

## BIOCONVERSÃO DE HIDROLISADO DA CASCA DE ARROZ A ÁCIDO LÁCTICO

Sheila Montipó<sup>1</sup>, Giovanni B. Pedroso<sup>2</sup>, Daiane B. Bevilaqua<sup>2</sup>, Carla G. B. Brenner<sup>2</sup>; Ayrton F. Martins<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS – Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS – Brasil

\*E-mail: martins@quimica.ufsm.br; ayrton@pq.cnpq.br

---

### ÁREA

Conhecimento como aliado às novas Tecnologias para otimização de processos

---

### RESUMO

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz (CA), constituem fontes renováveis, abundantes e de baixo custo, disponíveis para a biotransformação em produtos com valor agregado. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o aproveitamento da CA com vistas à sua conversão em ácido láctico (ALac), partindo-se de hidrolisados ácidos. Ao mesmo tempo, procurou-se contribuir para a mitigação do crescente problema ambiental decorrente da disposição irregular deste resíduo no estado do Rio Grande do Sul (RS), maior produtor brasileiro. Ensaio fermentativos prévios foram conduzidos com o intuito de selecionar micro-organismos resilientes e eficientes para a produção de ALac e, também, de avaliar a necessidade de suplementação do hidrolisado da CA com nutrientes específicos. Neste trabalho, *L. rhamnosus* foi a bactéria mais apropriada à fermentação láctica dentre os *Lactobacillus* testados, sendo capaz de produzir 5,6 g ALac L<sup>-1</sup>, com rendimento de 33,8 mg ALac g<sup>-1</sup> CA (hidrolisado com HCl, sem adição de nutrientes, 96 h de fermentação). A hidrólise ácida pressurizada foi feita a 160 °C, por 70 min, com 1,48% HCl v v<sup>-1</sup>, produzindo-se 14,70 g L<sup>-1</sup> de glicose.

**Palavras-chave:** Casca de arroz, hidrólise ácida, ácido láctico, otimização de processos

---

### 1 INTRODUÇÃO

Neste início de século, a combinação entre os setores econômico, tecnológico, político e de recursos humanos está impulsionando o surgimento de um mercado voltado à utilização integral das matérias-primas renováveis (biomassas) em substituição aos insumos de origem fóssil e, com isso, promovendo a sustentabilidade industrial inserida no conceito de *biorrefinaria*<sup>1,2</sup>.

A busca da sustentabilidade ambiental, em paralelo à aplicação de uma *química verde*, tem aumentado significativamente o interesse nos produtos da rota fermentativa, tal como o ALac, devido às vantagens em relação à síntese química tradicional. O aproveitamento integral e racional das biomassas lignocelulósicas poderá revolucionar segmentos industriais, englobando bioprodutos e biocombustíveis, além de energia e alimentos, trazendo grandes benefícios para países com larga

extensão territorial e elevada produtividade de biomassa, entre os quais o Brasil ocupa posição de destaque.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais são abundantes e de custo inexpressivo, quando considerados para a biotransformação em produtos com valor agregado. Segundo a FAO<sup>3</sup>, o RS é o maior produtor brasileiro de arroz, com 66,7% da produção nacional, tendo colhido 7,7 milhões t na safra 2011/2012. Após o beneficiamento do grão, cerca de 1,55 milhões t da casca foram produzidas no estado. A utilização adequada deste subproduto agroindustrial, pois, poderá contribuir para a sua valorização e economia integrada. Ademais, o uso adequado deste resíduo poderá minimizar problemas ambientais vinculados ao seu acúmulo, além de resultar em possível incremento de salário e renda no ciclo produtivo.

O ALac é um importante insumo industrial, com vasto mercado em expansão devido a sua versatilidade. Recentemente, o seu consumo aumentou consideravelmente pelo seu uso como monômero na produção de polilactato – polímero sustentável, compostável<sup>4,5</sup>. De acordo com Abdel-Rahman, Tashiroc & Sonomoto<sup>6</sup>, a produção do ALac via fermentação depende de distintos fatores, sendo o custo da matéria-prima extremamente significativo.

A CA, sugerida aqui como substrato alternativo representa uma matéria-prima promissora para a produção, p. ex., de ácidos orgânicos, fundamento importante de processos químicos industriais. Todavia, os componentes lignocelulósicos que integram a CA necessitam ser previamente separados para que as frações de celulose e hemicelulose sejam disponibilizadas, a partir de tratamentos hidrolíticos químicos ou enzimáticos, na forma de sacarídeos fermentáveis<sup>7</sup>.

Neste contexto, o presente trabalho propõe processo pioneiro para a produção de ALac - investigado em semi-micro escala – com vistas ao aproveitamento da CA como matéria-prima de baixo custo e, em consequência, contribuir para a inovação tecnológica e para a solução de problemas ambientais, segundo o conceito estratégico de *biorrefinaria*.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e padrões utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico ou superior: L(+)-ácido láctico ( $\geq 98\%$  Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); ácidos clorídrico e fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e metanol (J.T.Baker, Xalostoc, México). As soluções aquosas para a análise por HPLC foram preparadas com água ultrapura (Millipore – Direct-Q 3, Billerica, MA, EUA).

### 3.1 Pré-tratamento e hidrólise ácida da casca de arroz

A CA utilizada nos experimentos foi cedida por empresa beneficiadora de Santa Maria, RS. A CA foi, então, submetida a pré-tratamento, sendo cominuída e, em seguida, as partículas resultantes (0,288 a 0,312 mm de diâmetro) foram lavadas com água destilada e secas em estufa.

O processo hidrolítico ácido da CA pré-tratada foi feito em sistema de abertura de amostras à pressão (Berghof). Para tanto, colocou-se 1,0 g de CA, previamente tratada, em vaso de teflon, acrescido de 10 mL de catalisador ácido diluído a 1,48% ( $v v^{-1}$  de HCl). O conjunto foi acondicionado em morteiro de aço inox e aquecido a 160 °C, por 70 min. Decorrido o tempo de hidrólise, as amostras foram passadas em filtro qualitativo de 26  $\mu m$  e tratadas com 2,5% ( $m v^{-1}$ ) de carvão ativo. Em seguida, a solução foi filtrada novamente (26  $\mu m$ ) e, então, filtrada a vácuo com

membrana filtrante de nitrato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ ). O pH do hidrolisado foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 6 M e a solução estocada a 4-8  $^{\circ}\text{C}^{8-10}$ .

### 3.2 Manutenção e inóculo dos *Lactobacillus*

Distintas cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. sporoge*), bem como um co-cultivo envolvendo todas elas, foram empregadas nos experimentos com o intuito de avaliar a performance destas bactérias na produção de ALac. As culturas foram mantidas e repicadas em meio comercial Mann, Rogosa & Sharpe (MRS), sendo incubadas em estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$ , por 24 h, pH 6,2-6,5. O volume de inóculo perfaz 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados.

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

De maneira a priorizar a miniaturização dos procedimentos fez-se a etapa fermentativa em vias de 4 mL, contendo 3 mL de hidrolisado da CA, a 37  $^{\circ}\text{C}$ , em pH inicial de 6,0. O tempo de cultivo total foi de 144 h, retirando-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , periodicamente, para monitoramento da produção de ALac. As provas foram conduzidas em hidrolisados da CA puros e, também, suplementados com 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose, 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS e 1% ( $m v^{-1}$ ) de glicose mais 20% ( $m v^{-1}$ ) de meio MRS. Como os experimentos foram desenvolvidos em laboratório não-microbiológico, projetou-se caixa-de-luvas artesanal, que permitiu o manuseio adequado das bactérias lácticas<sup>9</sup>.

Dentre os *Lactobacillus* citados no item 3.2, a cepa responsável pela maior produção de ALac foi selecionada para os experimentos envolvendo a otimização de processos. Para a análise dos efeitos das variáveis lineares, foi projetado um delineamento fracionado  $2^{4-1}$  (8 experimentos) com a adição de 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, buscando a maior produção de ALac a partir da cepa selecionada. As variáveis estudadas foram: temperatura (32-42  $^{\circ}\text{C}$ ), pH (5,5-6,5), glicose (0-4,0%  $m v^{-1}$ ) e meio MRS (0-30,0%  $m v^{-1}$ ). Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 1. Utilizou-se o *software* Statistica 7.0.

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

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	32	37	42
pH	5,5	6,0	6,5
Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	0	2,0	4,0
Meio MRS (%)	0	15	30

### 3.4 Determinação da concentração de glicose e do ácido láctico

A determinação da glicose foi feita mediante método enzimático GLICOSE PAP Liquiform. A absorbância do teste foi determinada em 505 nm.

As concentrações de ALac, presentes nos fermentados, foram quantificadas via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD), em 210 nm. Para tanto, foi empregado um sistema (Shimadzu, Quioto, Japão) constituído por uma bomba quaternária LC-20AT, desgaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, amostrador automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e *software* LC Solution. Utilizou-se coluna Mediterranea sea<sub>18</sub> (150 mm x 40 mm,  $\Phi = 3 \mu\text{m}$ ) e fase aquosa água ultrapura com 0,1% ácido

fórmico; 2% de fase orgânica metanol com 1% ácido fórmico; vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>; injeção de 20 μL; modo gradiente e tempo de retenção de 5,5 min.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo hidrolítico ácido com HCl gerou 14,70 g L<sup>-1</sup> de glicose (n = 3, σ = 0,48), indicando rendimento de 88,13 mg glicose g<sup>-1</sup> CA (ou 0,88% m m<sup>-1</sup>). Como a biomassa lignocelulósica contém uma variedade de açúcares, além de glicose, é altamente vantajoso, do ponto de vista econômico, que todos estes açúcares sejam catabolizados pelo micro-organismo.

Uma vez que os requisitos nutricionais das bactérias do ALac (LABs) são complexos, critérios de suplementação do substrato formulado com hidrolisado da CA são essenciais. Deste modo, as provas iniciais foram conduzidas conforme o item 3.3. Os resultados estão evidenciados na Figura 1.

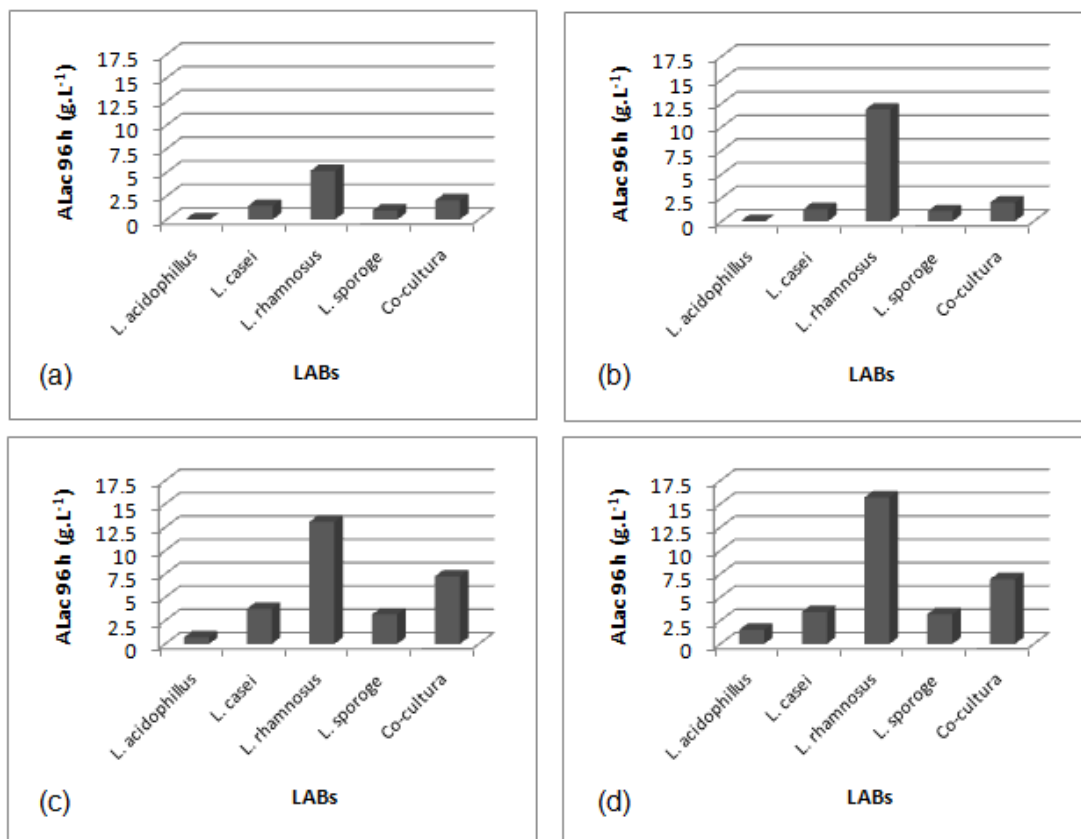


Figura 1. Desempenho de distintas bactérias produtoras de ácido láctico na fermentação conduzida a 37 °C com (a) hidrolisados clorídricos da casca de arroz e, também, (b) suplementados com 1% (m v<sup>-1</sup>) de glicose, (c) 20% (m v<sup>-1</sup>) de meio MRS e (d) 1% (m v<sup>-1</sup>) de glicose mais 20% (m v<sup>-1</sup>) de meio MRS

Como *L. rhamnosus* foi responsável pela maior produção de ALac: 5,1 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA puro; 11,8 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA suplementado com glicose; 13,1 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA adicionado de meio MRS e 15,7 g L<sup>-1</sup> em hidrolisado da CA suplementado com glicose e meio MRS, tal cepa foi selecionada para os experimentos de fermentação.

Para tanto, fez-se uso de um delineamento experimental para analisar quatro variáveis independentes importantes no processo de fermentação láctica, de acordo com o que foi descrito na sessão 3.3, tendo-se como variável dependente a concentração de ALac. Na Tabela 2 encontram-se os valores codificados dos ensaios experimentais, ressaltando que o tempo de fermentação necessário para a maior produtividade do ALac foi de 96 h.

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

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

\* C<sub>ALac</sub>= Concentração de ALac

Através do planejamento experimental, percebe-se que fermentações conduzidas com a adição de glicose e/ou meio MRS apresentaram as mais altas concentrações de ALac (experimentos 2, 3, 5-11), produzindo-se até 16,15 g L<sup>-1</sup> do produto de interesse. Percebe-se que a cepa em questão foi capaz de consumir não somente glicose, mas também alguns outros açúcares liberados na etapa hidrolítica, tal como a xilose, principalmente<sup>9</sup>. Todavia, a fermentação empregando hidrolisado com HCl diluído, mesmo sem a adição de nutrientes (experimento n° 1), produziu 5,6 g L<sup>-1</sup> de ALac, com um rendimento de 33,8 mg ALac g<sup>-1</sup> CA, correspondendo a 33,8 kg ALac t<sup>-1</sup> CA.

O estudo da matriz contida na Tabela 2 revelou informações estatísticas significativas a um intervalo de confiança de 90% (p<0,1). O modelo ajustado está disposto na Eq. 1, representando os ensaios fermentativos com hidrolisados clorídricos da CA que descrevem as concentrações de ALac preditas pelo modelos matemáticos em função das variáveis independentes já citadas, abrangendo apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos.

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

O resultado da ANOVA para o comportamento dos hidrolisados clorídricos, avaliados durante a fermentação láctica, está disposto na Tabela 3. Através da ANOVA percebe-se que, como o valor do F<sub>calc</sub> para a regressão (70,7) é significativo (p<0,1) e a porcentagem de variação explicada (r<sup>2</sup>) pelo modelo matemático foi satisfatória (96,8%), conclui-se que o modelo se ajusta adequadamente aos dados experimentais.

A Figura 2 apresenta o diagrama de Pareto para os fermentados clorídricos, contendo os valores do teste t para cada uma das variáveis independentes. As concentrações do meio MRS e de glicose, bem como o estudo da curvatura, possuem efeitos estatisticamente significativos (p<0,1) e positivos na fermentação láctica. Percebe-se que há um acréscimo no rendimento do ALac quando tais

variáveis migram do nível -1 ao nível 1. A significância da curvatura indica a necessidade da adição dos pontos axiais no planejamento em questão – procedimento este conduzido nos experimentos subsequentes.

Tabela 3. Análise de variância para o parâmetro ácido láctico

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

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

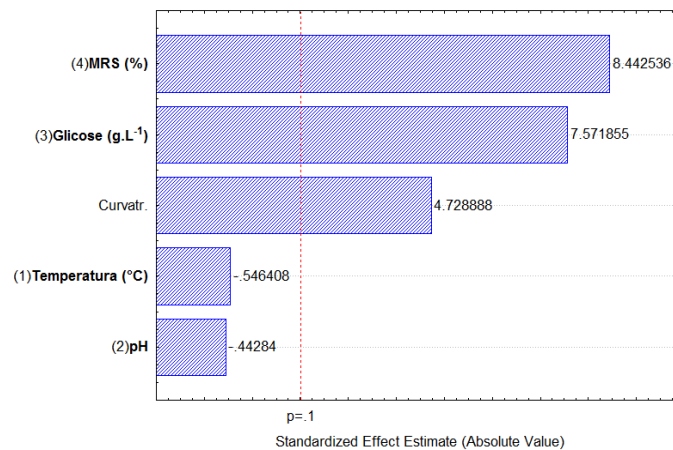


Figura 2. Diagrama de Pareto obtido do delineamento fracionado envolvendo ensaios fermentativos com *L. rhamnosus* e empregando hidrolisado clorídrico da casca de arroz, tendo como variável resposta a produção de ácido láctico

Com o intuito de otimizar a produtividade a um custo reduzido, distintas fontes alternativas de peptídeos têm sido investigadas (licor de milho, extrato de malte, caseína hidrolisada, etc.). No entanto, o extrato de levedura continua sendo o nutriente peptídico mais conveniente para as LABs<sup>11</sup>. Em condições otimizadas de fermentação láctica, empregando-se *L. rhamnosus* ATCC 10863, a literatura<sup>12</sup> reporta nova fonte de nitrogênio, promissora, capaz de substituir completamente o extrato de levedura – o farelo de soja. Tal substrato, assim como a CA, contém baixos teores de vitaminas em relação ao extrato de levedura; entretanto, o custo inferior destes meios os tornam economicamente mais atrativos para a produção de ALac.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Afora o fato de contribuir para a mitigação de sério problema ambiental no RS, o presente trabalho buscou desenvolver uma alternativa econômica-industrial para o estado, de maneira inovadora, que se insere no conceito atual de biorrefinaria.



## 6 REFERÊNCIAS

1. BOZELL, J. J. & PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – The US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, p. 539-554, 2010.
2. ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 367–375, 2008.
3. FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 22 set. 2012.
4. ROMANI, A.; YÁÑEZ, R.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4247–4254, 2008.
5. WEE, Y. J.; YUN, J. S.; PARK, D. H.; RYU, H. W. Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 71-74, 2004.
6. ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIROC, Y. & SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 286-301, 2011.
7. MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
8. BEVILAQUA, D. B.; RAMBO, M. K. D.; RIZZETTI, T. M.; CARDOSO, A. L.; MARTINS, A. F. Cleaner Production: Levulinic Acid from Rice Husks. **Journal of Cleaner Production**, 2013 (In Press).
9. MONTIPÓ, S. **Produção de ácido láctico a partir da casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2012.
10. RAMBO, M.K.D., BEVILAQUA, D.B., BRENNER, C.G.B., MARIO, D.N., ALVES, S.H., MALLMANN, C.A., MARTINS, A.F. Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. *Quimica Nova*, 2013 (In Press).
11. AMRANE, A. & PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 529-534, 1998.
12. KWON, S.; LEE, P. C.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v 26, p. 209-215, 2000.