16	14,41	96,7
2,33	0,68	2,37	15,02	95,2
2,67	0,78	2,59	15,79	92,9
3,00	0,87	2,93	16,78	91,0

No entanto, com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ , os resultados não foram melhores (Tabela 43). A conversão do ácido láctico variou decrescentemente de 99,7 % para 84,5 % no transcurso da desidratação. A seletividade para o ácido acrílico caiu consideravelmente para um máximo de 11,74 % em 2,0 horas. No entanto, a seletividade para o ácido propanóico aumentou com o tempo com uma máxima de 6,39 %. Enquanto para ácido acético a seletividade tomou um máximo de 1,98 % em 1 hora e diminuiu para 1,69 % em 3 horas (Tabela 43, Figura 63).

Tabela 43. Desidratação do ácido láctico comercial com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,59	1,09	3,48	99,7
0,67	1,58	4,30	7,00	97,7
1,00	1,98	5,78	9,04	92,6
1,33	1,89	5,87	10,31	89,9
1,67	1,86	6,06	10,73	88,7
2,00	1,72	6,17	11,74	86,9
2,55	1,71	6,21	10,68	85,2
3,00	1,69	6,39	11,34	84,5

Segundo SUN *et al.* (2010) a seletividade dos catalisadores suportados em zeólita básica NaY esta baseada na acidez dos catalisadores, diferença que é dada pelos metais impregnados, como se observou no presente estudo.

#### 4.2.2.2 Desidratação do ácido láctico obtido da fermentação

Como se apresentou anteriormente, na desidratação do ácido láctico comercial os melhores resultados foram obtidos com uso do catalisador KBr/NaY com seletividade para ácido acrílico máxima de 25,66 % e conversão do ácido láctico maior a 77,3 %. No entanto, o mesmo procedimento foi realizado na desidratação do ácido láctico obtido por fermentação, já que por ser obtido do melaço de cana-de-açúcar e não ser puro; diversos resíduos da fermentação como sais e açúcares podem levar à desativação do catalisador e mudanças no seu desempenho.

Portanto, em primeiro lugar, avaliou-se o efeito produzido pelas condições de operação; posteriormente se avaliou o desempenho dos catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

A desidratação do ácido láctico, obtido por fermentação, sem catalisador mostrou similar seletividade para o ácido acético e propanóico, em torno de 5 % (Tabela 44, Figura 64).

Tabela 44. Desidratação do ácido láctico fermentado sem catalisador.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	5,15	4,01	0,95	98,8
0,67	4,50	4,79	2,00	96,6
1,00	4,21	5,48	3,13	92,3
1,33	4,10	5,94	4,82	89,3
1,67	5,25	6,58	6,46	85,3
2,00	4,63	5,49	7,53	84,5
2,33	4,48	5,37	7,80	82,1
2,67	4,66	5,42	8,71	80,9
3,00	4,72	5,59	7,70	79,0

No entanto, para o ácido acrílico a seletividade teve um leve incremento em função do tempo de 0,95 % para 8,71 % nas primeiras 2,67 horas; e uma pequena queda para 7,70 % em 3,0 horas de reação. Por outro lado, a conversão virou de 98,8 % em 0,33 horas para 70,9 % em 3,0 horas. Conversão que foi alta, levando em conta que durante a desidratação não se usou catalisador (Figura 64).

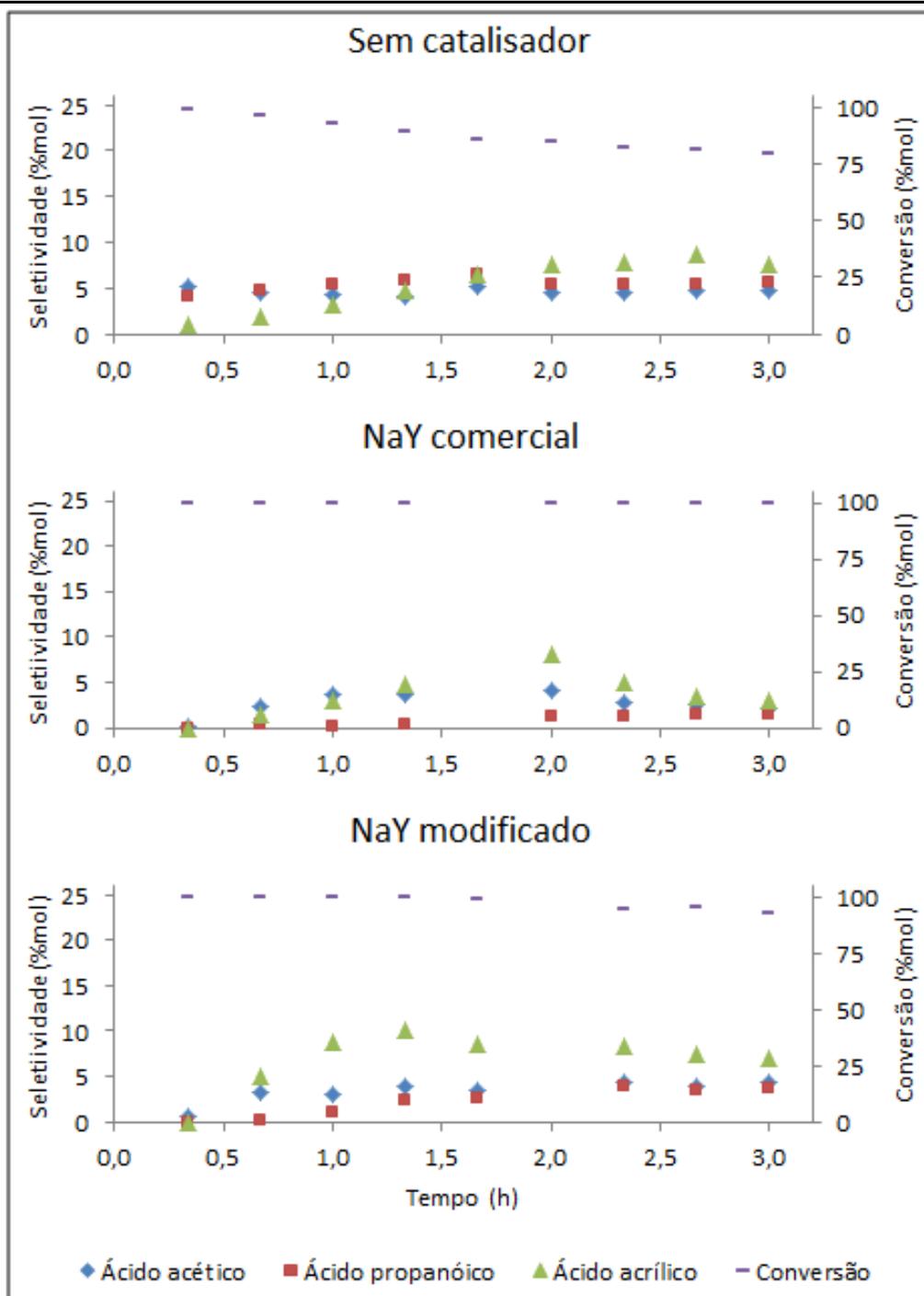


Figura 64. Desidratação do ácido láctico, obtido por fermentação, com zeólita NaY comercial e com zeólita NaY modificada.

Comparando-se os resultados com os obtidos quando foi usado o ácido láctico comercial, pode-se dizer que este efeito é produzido principalmente pelas

impurezas do ácido láctico fermentado como foi suposto no início do estudo. No entanto, segundo as seletividades dos ácidos analisados, o produto principal é desconhecido. No entanto, baseados na literatura e nas análises de CG realizadas, se propõe que o produto principal poderia ter sido acetaldeído; produto que não foi quantificado porque a pesquisa não foi focada para este fim (quantificação de produtos voláteis).

Posteriormente, a desidratação com zeólita NaY comercial mostrou resultados poucos satisfatórios para a produção do ácido acrílico. No entanto, a conversão do ácido láctico foi de 100 % em todo tempo da reação, com maior seletividade do ácido acrílico (8,09 %) nas duas primeiras horas de reação (Tabela 45, Figura 64).

Tabela 45. Desidratação do ácido láctico fermentado com NaY comercial.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,06	0,00	0,00	100,0
0,67	2,38	0,48	1,40	100,0
1,00	3,60	0,13	3,07	100,0
1,33	3,65	0,34	4,90	100,0
2,00	4,10	1,20	8,09	100,0
2,33	2,70	1,19	5,00	100,0
2,67	2,50	1,42	3,45	100,0
3,00	2,09	1,53	3,00	100,0

Não obstante, com o uso de zeólita NaY modificada, a seletividade para o ácido acrílico teve um leve aumento para 10,13 % em 1,33 horas e decresce para 6,99 % em 3,0 horas (Tabela 46, Figura 64) . Por outro lado, as seletividades para o ácido acético e propanóico foram máximas para 4,41 % e 3,78 %, respectivamente. A conversação virou de 100 % para 92,5 % durante a reação. Embora se obtivesse seletividade relativamente baixa para o ácido acrílico, novamente o aumento de sódio na zeólita melhora sua seletividade para o ácido acrílico; portanto se torna um elemento fundamental para encaminhar a reação para a produção do ácido acrílico.

Tabela 46. Desidratação do ácido láctico fermentado com NaY modificado.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,55	0,00	0,00	100,0
0,67	3,36	0,14	5,00	100,0
1,00	3,02	1,09	8,71	99,9
1,33	3,83	2,28	10,13	99,5
1,67	3,39	2,49	8,60	98,5
2,33	4,33	3,99	8,30	94,3
2,67	4,00	3,50	7,50	95,0
3,00	4,41	3,78	6,99	92,5

Posteriormente, a desidratação com KBr/NaY mostrou conversão de 100 % durante toda a reação (Tabela 47, Figura 65); porcentagem que pode estar relacionado com o efeito produzido pelas impurezas do ácido láctico obtido por fermentação (Figura 61). Além disso, a seletividade para ácido acrílico que tinha sido de 25,66 % com o uso do ácido láctico comercial caiu drasticamente para um máximo de 6,54 % quando o ácido láctico fermentado foi usado (Figura 63, Figura 65). Portanto, sua atividade catalítica é fortemente desativada.

Tabela 47. Desidratação do ácido láctico fermentado com KBr/NaY.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	1,45	<0,01	<0,01	100,0
0,67	1,55	<0,01	<0,01	100,0
1,00	3,00	0,42	1,43	100,0
1,33	3,51	0,66	1,36	100,0
1,67	4,00	0,73	2,87	100,0
2,00	5,41	1,64	6,54	100,0
2,33	4,42	1,83	4,92	100,0
2,67	4,00	2,00	4,65	100,0
3,00	4,05	2,11	4,80	100,0

Por outro lado, a desidratação com catalisador KI/NaY pouco é afetada com as impurezas do ácido láctico fermentado (Tabela 48). A conversão tem um comportamento similar para quando o ácido láctico comercial foi usado, apresentando alta resistência a os agentes desativantes presentes no ácido láctico obtido por fermentação do melão de cana-de-açúcar. Apresenta uma diminuição de 100 % para 86,98 % durante a desidratação. Enquanto a seletividade teve um

incremento do 0,0 % em 0,33 horas para 16,65 % em 2,33 horas e uma leve queda para 15,73 % em 3,0 horas; 1,05 % menor que o ácido láctico comercial foi usado. Portanto, apresentou alta resistência para as impurezas. No entanto, a seletividade teve um máximo para ácido acético e propanóico de 4,05 % e 2,25 % em 2,33 horas, respectivamente (Tabela 48, Figura 65).

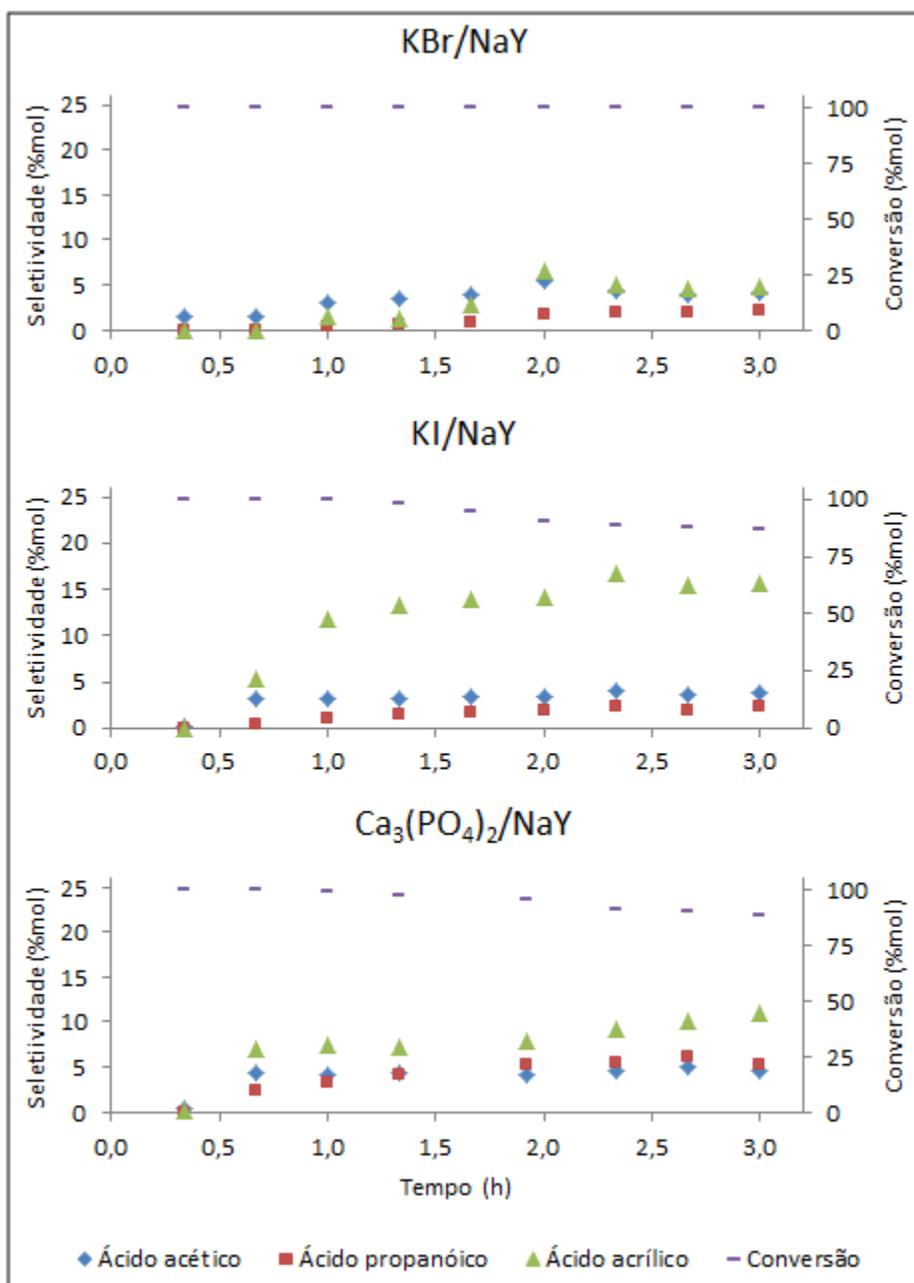


Figura 65. Desidratação do ácido láctico, obtido por fermentação, com os catalisadores KBr/NaY, KI/NaY e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Tabela 48. Desidratação do ácido láctico fermentado com KI/NaY.

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,16	0,00	0,00	100,0
0,67	3,25	0,46	5,23	100,0
1,00	3,07	1,05	11,75	99,8
1,33	3,15	1,46	13,33	98,5
1,67	3,32	1,59	14,04	95,1
2,00	3,28	1,82	14,20	90,2
2,33	4,05	2,25	16,65	88,2
2,67	3,53	1,95	15,50	87,9
3,00	3,79	2,38	15,73	86,8

Por último, a desidratação com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  mostrou resultado levemente inferior de seletividade para o ácido acrílico e conversão do ácido láctico aos obtidos quando o ácido láctico comercial foi usado. A conversão teve uma pequena queda de 100,0% para 88,3 % na reação. A seletividade foi orientada para o ácido acrílico, aumentado levemente para 11,03 % no final da reação. O ácido acético e propanóico tiveram máxima seletividade de 5,06 % e 6,02 % em 2,67 horas, respectivamente (Tabela 49, Figura 65).

Tabela 49. Desidratação do ácido láctico fermentado com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ .

Tempo (h)	% seletividade molar			% conversão molar do ácido láctico
	Ácido acético	Ácido propanóico	Ácido acrílico	
0,33	0,44	0,04	0,21	100,0
0,67	4,36	2,41	7,00	99,7
1,00	4,18	3,33	7,35	98,9
1,33	4,32	4,22	7,23	97,0
1,92	4,25	5,19	8,00	95,0
2,33	4,48	5,38	9,28	90,5
2,67	5,06	6,02	10,06	89,5
3,00	4,62	5,35	11,03	88,3

---

CAPÍTULO 5  
CONCLUSÕES E  
SUGESTÕES PARA  
TRABALHOS  
FUTUROS



## 5.1 CONCLUSÕES

Levando-se em conta os objetivos do presente trabalho, apresentou-se uma revisão bibliográfica que realça a importância da cana-de-açúcar como fonte renovável promissora na produção de ácidos orgânicos derivados do petróleo e permitiu identificar e escolher três bactérias fermentativas do ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*) segundo a isomeria do mesmo. Mesmo assim, permitiu identificar rotas de obtenção do ácido acrílico a partir do ácido láctico e selecionar três catalisadores, baseados em modificações de zeólita básica tipo NaY, promissoras na desidratação do ácido láctico.

A metodologia apresentada foi baseada em trabalhos recentes nos quais se destacam procedimentos experimentais, adequados, para a produção e caracterização do ácido láctico e ácido acrílico. Além disso, descreve a síntese e caracterização de catalisadores baseados em modificações de zeólita NaY, catalisadores que tem ganho interesse nos últimos anos na desidratação do ácido láctico. Mesmo assim, baseados na síntese e caracterização de catalisadores suportados em zeólita NaY (SUN et al., 2009, 2010; WANG et al., 2008; YAN et al., 2010, 2011) e o catalisador  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{SiO}_2$  (LEE et al., 2010), foi possível descrever a síntese e caracterização do catalisador  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$ , não reportado na literatura.

A partir da fermentação do melaço de cana-de-açúcar, com as bactérias *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*, foi possível produzir ácido láctico com concentrações de 50,22 g/L, 15,84 g/L e 50,59 g/L, respectivamente. Do mesmo modo, foram obtidas produtividades máximas de 2,52 g/L.h, 1,34 g/L.h e 2,86 g/L.h, respectivamente.

Baseado nas características físicas do ácido láctico obtido por fermentação, antes e depois da desidratação, acredita-se que a passagem do ácido por um reator tubular com recheio inerte à temperatura próxima de 300 °C e fluxo de gás

de arraste inerte; pode ser um processo viável na sua purificação. Processo que teria alto interesse na indústria.

Com base nos últimos reportes sobre desidratação do ácido láctico (Tabela 14) foi possível a síntese e posterior caracterização da zeólita NaY modificada, KBr/NaY, KI/NaY e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{NaY}$  utilizadas como catalisadores promissórios na semissíntese do ácido acrílico a partir do ácido láctico obtido da fermentação de melaço de cana-de-açúcar.

Segundo as análises de caracterização realizadas nas zeólitas, logrou-se incrementar em 0,14 % o conteúdo de sódio na zeólita NaY modificada, como também foi possível a incorporação de sais de potássio na zeólita NaY modificada, proporcionando melhor seletividade para o ácido acrílico e maior tempo de vida útil do catalisador.

Na desidratação do ácido láctico comercial, o melhor catalisador para sintetizar ácido acrílico foi o KBr/NaY com seletividade de 25,66 %. No entanto, na desidratação do ácido láctico fermentado se observou que este catalisador é fortemente desativado pelas impurezas do ácido principalmente; sendo o KI/NaY o catalisador com melhor seletividade, 16,65 %, e resistência à desativação na desidratação do ácido láctico obtido por fermentação.

Segundo os resultados obtidos, afirma-se que o melaço de cana de cana-de-açúcar é uma matéria-prima apropriada para a produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico e ácido acrílico, obtidos a partir de fontes fosseis.

## **5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Como sugestão de continuidade dos trabalhos propõe-se:

- Usar o melaço de cana-de-açúcar como uma fonte de carbono de baixo custo e de nutrientes adequadas para fermentação láctea e posterior sínteses de seus derivados químicos de maior valor agregado.

- Aumentar de modo controlado (proporcional à quantidade de microorganismos, comportamento microbiano, volume do produto retirado durante a fermentação, volume do reator e número de pulsos) o volume total da fermentação no momento de dar pulsos com o fim de aumentar a produtividade.

- Recomenda-se trabalhar com *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus plantarum* para a fermentação láctea a partir de melaço de cana-de-açúcar. No caso de usar *Leuconostoc mesenteroides*, recomenda-se usar glicose para evitar qualquer produção de dextrana e aumentar a produtividade o ácido láctico.

- Para pesquisas de desativação catalítica, recomenda-se caracterizar o catalisador logo após a desidratação e identificar os possíveis agentes desativantes como também coletar os gases gerados na reação para quantificar a produção de voláteis gerados e poder fechar o balanço de massa para poder identificar o produto majoritário da reação.

- Usar o método de impregnação na síntese de catalisadores baseados em zeólitas e incrementar seu estudo na desidratação do ácido láctico para ácido acrílico.

- Expandir as pesquisas do ácido acrílico para produção de compostos de alto valor agregado, aproveitando sua dupla função química (ácido carboxílico e alqueno) usando reações como a Diels-Alder, na qual o ácido acrílico pode ser usado como um dieno na formação de cicloaductos para posterior síntese de macromoléculas.



---

# CAPÍTULO 6

## BIBLIOGRAFIA

---

ADSUL, M. et al. Production of lactic acid from cellobiose and celotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 5055–5057, jun. 2007.

ADSUL, M. G.; VARMA, A. J.; GOKHALE, D. V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 58, 2007.

AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Árvore do conhecimento. Cana-de-açúcar.** Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_108\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html)>. Acesso em: 29 abr. 2013.

AIDA, T. M. et al. Dehydration of lactic acid to acrylic acid in high temperature water at high pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, n. 3, p. 257–264, out. 2009.

AMALRAJ, V. et al. Wild cane as a renewable source for fuel and fibre in the paper industry. **Current Science**, v. 95, n. 11, p. 1599–1602, 2008.

ANDRADE, R. **Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

AQUINO, F. W. B. et al. Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaça), rum, and whisky. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 784–793, maio. 2008.

ATALA, D. I. P. **Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

BAUER, W. Acrylic acid and derivatives. In: JOHN WILEY & SONS, INC (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

BAYONA, O. **Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

BELLO, F. **Desenvolvimento tecnológico orientado ao mercado – um estudo de caso da cadeia produtiva do ácido acrílico.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

BHATTACHARYA, P. K. et al. Ultrafiltration of sugar cane juice for recovery of sugar: analysis of flux and retention. **Separation and Purification Technology**, v. 21, n. 3, p. 247–259, jan. 2001.

---

BIOEN-FAPESP. **Program summary.** Disponível em: <<http://bioenfapesp.org/index.php/about-bioen/program-summary>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

BIOMASSA BR ENERGÍAS RENOVÁVEIS. **Biomassa.** Disponível em: <<http://www.biomassabr.com/bio/resultadonoticias.asp?id=1756>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862–4874, jul. 2010.

BURGOS-RUBIO, C. N.; OKOS, M. R.; WANKAT, P. C. Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 3, p. 305–314, 2 jun. 2000.

CALABIA, B. P.; TOKIWA, Y. Production of d-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1329–1332, 31 maio. 2007.

CAZETTA, M. L. et al. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 15, p. 2824–2828, nov. 2007.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. S. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2009.

CHAUHAN, M. K. et al. Life cycle assessment of sugar industry: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 7, p. 3445–3453, set. 2011.

COELHO, L. F. et al. D(–)-Lactic acid Production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different Carbon and nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1160–1171, 1 mar. 2011.

CTBE. **Programa de pesquisa básica.** Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br/interna/index.php?pg=ODY=1%20of%20210/22/2012%2010:24%20PM>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1831–1836, jan. 2011.

DANNER, H.; BRAUN, R. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. **Chemical Society Reviews**, v. 28, n. 6, p. 395–405, 1999.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies — a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1119–1129, jul. 2006.

DUMBREPATIL, A. et al. Utilization of molasses Sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 333–335, 2 nov. 2007.

ESTELA, W. et al. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. **Revista Peruana de Biología**, v. 14, n. 2, p. 271–275, 2007.

FACTORI, I. **Processamento e propriedades de compósitos de poliamida 6.6 reforçada com partículas de vidro reciclado**. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.

FAN, Y.; ZHOU, C.; ZHU, X. Selective catalysis of lactic acid to produce commodity chemicals. **Catalysis Reviews**, v. 51, n. 3, p. 293–324, set. 2009.

FAOSTAT. **Sugar cane**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

FAPESP-BRASKEM. **Convênios e acordos de cooperação**. Disponível em: <<http://www.fapesp.br/3094>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO. **Coleção de culturas**. Disponível em: <[http://fat.org.br/colec\\_culturas/](http://fat.org.br/colec_culturas/)>. Acesso em: 16 abr. 2013.

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

GHORBANI, F. et al. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v. 36, n. 2, p. 503–509, fev. 2011.

GIMENES, A. P. **Produção de gás de síntese a partir da glicerina**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.

GRIFFIN, G. J. The effect of fire retardants on combustion and pyrolysis of sugar-cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8199–8204, set. 2011.

---

HASSANI, A.; YEGANI, R.; HASSANI, A. Improvement of biological penicillin production from penicillium chrysogenum using molasses as carbone source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, n. 3, p. 853–858, 2011.

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

HUANG, Z. et al. Influence of mechanical activation on the graft copolymerization of sugarcane bagasse and acrylic acid. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 10, p. 1737–1745, out. 2009.

JAMES, G. (ED.). **Sugarcane**. 2nd ed ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2004.

JÄRVINEN, M. et al. Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction. **Bioseparation**, v. 9, n. 3, p. 163–166, 2000.

JAWAD, A. H. et al. Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. **Journal of King Saud University - Science**, abr. 2012.

JOHN, R. P. et al. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 145–152, mar. 2009.

KADAM, S. R. et al. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 120–126, jan. 2006.

KARP, S. G. et al. Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, jan. 2011.

KASCAK, J. S.; KOMINEK, J.; ROEHR, M. Lactic Acid. In: REHM, H.-J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology Set**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p. 293–306.

KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1990–1995, 3 fev. 2003.

LAOPAIBOON, P. et al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1036–1043, fev. 2010.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321–328, jan. 2012.

---

LEE, J.-M. et al. Efficient dehydration of methyl lactate to acrylic acid using  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-SiO}_2$  catalyst. **Catalysis Communications**, v. 11, n. 15, p. 1176–1180, set. 2010.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. In: SINGH, O. V.; HARVEY, S. P. (Eds.). **Sustainable Biotechnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 211–228.

LI, Y. F. et al. Continuous fermentative hydrogen production from brown sugar using EGSB reactor. **Advanced Materials Research**, v. 113-116, p. 1132–1137, jun. 2010.

LIEW, M. K. H.; TANAKA, S.; MORITA, M. Separation and purification of lactic acid: Fundamental studies on the reverse osmosis down-stream process. **Desalination**, v. 101, n. 3, p. 269–277, jun. 1995.

LIMA, M. et al. Morfogênese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 73–77, 2001.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3367–3374, dez. 2007.

LIU, B. et al. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2-3, p. 212–219, nov. 2010.

LIU, S.; HAN, Y.; ZHOU, Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 643–651, abr. 2011.

LU, Z. et al. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3642–3648, maio. 2010.

LUNELLI, B. **Produção e controle da síntese do éster de ácido acrílico através da fermentação do ácido láctico**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.

LUNELLI, B. H. et al. A new process for acrylic acid synthesis by fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 487–499, abr. 2007.

LUNELLI, B. H. et al. Production of Lactic Acid from Sucrose: Strain Selection, Fermentation, and Kinetic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 227–237, 2010.

---

MACIEL FILHO, R. **RELATÓRIO II – PITE FAPESP/BRASKEM PROCESSO FAPESP Nº 2008/03694-5**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

**Maravilhoso Mundo da Nutrição: Sabor Doce**. Disponível em: <<http://maravilhosomundodanutricao.blogspot.com.br/2011/01/sabor-doce.html>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MARINOVA, M. et al. Separation of tartaric and lactic acids by means of solvent extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 37, n. 3, p. 199–207, jul. 2004.

MAYO, B. et al. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (Eds.). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 3–33.

MELAÇOS BRASILEIROS. **Especificações técnicas. Especificação melão de cana líquido**. Disponível em: <<http://www.melacos.com.br/especificacoes-tecnicas.html>>. Acesso em: 29 abr. 2013.

MOON, S.-K.; WEE, Y.-J.; CHOI, G.-W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 155–159, ago. 2012.

MORONI, A. V.; ARENDT, E. K.; BELLO, F. D. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 497–502, maio. 2011.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, 15 ago. 2004.

NNFCC. **Lactic acid**. Disponível em: <[www.nnfcc.co.uk](http://www.nnfcc.co.uk)>. Acesso em: 18 abr. 2013.

OHARA, T. et al. Acrylic acid and derivatives. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

OUTRA MEDICINA. **As propriedades do melado**. Disponível em: <<http://www.outramedicina.com/382/as-propriedades-do-melado>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

OVIEDO, A. **Síntesis y caracterización de zeolitas tipo faujasita a partir de subproductos de la combustión del carbón por el método de fusión alcalina**. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2010.

PAIK, M.-J. et al. Chiral separation of lactic acid in culture media and cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as O-pentafluoropropionylated (S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester by achiral gas chromatography-mass spectrometry. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 7, p. 2418–2422, 20 jul. 2011.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, ago. 2000.

PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*—kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 191–199, fev. 1999.

PRWEB. **Global lactic acid market to reach 367.3 thousand metric tons by 2017, according to new report by global industry analysts, Inc.** Disponível em: <[http://www.prweb.com/releases/lactic\\_acid/polylactic\\_acid/prweb9369473.htm](http://www.prweb.com/releases/lactic_acid/polylactic_acid/prweb9369473.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2013.

QIN, J. et al. Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7570–7576, out. 2010.

RABELO, S. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RAMANJOOLOO, A. et al. <sup>1</sup>H NMR quantitative assessment of lactic acid produced by biofermentation of cane sugar juice. **Spectroscopy Letters**, v. 42, n. 6-7, p. 296–304, 11 nov. 2009.

REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22–34, jan. 2008.

RENOUF, M. A.; WEGENER, M. K.; NIELSEN, L. K. An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1144–1155, dez. 2008.

RÍOS R., C. A. et al. A NaY zeolite synthesized from Colombian industrial coal by-products: Potential catalytic applications. **Catalysis Today**, v. 190, n. 1, p. 61–67, ago. 2012.

SCHLOSSER, Š.; KERTÉSZ, R.; MARTÁK, J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n. 3, p. 237–266, fev. 2005.

SERNA COCK, L.; RODRIGUEZ DE STOUVENEL, A. Lactic acid fermentative production using waste from the harvest of green sugar cane as a substrate. **Interciencia**, v. 32, n. 5, p. 328–332, maio. 2007.

SHI, H. F. et al. KNaY-zeolite catalyzed dehydration of methyl lactate. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, n. 4, p. 476–478, abr. 2007.

SIGMA-ALDRICH. **lactic acid**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=lactic+acid+&lang=pt&region=BR&focus=product&N=0+220003048+219853075+219853286&mode=partialmax>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

SILVA, F. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 346–350, maio. 2011.

SILVEIRA, S. (ED.). **Bioenergy, realizing the potential**. 1st. ed. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2005.

SOLIMAN, E. M.; AHMED, S. A.; FADL, A. A. Reactivity of sugar cane bagasse as a natural solid phase extractor for selective removal of Fe(III) and heavy-metal ions from natural water samples. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 63–70, jan. 2011.

STRAATHOF, A. J. J. et al. Feasibility of acrylic acid production by fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 727–734, 26 fev. 2005.

SUN, J. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331–339, maio. 2004.

SUN, P. et al. Potassium modified NaY: A selective and durable catalyst for dehydration of lactic acid to acrylic acid. **Catalysis Communications**, v. 10, n. 9, p. 1345–1349, abr. 2009.

SUN, P. et al. NaY Zeolites Catalyze Dehydration of Lactic Acid to Acrylic Acid: Studies on the Effects of Anions in Potassium Salts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 19, p. 9082–9087, 6 out. 2010.

SUNSIRS. **Acrylic acid**. Disponível em: <<http://www.sunsirs.com/uk>>. Acesso em: 19 abr. 2013.

TEXEIRA, F.; PIRES, A.; NASCIMENTO, P. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos (Sugarcane pulp in the feeding of bovine). **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. VIII, n. 6, p. 1–9, 2007.

---

THANG, V. H.; NOVALIN, S. Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4368–4379, jul. 2008.

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugarcane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 11, p. 811–814, 18 maio. 2006.

UMEBARA, T. **Microfiltração de caldo de cana: Caracterização do caldo permeado e retentado**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

VEGGIE IN SAMPA. **Caldo de cana**. Disponível em: <<http://www.veggieinsampa.org/2012/07/caldo-de-cana.html>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

WANG, H. et al. Rare earth metal modified NaY: Structure and catalytic performance for lactic acid dehydration to acrylic acid. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 9, p. 1799–1803, maio. 2008.

WANG, L. et al. Highly efficient production of d-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1009–1017, fev. 2011.

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

WEE, Y.-J.; RYU, H.-W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4262–4270, set. 2009.

XU, Z.; ZHU, L.; CHEN, H. Acrylic Acid. In: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 201–206.

YAN, J. et al. NaY zeolites modified by La<sup>3+</sup> and Ba<sup>2+</sup>: the effect of synthesis details on surface structure and catalytic performance for lactic acid to acrylic acid. **Journal of Rare Earths**, v. 28, n. 5, p. 803–806, out. 2010.

YAN, J. et al. Alkaline earth metal modified NaY for lactic acid dehydration to acrylic acid: Effect of basic sites on the catalytic performance. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 32, n. 3-4, p. 405–411, jan. 2011.

ZHANG, H. B. et al. High-resolution GC separation of alkyl lactate enantiomers and the determination of the enantiomeric excess of the optical isomers of alkyl lactates. **Chromatographia**, v. 48, n. 3-4, p. 305–309, ago. 1998.

ZHANG, J. et al. Evaluation of catalysts and optimization of reaction conditions for the dehydration of methyl lactate to acrylates. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 263–269, abr. 2008.

ZHANG, J.; LIN, J.; CEN, P. Catalytic dehydration of lactic acid to acrylic acid over sulfate catalysts. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 86, n. 6, p. 1047–1053, dez. 2008.

ZHANG, Z. et al. Catalytic performance and characterization of silica supported sodium phosphates for the dehydration of methyl lactate to methyl acrylate and acrylic acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 20, p. 9083–9089, 21 out. 2009.

ZHAO, B. et al. Kinetics of d-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6499–6505, ago. 2010.

---

# CAPÍTULO 7

## ANEXOS



## 7.1 ANEXO A

Os resíduos gerados neste trabalho foram descartados segundo as normas da Faculdade de Engenharia Química, a qual consta do preenchimento da folha de resíduos químicos (Tabela 50) e posterior descarte por parte de uma empresa privada.

Tabela 50. Anexo A. Folha para descarte de resíduos químicos, segundo a FEQ.

RESÍDUO QUÍMICO			
Substitua está frase com o nome da sua Unidade por extenso			
Departamento:			Data ou período
Laboratório:			
Responsável pelas informações:			
Resíduo gerado na análise de:			pH =
PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO			
O RESIDUO CONTEM (preencha SIM OU NÃO para cada item)			
HALOGENADOS		PRESENÇA DE ENXOFRE OU SUBSTÂNCIAS SULFURADAS	
ACETONITRILA		GERADOR DE CIANETOS	
METAIS PESADOS		AMINAS	
COMPOSTOS (Inclusive água)			PORCENTAGEM NO RESÍDUO
ATENÇÃO: Utilize apenas 75% do volume do frasco			



---

# CAPÍTULO 8

## APÊNDICES

---

## 8.1 APÊNDICE A

Na continuação, apresenta-se o perfil cromatográfico da solução padrão (Figura 66) e as curvas de calibração do método usado na caracterização dos principais compostos da fermentação de meloço de cana-de-açúcar para ácido láctico (Figura 67 à Figura 70).

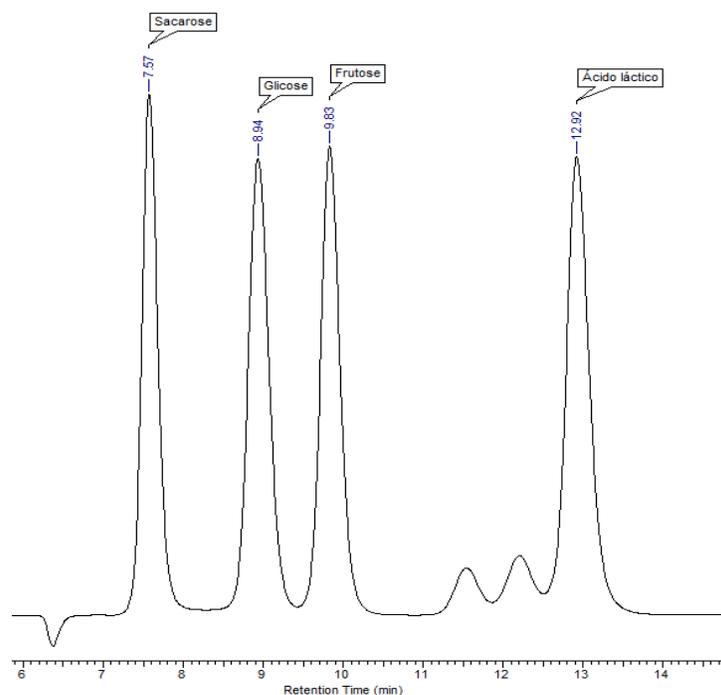


Figura 66. Perfil cromatográfico da solução padrão.

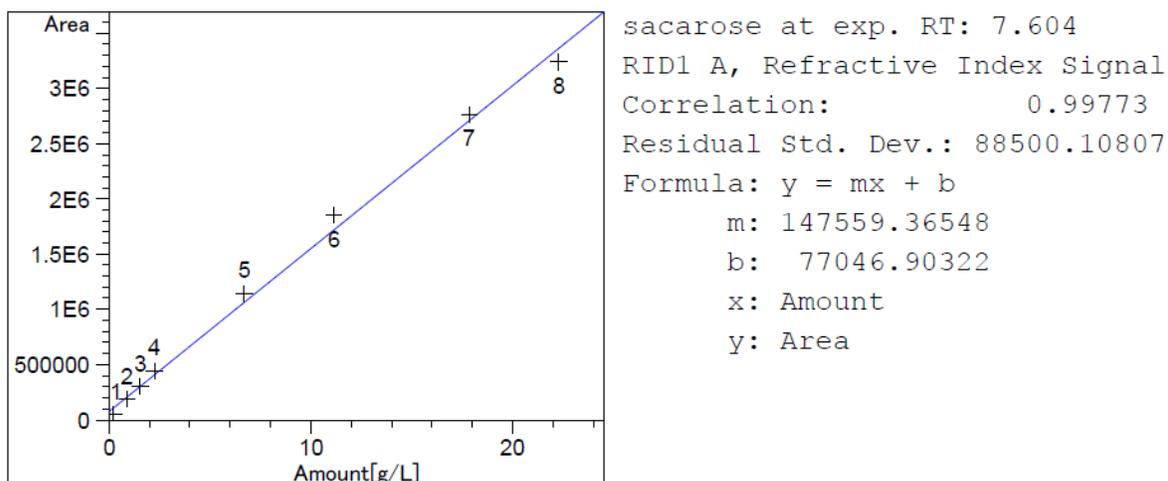
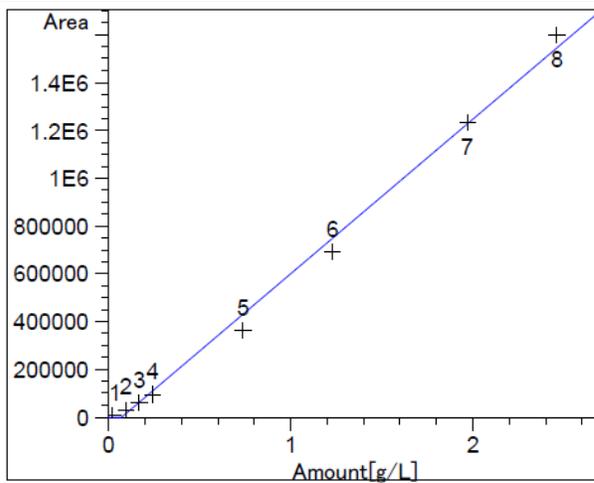
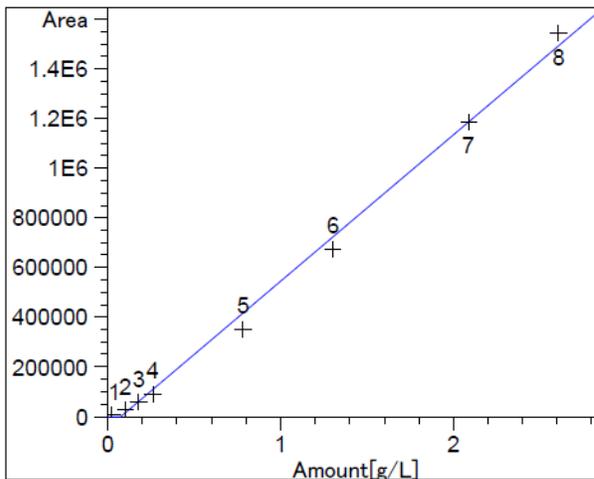


Figura 67. Curva de calibração da sacarose.



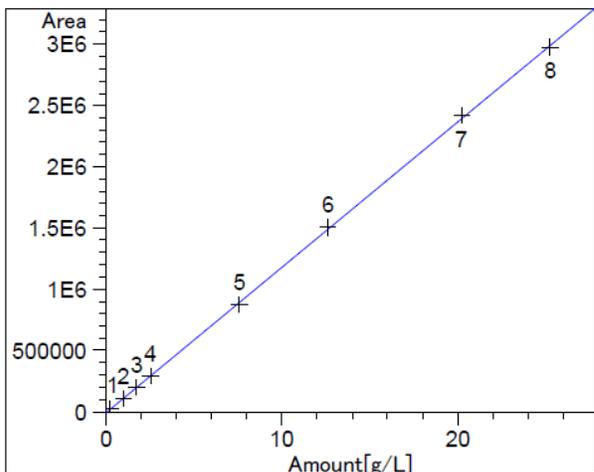
glicose at exp. RT: 8.961  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99740  
 Residual Std. Dev.: 45913.13538  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 647385.61170  
 b: -46478.19625  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 68. Curva de calibração da glicose.



frutose at exp. RT: 9.844  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99753  
 Residual Std. Dev.: 43267.53916  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 591006.36422  
 b: -45433.49683  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 69. Curva de calibração da frutose.



acido lactico at exp. RT: 12.931  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99993  
 Residual Std. Dev.: 14641.60975  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 118893.14586  
 b: -7707.00936  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 70. Curva de calibração do ácido láctico.

## 8.2 APÊNDICE B

Na continuação, apresenta-se o perfil cromatográfico da solução padrão (Figura 71) e as curvas de calibração do método usado na caracterização dos principais ácidos orgânicos da desidratação de ácido láctico (Figura 72 à Figura 75).

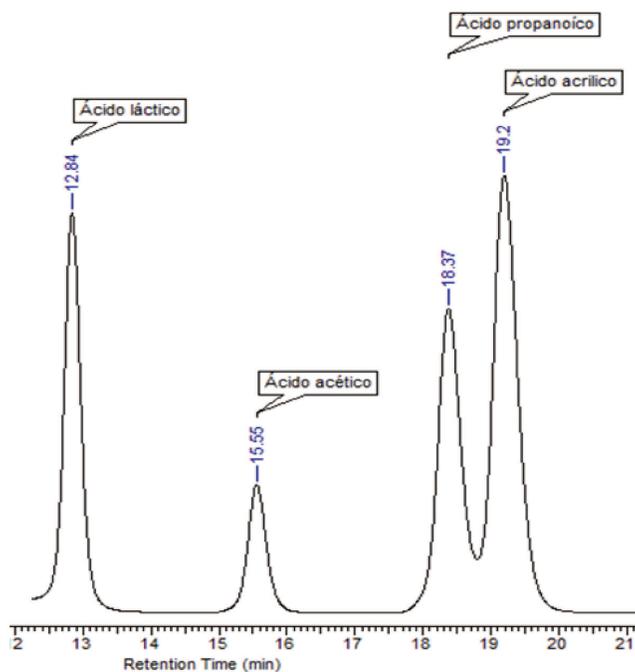


Figura 71. Perfil cromatográfico da solução padrão.

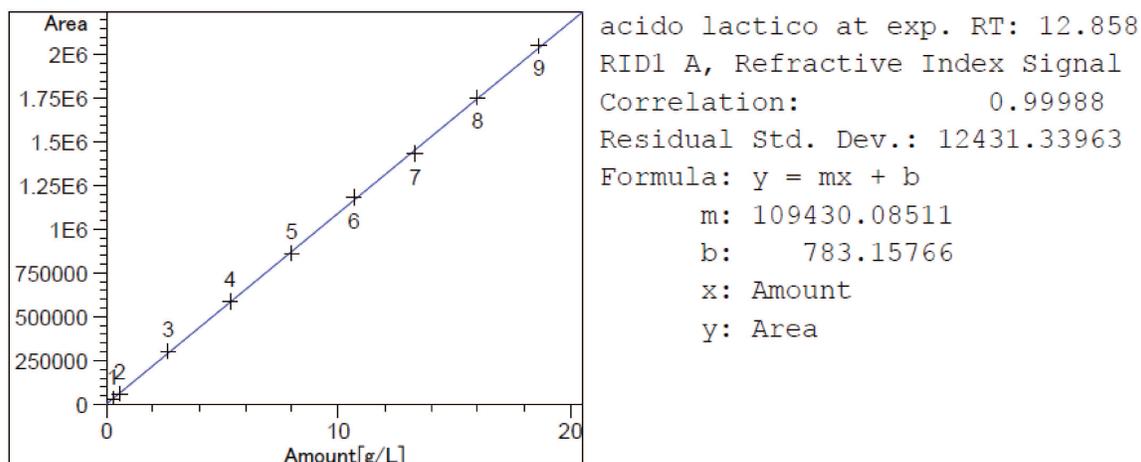
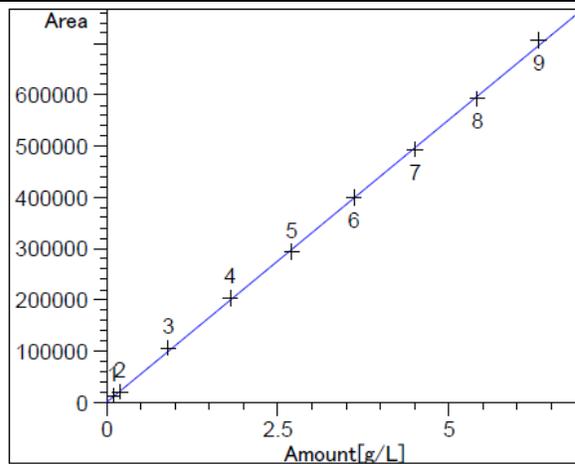
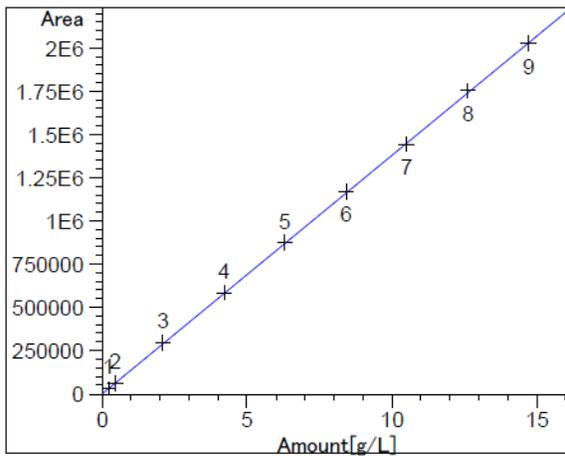


Figura 72. Curva de calibração do ácido láctico.



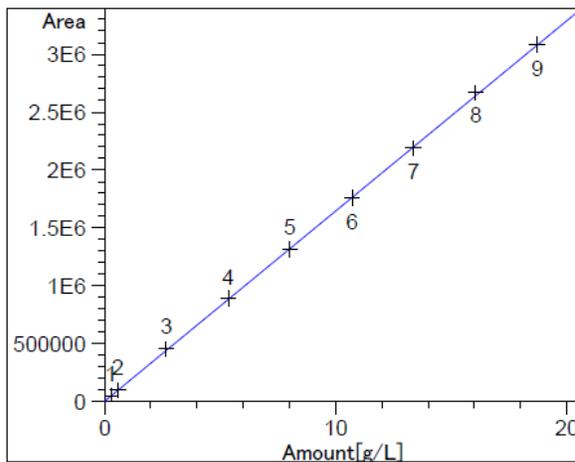
acido acetico at exp. RT: 15.549  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99982  
 Residual Std. Dev.: 5217.43250  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 110274.83376  
 b: 1072.78514  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 73. Curva de calibração do ácido acético.



acido propanoico at exp. RT: 18.326  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99997  
 Residual Std. Dev.: 6340.10167  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 138069.22707  
 b: 2558.13956  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 74. Curva de calibração do ácido propanóico.



acido acrilico at exp. RT: 19.133  
 RID1 A, Refractive Index Signal  
 Correlation: 0.99995  
 Residual Std. Dev.: 12266.70045  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 164596.31185  
 b: 1910.16381  
 x: Amount  
 y: Area

Figura 75. Curva de calibração do ácido acrílico.

## 8.3 APÊNDICE C

Trabalhos apresentados no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa.



**XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**  
X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

30 de julho-02 de agosto de 2013  
Foz de Iguaçu, PR, Brasil




**PRODUÇÃO DE D-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* CCT 4357**

J. H. BERMÚDEZ JAIMES<sup>1</sup>, B. TORRES DA SILVA<sup>1</sup>, B. H. LUNELLI<sup>1</sup>, M. R. WOLF MACIEL<sup>1</sup>, R. MACIEL FILHO<sup>1</sup>, A. T. MORITA<sup>2</sup> e P. L. A. COUTINHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química  
Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado-LOPCA

<sup>2</sup>BRASKEM

E-mail para contato: [jobhervinbermudez@gmail.com](mailto:jobhervinbermudez@gmail.com)

**RESUMO** – Nos últimos anos, o ácido láctico tem ganhado importância na produção de bio-polímeros com uso biomédico, o que tem elevado o interesse na produção de ácido láctico com características específicas sem a presença de solventes. Assim, esse trabalho teve como objetivo a produção do D-ácido láctico em fermentação batelada de melaço de cana-de-açúcar pela bactéria por *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357 durante 39,5 h em fermentador BioFlo 415, com 32,8 g/L de sacarose, 6 g/L de levedura, 32 °C, pH de 5, 200 rpm e dois pulsos de melaço de cana-de-açúcar de 221,6 g/L de sacarose à 21,6 h e 29,0 h de fermentação. No final da fermentação, obteve-se 15,8 g/L de ácido láctico com produtividade de 0,4 g/L.h.

### 1. INTRODUÇÃO

Por décadas, o ácido láctico tem apresentado excelente importância na indústria dos alimentos, têxtil, couros, farmacêutica e como matéria prima para produtos químicos renováveis, convertendo-se no ácido orgânico de maior concorrência nos últimos anos. Estima-se que a demanda do ácido láctico tem aumentado devido ao interesse nos produtos químicos eco-amigáveis e seu amplo espectro de utilização. Além disso, o ácido láctico ganha importância na síntese de bio-polímeros onde sua pureza isomérica é requerida. Neste sentido, o ácido é produzido por fermentação de matéria-prima vegetal com uso das bactérias do ácido láctico (LAB). Estas bactérias são descritas como organismos anaeróbicos facultativos, Gram (+), não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausente, exigentes quanto aos fatores nutricionais, tolerantes a ácido, estritamente fermentativas com a formação do ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar, e aceitas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para o organismo humano (Lunelli, 2010; Mayo *et al.*, 2010). Segundo o metabolismo fermentativo, são classificadas principalmente em LAB homofermentativas (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, e alguns *Lactobacillus*) e LAB heterofermentativas (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, e alguns *Lactobacillus*); nomes que foram propostos por Orla-Jensen em 1919 (Mayo *et al.*, 2010). Das LAB, a *Leuconostoc mesenteroides* é capaz de produzir D-ácido láctico a partir dos açúcares redutores do melaço de cana-de-açúcar (Coelho *et al.*, 2011), um substrato considerado resíduo agroindustrial da indústria açucareira, barato, abundante na região de São Paulo, com aproximadamente 61% de açúcares redutores (sacarose, glicose e frutose) e nutrientes essenciais para o crescimento de



LAB (Lunelli, 2010; Coelho et al., 2011). Coelho *et al.*, (2011) usaram a *Leuconostoc mesenteroides* B512 para avaliar o uso de substratos baratos (melaço, caldo de cana-de-açúcar e soro de queijo) e investigar o efeito da fonte carbono (extrato de levedura, levedura autolisada, milhocina, proteína de algodão) no meio na produção de *D*-ácido láctico.

Portanto, a pesquisa teve como objetivo principal produzir *D*-ácido láctico a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357.

## 2. METODOLOGIA

Para a produção de ácido láctico, foi usado o melaço de cana-de-açúcar, não hidrolisado, obtido da Usina Costa Pinto S.A. de Piracicaba – SP, safra 2012. A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357 foi adquirida da Fundação André Tosello.

Estudos prévios em Shaker, Marconi MA 832, foram realizados para determinar a concentração de sacarose, extrato de levedura e temperatura de trabalho, antes da fermentação em biorreator BioFlo 415. Para tanto, a *Leuconostoc mesenteroides* foi reativada em meio MRS ágar por 48 h à 26 °C. Passado esse tempo, uma alíquota foi retirada e transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MRS líquido e mantida por 48 h a temperatura de crescimento. Após esta etapa, 5 mL foram retirados do tubo e adicionados em erlenmeyer de 125 mL, com 45 mL de meio MRS líquido e, novamente, mantido nas mesmas condições durante 48 h. Na etapa final, 300 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar foram preparados em erlenmeyer contendo 14% w/v de inoculo e concentrações conhecidas de sacarose (14 g/L, 23 g/L e 33 g/L) e extrato de levedura conhecido (2 g/L, 4 g/L e 6 g/L). O próximo passo consistiu das fermentações realizadas a 29 °C, 32 °C e 35 °C durante 24 h e 200 rpm. Então, amostras de 4 mL foram coletadas nos tempos 6 h, 10 h e 24 h para acompanhar o processo.

Após estudos prévios realizados em Shaker, a fermentação foi conduzida em biorreator BioFlo 415 de 7 L nas melhores condições de temperatura e concentrações de sacarose e de extrato de levedura encontradas. A etapa se iniciou com a preparação do cultivo nas condições usadas nos estudos prévios para os três primeiros passos. O conteúdo do Erlenmeyer (50 mL) foi adicionado em outro Erlenmeyer de 1000 mL contendo 450 mL de meio MRS líquido e mantido por 30 h em Shaker na temperatura ideal. Finalmente, 2580 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar composto pelas melhores condições de concentração de sacarose e extrato de levedura foram adicionados no biorreator. O preparo do meio de fermentação se deu com a adição de 150 mL de água para evitar a concentração do substrato além da requerida, devido a perdas de vapor que ocorrem durante a esterilização. A seguir, a mistura anterior foi esterilizada a 121 °C durante 30 minutos. Após resfriamento, 420 mL de inoculo foram adicionados no biorreator a temperatura de trabalho determinada nos estudos prévios e 200 rpm, dando início a fermentação. Durante a fermentação o pH foi mantido para 5 por adição de solução 4N NaOH, e houve a adição de pulsos de 90 mL e 40 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar (221,6 g/L de sacarose), dados à 21 h e 27 h, e amostras de 4 mL foram tomadas a cada 2 h, aproximadamente.

A concentração de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico foram quantificados através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A concentração de biomassa



foi determinada por método gravimétrico e a pureza ótica do ácido láctico foi confirmada usando o kit *D*-Lactic acid/*L*-Lactic acid UV-method, Cat. No. 11 112 821 035, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos estudos prévios se determinou que as melhores condições de fermentação foram para 32 g/L de sacarose, 6 g/L de extrato de levedura e 32 °C com produção de 9,2 g/L de ácido láctico (Tabela 1). Assim, na fermentação em biorreator BioFlo 415 foram usadas essas condições. No entanto, na tentativa de evitar a concentração de substrato no biorreator além da requerida, pelas características de projeto do fermentador, na etapa de esterilização se operou com uma diminuição da concentração sacarose para 26,8 g/L. Durante a fermentação a temperatura, agitação, pH e o funcionamento da bomba de alimentação de NaOH foram monitoradas. Assim, os pulsos de solução de melado de cana-de-açúcar foram dados em momentos em essa bomba de alimentação ficou em torno de uma hora sem funcionamento.

Tabela 1. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
29	14	2	5,3	32	23	6	7,8
29	14	4	5,1	32	33	2	9,0
29	14	6	4,7	32	33	4	8,7
29	23	2	6,2	32	33	6	9,2
29	23	4	6,0	35	14	2	5,6
29	23	6	6,0	35	14	4	6,7
29	33	2	6,8	35	14	6	6,3
29	33	4	7,0	35	23	2	8,1
29	33	6	7,0	35	23	4	7,7
32	14	2	5,3	35	23	6	7,6
32	14	4	5,2	35	33	2	8,7
32	14	6	5,3	35	33	4	8,6
32	23	2	6,1	35	33	6	8,3
32	23	4	6,7	-	-	-	-

As análises das amostras da fermentação permitiram analisar o comportamento da sacarose, glicose, frutose, ácido láctico, biomassa e produtividade (Figura 1). Foi observado uma maior produtividade do ácido láctico (1,34 g/L h) nas primeiras 9 h de fermentação com concentração de 12,3 g/L. Nesse tempo, se observou diminuição na concentração de sacarose e glicose; as concentrações dos açúcares foram 1,1 g/L de sacarose, 0,4 g/L de glicose (1,1 g/L e 0,4 g/L, respectivamente), enquanto a concentração de frutose e biomassa aumentaram (13,0 g/L e 1,9 g/L, respectivamente). Em 28,5 h, após do primeiro pulso, a concentração de ácido láctico aumentou para 14,3 g/L e sua produtividade diminuiu para 0,5 g/L h. Mesmo assim, a concentração de frutose aumentou para 15,0 g/L enquanto a sacarose e a glicose são metabolizadas. Um segundo pulso foi dado e a fermentação foi mantida até 39,5 h obtendo



uma concentração final de 1,6 g/L de sacarose, 1,9 g/L de glicose, 15,6 g/L de frutose, 1,9 g/L de biomassa e 15,8 g/L do ácido láctico com produtividade de 0,4 g/L.h.

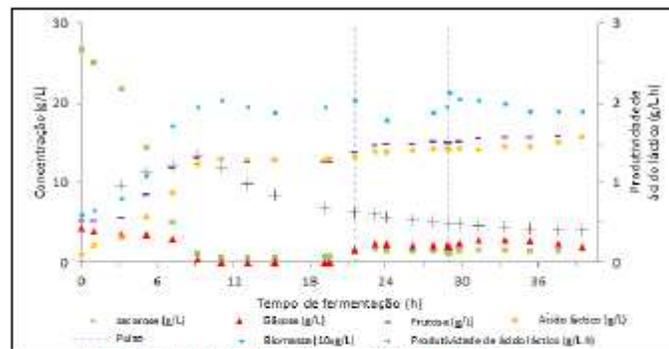


Figura 1. Comportamento da fermentação em função do tempo.

#### 4. CONCLUSÕES

Com uso da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* foi possível a produção de D-ácido láctico em concentração máxima de 15,8 g/L e produtividade final de 0,4 g/L.h. A avaliação das concentrações, durante a fermentação, permitiu notar a diminuição na concentração de sacarose e glicose e aumento na concentração de ácido láctico e frutose. Este fato sugere que, nas condições de trabalho, a *Leuconostoc mesenteroides* tem preferência para metabolizar a glicose para ácido láctico, já que se observa aumento na concentração de frutose à medida que a sacarose é metabolizada.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq e BRASKEM e FAPESP (Processo 2008/03694-5) pelo apoio financeiro.

#### 6. REFERÊNCIAS

- COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. D(-)-Lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 164, pp. 1160-1171, 2011.
- LUNELLI, B. Produção e controle da síntese do éster de ácido acrílico através da fermentação do ácido láctico. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, T.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 1ª ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, p. 3-33, 2010.



USO DA BACTÉRIA *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* CCT 3744 NA PRODUÇÃO DE L-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

B. TORRES DA SILVA<sup>1</sup>, J. H. BERMÚDEZ JAIMES<sup>1</sup>, B. H. LUNELLI<sup>1</sup>, M.R. WOLF MACIEL<sup>1</sup>, R. MACIEL FILHO<sup>1</sup>, A. T. MORITA<sup>2</sup> e P. L. A. COUTINHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química  
Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado-LOPCA  
<sup>2</sup>BRASKEM

E-mail para contato: [brunatorres@feq.unicamp.br](mailto:brunatorres@feq.unicamp.br)

**RESUMO** – Ao se considerar o desenvolvimento de produtos químicos eco-amigáveis, que tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos, é importante ressaltar a demanda e a importância do ácido láctico na indústria. Junto com seus derivados químicos, como seus biopolímeros, esses produtos formam um grupo de compostos de alto valor agregado, quando provenientes de sínteses de fontes renováveis. Esse interesse levou ao estudo da produção do L-ácido láctico via fermentativa, a partir de melaço de cana-de-açúcar. No presente trabalho, melaço de cana-de-açúcar foi fermentado pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 durante 39,7 horas em fermentador BioFlo 415 nas seguintes condições: concentração de sacarose de 32,8 g/L, concentração de levedura de 6 g/L, temperatura de 40 °C, pH igual a 5, agitação de 200 rpm e pulsos de melaço de cana-de-açúcar de 173 g/L de sacarose a 24,2 h e 29,7 h de fermentação. No final da fermentação as concentrações dos principais açúcares do melaço (sacarose, glicose e frutose) junto com o ácido láctico foram quantificadas por meio da técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo como resultado uma concentração final de 50,2 g/L de ácido láctico com produtividade de 1,26 g/L.h.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é um ácido carboxílico muito importante na indústria por ser de versátil aplicação, rentabilidade e poder ser obtido de fonte renovável. É usado na fabricação de alimentos, com uma demanda de aproximadamente 85%, sendo o restante distribuído em outros tipos de indústrias. De acordo com Rojan *et al.* (2009), nos últimos anos, o ácido láctico tem ganhado espaço na produção de produtos biodegradáveis, principalmente na síntese de polímeros para uso médico, como suturas, próteses e medicamentos controlados. Neste contexto é importante ressaltar que o uso do material polimérico, nessas aplicações, depende da isomeria do ácido láctico usado como monômero o que ressalta a importância da produção de ácido láctico via fermentativa. Isto se deve ao fato, de que em comparação com a síntese química deste ácido, a produção por meio da via fermentativa torna possível a obtenção do isômero selecionado ou de uma mistura racêmica a partir das bactérias do ácido láctico. Nesse sentido, no presente trabalho foi usada a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744, adquirida da Fundação André Tosello, uma bactéria do ácido láctico homofermentativa que apresenta bons rendimentos na produção de L-ácido láctico a partir do caldo e do melaço de cana-de-açúcar com temperatura de trabalho de 42 °C e pH de 4-6 (Dumbrepatil *et al.*, 2008; Kadam *et*



al., 2006). Outro ponto a ser considerado é que o ácido láctico pode ser obtido a partir de matéria-prima vegetal como o melão de cana-de-açúcar, considerado resíduo agroindustrial na produção de açúcar e álcool.

## 2. METODOLOGIA

O melão de cana-de-açúcar utilizado durante todos os ensaios foi obtido da Usina Costa Pinto S.A. de Piracicaba – SP, safra 2012 e estudado em sua forma não hidrolisada.

A princípio, foram realizados estudos exploratórios, a fim de se analisar as condições que favorecessem a formação do produto final de interesse. Assim, a cepa obtida da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia foi reativada em meio MRS agar por 48 horas à temperatura de crescimento, 37°C. Após esse período, uma alíquota foi retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MRS líquido. As condições anteriores foram mantidas. Depois desse tempo, 5 mL foram retirados do tubo e adicionados à um erlenmeyer de 125 mL, com 45 mL de meio MRS líquido e, mais uma vez, mantido nas mesmas condições. 300 mL de solução de melão de cana-de-açúcar foram preparados em erlenmeyer contendo 14% v/v de inoculo e concentrações conhecidas de sacarose (14 g/L, 23 g/L e 33 g/L) e extrato de levedura conhecido (2 g/L, 4 g/L e 6 g/L). Logo, a fermentação foi conduzida em Shaker, Marconi MA 832, nas temperaturas de 40°C, 43°C e 46°C durante 24 h a 200 rpm. Então, amostras de 4 mL foram coletadas nos tempos 6, 10 e 24 horas para acompanhar o processo.

A melhor condição encontrada nos estudos exploratórios foi aplicada no fermentador BioFlo 415. As primeiras três etapas foram realizadas da mesma forma do estudo prévio. Para substituir a última etapa, foi usado um erlenmeyer de 1000 mL com 450 mL de meio MRS líquido e os 50 mL, totais provenientes da fase antecedente. Os 500 mL foram mantidos em shaker a 150 rpm, por 30 horas, para compor o inoculo da fermentação. Passado esse período, foram transferidos 420 mL de inoculo em 2580 mL de meio, composto pelas melhores condições. A rotação foi estabelecida em 200 rpm, o tempo foi de 30 horas e o pH foi controlado em 5 pela adição de NaOH 4M. Um pulso de 72 mL de melão diluído foi dado com 24 horas e outro com aproximadamente 30 horas de processo com uma concentração de 173 g/L de sacarose, a fim de manter a produção do ácido. Amostras de 4 mL eram retiradas de 2 em 2 horas para acompanhar o processo.

As concentrações de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico foram quantificadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência usando um cromatógrafo Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System equipado com uma coluna Bio-Rad Amunex HPX-87H e detector de índice de refração. A concentração de biomassa foi determinada pelo método gravimétrico. A pureza ótica do ácido láctico foi confirmada usando o kit D-Lactic acid/L-Lactic acid UV-method, Cat. No. 11 112 821 035, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos estudos exploratórios se observou que as melhores concentrações de ácido láctico foram para 40 °C e 46 °C com concentrações de sacarose e extrato de levedura de 33 g/L e 6 g/L, respectivamente (Tabela 1). No entanto, a fermentação em biorreator BioFlo 415 foi



realizada a 40 °C por ser a menor temperatura. Durante a fermentação, a temperatura, a agitação, o pH e o funcionamento da bomba de alimentação da solução de NaOH foram monitorados. Assim, os pulsos de solução de melaço de cana-de-açúcar foram dados nos momentos em que se observou que a bomba de base não estava alimentando o reator.

Tabela 1. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
40	14	2	7,2	43	23	6	8,6
40	14	4	7,7	43	33	2	8,8
40	14	6	8,5	43	33	4	9,0
40	23	2	8,6	43	33	6	10,0
40	23	4	8,8	46	14	2	10,3
40	23	6	9,5	46	14	4	5,1
40	33	2	10,0	46	14	6	6,5
40	33	4	10,1	46	23	2	6,3
40	33	6	10,3	46	23	4	5,0
43	14	2	7,1	46	23	6	6,2
43	14	4	7,9	46	33	2	6,2
43	14	6	8,4	46	33	4	5,1
43	23	2	8,4	46	33	6	5,7
43	23	4	7,2	-	-	-	-

Já no início da fermentação no biorreator BioFlo 415 se observou um aumento na concentração inicial de sacarose para 43,3 g/L, erro que se apresentou devido ao projeto do biorreator 415, o qual tem perda de vapor durante a esterilização do meio fermentativo (Figura 1). Para acomodar esta característica do fermentador um procedimento operacional adequado deve ser realizado.

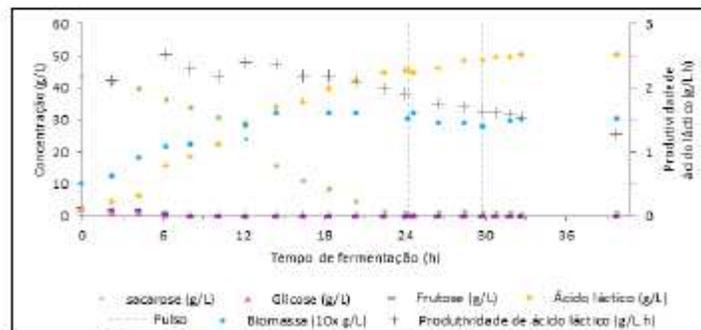


Figura 1. Comportamento da fermentação em função do tempo.



A análise das amostras tomadas durante a fermentação permitiram observar que durante as primeiras 6 horas de processo, as concentrações de glicose (0,14 g/L) e de frutose (0,71 g/L) já tinham diminuído à sua totalidade, enquanto que a concentração de sacarose (33 g/L) se mantinha constante. Isso mostra pouca preferência da bactéria pelos monômeros de açúcares. Logo após o esgotamento dos mesmos, o microrganismo começou a degradar o dímero mais rapidamente, justificado pela queda acentuada observada no gráfico, além dos dois picos máximos de produtividade observados. Portanto, é possível afirmar que o *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 é capaz de metabolizar todos os açúcares presentes em produto de interesse, pois já com esse mesmo tempo de processo, analisa-se uma considerável concentração de ácido láctico (15,51 g/L) no meio. Antes do primeiro pulso, observa-se que a produtividade estava alta, em 1,75 g/L.h, com uma concentração de 43 g/L de ácido láctico. Após os dois pulsos, com uma concentração final de 50 g/L de produto, a produtividade caiu para 1,67 g/L.h e 39,7 horas de processo. Com valores tão próximos, é viável que um tempo reduzido de fermentação, 24 horas, seja aplicado para uma produção satisfatória de ácido láctico.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificadas as condições de operação para a produção de *L*-ácido láctico usando a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 usando melão de cana-de-açúcar como meio de fermentação. Foi obtida uma concentração final de 50,2 g/L e produtividade de 1,26 g/L.h. No entanto, é tangível a redução do tempo da fermentação para 24 horas, onde se obteve uma produtividade de 1,89 g/L.h de ácido láctico. Todo o cenário sugere que, nas condições de trabalho, a *Lactobacillus delbrueckii* é capaz de metabolizar sacarose, glicose e frutose para ácido láctico.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, BRASKEM e FAPESP (Processo 2008/03694-5) pelo apoio financeiro.

#### 6. REFERÊNCIAS

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 333-335, 2008.
- KADAM, S.; PATIL, S.; BASTAWDE, K.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process. Biochem.*, v. 41, p. 120-126, 2006
- ROJAN, J.; ANISHA, G.; NAMPOOTHIRI, M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p.145-152, 2009.