

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ANDRÉ LUIZ VASCONCELLOS VARGAS

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E DE BIOMASSA DE *Lactobacillus plantarum* CCT
0580, UTILIZANDO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp)

VOLTA REDONDA
2016

ANDRÉ LUIZ VASCONCELLOS VARGAS

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E DE BIOMASSA DE *Lactobacillus plantarum* CCT
0580, UTILIZANDO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Freitas Branco.
Coorientador: Prof. Dr. Afonso Aurélio de Carvalho Peres.

Volta Redonda, RJ
2016

V329 Vargas, André Luiz Vasconcellos
Produção de ácido láctico e de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580, utilizando melaço da cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) / André Luiz Vasconcellos Vargas – Volta Redonda, 2016.
97 f. il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) –
Universidade Federal Fluminense.
Orientador: Ricardo de Freitas Branco.
Coorientador: Afonso Aurélio de Carvalho Peres.

1. Custos de produção. 2. Fermentação. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Sustentabilidade. I. Branco, Ricardo de Freitas. II. Peres, Afonso Aurélio de Carvalho. III Título.

CDD 664

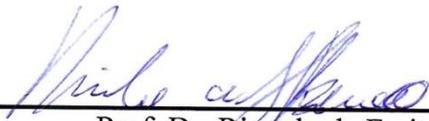
ANDRÉ LUIZ VASCONCELLOS VARGAS

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E DE BIOMASSA DE *Lactobacillus plantarum* CCT
0580, UTILIZANDO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp)

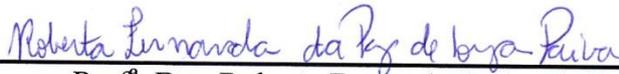
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia Ambiental da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 20 de abril de 2016.

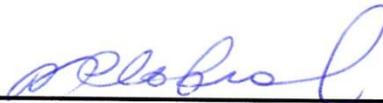
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo de Freitas Branco – UFF
Orientador



Prof.ª. Dra. Roberta Fernanda da Paz de Souza Paiva – UFF



Prof. Dr. Maulori Curié Cabral – UFRJ

A Deus. É Dele a vitória alcançada em minha vida.

Tudo é do Pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me encorajaram a concluir mais esta etapa de minha jornada.

Aos amigos e alunos por me darem forças.

Aos colegas do curso, que me enriqueceram não só com conceitos, mas com experiência, especialmente à Maria Maura, Valquíria, Adir e Leo.

Aos professores do programa, pelos questionamentos importantes para construção de meu conhecimento, especialmente à professoras Fabiana e Patrícia e ao professor Ozanan.

À secretária da PGTA, Karine, pela paciência e dedicação ao atender-me sempre ao final do expediente.

Ao meu orientador, prof. Ricardo, por ter aceitado esta proposta sem hesitar e com paciência não desistiu diante às dificuldades.

Ao meu co-orientador, prof. Lelo, por sua coragem e tranquilidade em ensinar-me um pouco sobre análise de custo e orçamentação parcial. Tenha certeza que sua colaboração foi crucial para a conclusão do trabalho.

Aos profs. Carlos Eduardo e Ana Paula, que gentilmente cederam os equipamentos e espaço de seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos membros da banca, professores Maulori e Roberta, por suas considerações relevantes, que enriqueceram o trabalho.

Aos meus pais, Roberto e Kátia, e aos meus sogros, Mario Henrique e Maria do Carmo, por terem amparado minha família nos momentos de ausência. A minha irmã, Luzieni, sempre me incentivando e ajudando quando mais precisava.

Ao meu filho caçula, João Gabriel, que ainda não entende porque precisei me dedicar tanto, mas que foi paciente e tolerante. Ao meu enteado, filho mais velho, Netinho, por entender a importância deste trabalho, respeitar-me e apoiar-me.

À minha grande esposa, Marcela, que apesar de todos os problemas continua firme ao meu lado. Sua força, paciência e amor foram meu apoio.

Finalmente, o mais importante, a Deus, por ter colocado cada um em meu caminho e em minhas lembranças.

Sem vocês, eu nada seria!

Muito obrigado!

“Enquanto acreditarmos em nossos sonhos,
Nada será por acaso.”

Henfil

RESUMO

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria açucareira rico em açúcares e outros nutrientes. Utilizá-lo como matéria prima para a fabricação de outros produtos pode ser ambientalmente e economicamente sustentável, por ser uma fonte de carbono renovável, o que já vem sendo observado, principalmente, na sua utilização na produção de etanol. Dentro do conceito de química verde, resíduos ou subprodutos de processos industriais podem servir de insumos para a fabricação de novos produtos, barateando-os e os tornando ambientalmente, economicamente e socialmente sustentáveis. Neste trabalho, estudaram-se as produções de ácido láctico e de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 utilizando fontes de carbono diferentes: glicose e melaço. O ácido láctico é um ácido orgânico com diferentes utilizações: produção de biopolímeros (polilactato), produção de alimentos (acidulante), produção de cosméticos e medicamentos. Já os *L. plantarum* CCT 0580, podem servir como probióticos, ser utilizados na produção de alimentos fermentados, na produção de antibióticos (plantaricinas). Com base nos resultados dos processos fermentativos comparados com a incubação em meio MRS, como controle, foram realizadas análises de custos utilizando a técnica de orçamentação parcial (OP), para comparar os custos operacionais efetivos (COE) encontrados na produção, em escala laboratorial, de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando as diferentes fontes de carbono. As fermentações dos açúcares por *L. plantarum* CCT 0580 foram acompanhadas por 72h, com intervalos de 24h. Os resultados mostraram a máxima concentração de ácido láctico para cada meio ao final das 72h, sendo o meio MRS mais produtivo, seguido pelo meio contendo melaço (MEL) e glicose (GLIC), respectivamente: $12,6 \pm 0,42 \text{ g.L}^{-1}$, $6,5 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,9 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$. Os COE encontrados para estas produções, em escala laboratorial, foram, respectivamente: R\$ 4,46, R\$ 0,88 e R\$ 16,36. Para as concentrações de biomassa úmida de *L. plantarum* CCT 0580, as maiores concentrações foram obtidas em tempos de fermentações diferentes, contudo, o meio MRS foi o mais produtivo, seguido novamente pelos meios MEL e GLIC, respectivamente: $16,9 \pm 3,54 \text{ g.L}^{-1}$ (48h), $7,59 \pm 0,66 \text{ g.L}^{-1}$ (72h) e $3,0 \pm 0,85 \text{ g.L}^{-1}$ (24h). Os COE por grama de biomassa produzida, em escala laboratorial, de acordo com o tempo de máxima produção, foram respectivamente: R\$ 3,34, R\$ 0,76 e R\$ 5,05. Diante dos resultados encontrados, pode-se perceber maior produção de ácido láctico e de biomassa com menor COE a partir do melaço, quando comparado com os COE a partir das produções utilizando glicose. Os resultados encontrados nas OP mostraram ser vantajosas as substituições de glicose e MRS por melaço para a produção de ácido láctico e de biomassa, independente do tempo de fermentação.

Palavras-chave: Custos de produção, fermentação, resíduos agroindustriais, sustentabilidade.

ABSTRACT

The sugarcane molasses is a byproduct of the sugar industry rich in sugars and other nutrients. Use it as raw material for the manufacture of other products can be environmentally and economically sustainable, as a renewable source of carbon, which has already been observed, especially in its use in ethanol production. In the concept of green chemistry, waste or by-products of industrial processes can serve as inputs for the manufacture of new products, cheapening them and making them environmentally, economically and socially sustainable. In this work, lactic acid production and biomass *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 were studied using different carbon sources: glucose and molasses. Lactic acid is an organic acid with different uses: biopolymers (polylactate), food production (acidulant), production of cosmetics and drugs. Since the *L. plantarum* CCT 0580 can serve as probiotics, to be used in the production of fermented foods, in production of antibiotics (plantaricin). Based on the results of fermentative processes, compared to incubation in MRS, as control, cost analyzes were performed using the partial budgeting technique (PB), to compare the effective operating costs (EOC) found in lactic acid and biomass *L. plantarum* CCT 0580 productions, in laboratory scale, using different carbon sources. Fermentation of sugars by *L. plantarum* CCT 0580 were accompanied by 72h, 24h intervals. The results showed maximum concentration of lactic acid to each medium in 72 hours, being the most productive MRS medium followed by media containing molasses (MEL) and glucose (GLIC), respectively: $12,6 \pm 0,42 \text{ g.L}^{-1}$, $6,5 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,9 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$. The EOC found for these productions, in laboratory scale, were: R\$ 4,46, R\$ 0,88 e R\$ 16,36. For wet biomass concentrations of *L. plantarum* CCT 0580, higher concentrations were obtained at different fermentation times, however, the MRS medium was the most productive, followed again by MEL and GLIC mediums, respectively: $16,9 \pm 3,54 \text{ g.L}^{-1}$ (48h), $7,59 \pm 0,66 \text{ g.L}^{-1}$ (72h) e $3,0 \pm 0,85 \text{ g.L}^{-1}$ (24h). The EOC per gram of biomass produced in laboratory scale, according to the time of maximum production, were as follows, respectively: R\$ 3,34, R\$ 0,76 e R\$ 5,05. Considering the results, there was increased production of lactic acid and biomass with lower EOC from molasses compared to the EOC from productions using glucose. The results found in PB proved advantageous glucose and MRS substitutions for molasses to lactic acid and biomass productions, irrespective of the fermentation time.

Keywords: Agro-industrial waste, fermentation, production costs, sustainability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Proporções das agroindústrias de cana-de-açúcar no Brasil.....	24
Figura 2	Proporções das produções de energia por categoria de insumos no Brasil em 2014.....	24
Figura 3	Matriz elétrica brasileira, evidenciando as proporções das utilizações das fontes energia elétrica.....	25
Figura 4	Ecosistema industrial evidenciando a dependência dos “organismos” envolvidos: indústrias açucareira, alcooleira e sucroalcooleira.....	26
Figura 5	Relação filogenética de <i>Lactobacillus plantarum</i> em relação a outras Bactérias de Ácido Láctico (LAB).....	28
Figura 6	Vias metabólicas de oxidação anaeróbica da glicose. (A) homofermentativa e (B) heterofermentativa com formação de etanol e/ou acetato.....	30
Figura 7	Vias de conversão de lactato em acetato por <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
Figura 8	Exemplos de produtos comercializáveis como probióticos compostos por <i>Lactobacillus plantarum</i>	34
Figura 9	Alimentos em conserva contendo <i>Lactobacillus plantarum</i> . A fotografia a esquerda refere-se à conserva de azeitonas.....	35
Figura 10	Fotografia de um frasco de melão comercial.....	36
Figura 11	Utilização do melão da cana-de-açúcar em diferentes segmentos, em sentido horário: agropecuária, alimentos, papel e celulose, fundição e cerâmica.....	39
Figura 12	Via de Embden–Meyerhof Parnas com as reações adicionais para a formação de etanol.....	41
Figura 13	Melão na cadeia produtiva de etanol anexado à produção de açúcar, indústria sucroalcooleira.....	42
Figura 14	Melão na cadeia produtiva de etanol em usina alcooleira.....	43
Figura 15	Projeções de Fischer dos isômeros L(+) e D(-) da molécula de ácido láctico.....	44
Figura 16	Utilização do polilactato na indústria médica, exemplificada pelo fio de sutura (imagem superior à direita) e um <i>stent</i> (imagem inferior à direita), e na indústria de plásticos e embalagens biodegradáveis (imagem à esquerda).....	48
Figura 17	Exemplos de alimentos que contém ácido láctico como acidulante.....	49
Figura 18	Produtos cosméticos e de higiene pessoal com ácido láctico em suas constituições.....	49
Figura 19	Consumo de açúcares redutores por <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 no meio MEL em relação ao tempo de fermentação.....	67
Figura 20	Correlação entre o consumo de açúcares redutores (AR) e as produções de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 (X) e de ácido láctico (P) nos diferentes meios testados: GLIC (A), MEL (B) e MRS (C). Em incubação de 35°C sem agitação. Em destaque, a concentração inicial de biomassa (0,1 g.L ⁻¹), evidenciando não se tratar de geração espontânea em todas as culturas testadas.	69

Figura 21	Intervalos de tempo de maior produção de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 de acordo com os meios de cultura GLIC, MEL e MRS.....	74
Figura 22	Custos operacionais efetivos obtidos para a produção de ácido láctico nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação.....	77
Figura 23	Custos operacionais efetivos obtidos para a produção de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação.....	82
Figura 24	Ecossistema industrial das indústrias sucroalcooleiras com a possível inclusão das indústrias de ácido láctico e/ou de probióticos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de bacteriocinas.....	32
Tabela 2	Espectro de ação antimicrobiana de plantaricina 163.....	33
Tabela 3	Concentrações de açúcares encontrados em melaços utilizados em trabalhos diferentes.....	37
Tabela 4	Vantagens e desvantagens dos principais processos fermentativos utilizados na produção de ácido láctico.....	46
Tabela 5	Relação dos micro-organismos utilizados em processos fermentativos para obtenção de seus respectivos isômeros de ácido láctico.....	47
Tabela 6	Valores médios das concentrações de açúcares redutores (AR), ácido láctico (ácido láctico) e biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 (<i>L. plantarum</i>) em g.L ⁻¹ de acordo com os tempos de fermentação a 35°C sem agitação.....	71
Tabela 7	Variação do pH nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação.....	71
Tabela 8	Produtividades médias de ácido láctico (Qp) e de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 (Qx) em g.L ⁻¹ .h ⁻¹ e rendimentos médios da conversão de açúcares redutores em ácido láctico (Yp/s) e em biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 (Yx/s) em g.g ⁻¹ ao final de 72h em incubação a 35°C sem agitação nos meios GLIC, MEL e MRS.....	73
Tabela 9	Custos operacionais efetivos para a produção, por grama, de ácido láctico em laboratório de acordo com os meios de cultura testados (GLIC, MEL e MRS).....	79
Tabela 10	Composição dos custos operacionais, em porcentagem (%), da produção de ácido láctico, de acordo com os meios de cultura testados: GLIC, MEL e MRS.....	80
Tabela 11	Orçamentações parciais simulando as substituições das produções, por grama de ácido láctico, utilizando <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 a partir das substituições de GLIC e MRS por MEL e a partir de GLIC por MRS.....	81
Tabela 12	Custos operacionais efetivos para a produção, por grama, de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 em laboratório de acordo com os meios de cultura testados (GLIC, MEL e MRS).....	83
Tabela 13	Composição dos custos operacionais, em porcentagem (%), da produção de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580, de acordo com os meios de cultura testados: GLIC, MEL e MRS.....	83
Tabela 14	Orçamentações parciais simulando as substituições das produções, por grama de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 a partir das substituições de GLIC e MRS por MEL e a partir de GLIC por MRS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ΔP	Diferença entre as concentrações inicial e final de ácido láctico em g.L ⁻¹
ΔS	Diferença entre as concentrações final e inicial de açúcares redutores em g.L ⁻¹
Δt	Diferença entre o tempo final e o inicial em horas (h)
ΔX	Diferença entre as concentrações inicial e final de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580 em g.L ⁻¹
ABDI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ADP	Adenosina difosfato
AK	Acetato quinase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Açúcares redutores
AT	Açúcar total
ATP	Adenosina trifosfato
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CF	Custo fixo
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
COE	Custo operacional efetivo
COROL	Cooperativa Agropecuária Rolândia
CT	Custo total
CV	Custo variável
D(-)	Isômero dextrogiro
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EEIMVR	Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda
EMP	Via Embden–Meyerhof Parnas
Eq.	Equação
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GLIC	Meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono
GRAS	Generally Recognized as Safe
HIV	Human immunodeficiency virus
HS-CoA	Coenzima A livre
IGP-DI	Índice Geral de Preços – Disponibilidade Interna
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
KOH	Hidróxido de potássio
L(+)	Isômero levogiro
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LAB	Bactérias Ácido Lácticas
LDH	Lactato desidrogenase
MEL	Meio de cultura contendo melão como fonte de carbono
MRS	Meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de Sódio
NNFCC	National Non-Food Crops Centre

OP	Orçamentação parcial
p	Probabilidade das diferenças entre tratamentos
PDH	Piruvato desidrogenase
PFL	Piruvato formato liase
PGTA	Pós-graduação em Tecnologia Ambiental
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
PIB	Produto Interno Bruto
PLA	Poliácido láctico ou polilactato
POX	Piruvato oxidase
PTA	Fosfotransacetilase
PTS	Sistema Fosfotransferase – transporte de carboidratos através da membrana celular
Q _P	Produtividade de ácido láctico
Q _X	Produtividade de biomassa
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UN	United Nations
WHO	World Health Organization
Y _{P/S}	Rendimento da conversão de açúcares redutores em ácido láctico
Y _{X/S}	Rendimento da conversão de açúcares redutores em biomassa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1	SUSTENTABILIDADE.....	21
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580.....	27
3.2.1	Caracterização filogenética.....	27
3.2.2	Metabolismo do <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
3.2.3	Utilização de <i>Lactobacillus plantarum</i>	32
3.3	MELAÇO.....	36
3.3.1	Produção do melaço.....	37
3.3.2	Utilização industrial do melaço.....	38
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO.....	44
3.4.1	Produção de ácido láctico.....	44
3.4.2	Utilização industrial do ácido láctico.....	47
3.5	ANÁLISES DE CUSTOS E DE MERCADO.....	50
3.5.1	Componentes do custo de produção em relação ao volume produzido.....	51
3.5.2	Custo Operacional Efetivo (COE).....	52
3.5.3	Orçamentação parcial (OP).....	52
3.5.4	Análise de mercado do ácido láctico.....	53
3.5.5	Análise de mercado de <i>Lactobacillus plantarum</i> como probiótico.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1	MICRO-ORGANISMO UTILIZADO.....	57
4.2	MELAÇO UTILIZADO.....	57

4.3	PREPARAÇÃO DO PRÉ INÓCULO.....	57
4.4	PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	57
4.5	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	58
4.6	CONDIÇÕES DE CULTURA.....	58
4.7	ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO.....	59
4.8	ANÁLISE DO CONSUMO DE AÇÚCARES	59
4.9	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL E DE ÁCIDO LÁCTICO.....	62
4.10	ANÁLISES DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	62
4.11	ANÁLISES DOS CUSTOS.....	63
4.12	ANÁLISES DAS ORÇAMENTAÇÕES PARCIAIS.....	64
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE AÇÚCARES NO MELAÇO.....	66
5.2	PROCESSO FERMENTATIVO.....	66
5.2.1	Consumo de açúcares	66
5.2.2	Produção de ácido láctico e biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i> CCT 0580.....	68
5.3	ANÁLISES DE CUSTO.....	76
5.3.1	Análises dos custos das produções de ácido láctico.....	76
5.3.2	Orçamentações parciais entre as produções de ácido láctico.....	81
5.3.3	Análises de custos para a produção de biomassa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	82
5.3.4	Orçamentações parciais entre as produções de <i>Lactobacillus plantarum</i>	84
6	CONCLUSÃO.....	87
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A infinitude de recursos naturais foi uma das impressões que levaram ao avanço da Revolução Industrial no final do século XVIII e início do XIX, principalmente na Inglaterra. A extração de recursos naturais foi acentuada para alavancar as produções em grande escala, porém, sem planejamento e conhecimento adequados para evitar impactos ambientais, econômicos e sociais nunca vistos até aquele momento. Tanto se produzia, tanto se poluía.

Não muito tempo depois das novas instalações industriais, habitantes de cidades periféricas (rurais) começaram a migrar para as cidades com desenvolvimento em ebulição. Houve de fato um aumento de renda entre os trabalhadores, mas também uma segregação social com intensa marginalização (VANDERMOTTEN, 2010). Ainda na atualidade convivemos com estes problemas em virtude de um desenvolvimento econômico desenfreado, mesmo tendo conhecimento suficiente para planejar novas ações de forma mais equilibrada.

Problemas de saúde começaram a aparecer em decorrência do aumento da poluição ambiental e a chamar atenção das autoridades, cientistas e filósofos da época. Não pela condição de vida dos cidadãos como prioridade, mas pelas quedas nas produções industriais e agropecuárias (REES, 1993).

Em 1972, ficou conhecido o desenvolvimento sustentável, um conceito que veio a trazer novos olhares para os padrões de produção industrial. Ele prevê a preservação dos recursos naturais ao mesmo tempo em que se tem o desenvolvimento econômico e social. Desta forma, o desenvolvimento sustentável consiste em um desenvolvimento capaz de atender as demandas sociais, políticas e econômicas da sociedade atual sem impactar negativamente sobre as necessidades das futuras gerações (UN, 1972).

Uma das novas abordagens, que visam o desenvolvimento sustentável, surgiu na indústria química: a química verde. Neste sentido, as indústrias químicas devem buscar novas metodologias mais econômicas e ambientalmente sustentáveis, dentre elas, a busca por insumos mais produtivos e baratos (TORRESI; PARDINI; FERREIRA, 2010).

Um exemplo bem eficaz de química verde pode ser vislumbrado na produção de biocombustíveis e energia que utilizam recursos renováveis para a produção de biodiesel, etanol e energia elétrica. Na produção de etanol, por exemplo, o melaço obtido na cadeia produtiva das usinas de açúcar é aproveitado na fermentação, produzindo um etanol com menor custo de produção e ambientalmente mais sustentável quando comparado com a utilização restrita da matéria-prima, a cana-de-açúcar (PIACENTE, 2005). Isto, porque o

melaço é um subproduto da produção de açúcar e sua utilização na produção de etanol reduz a demanda por cana-de-açúcar, resultando em maior aproveitamento das fontes de carbono.

Outro exemplo, mais recente, trata da produção de ácido láctico. Inicialmente sua produção industrial por síntese química era obtida a partir de derivados de petróleo, há algumas décadas, este processo passou a ser predominantemente biotecnológico por fermentação de açúcares. Já que, anualmente, cerca de 3,5 bilhões de toneladas de resíduos agroindustriais são produzidos no mundo (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007), diferentes resíduos agroindustriais tem sido associados à produção de ácido láctico utilizando recursos sustentáveis, dentre eles o melaço, evitando o desperdício de matéria orgânica e inorgânica que seriam descartadas na natureza (VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002; JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Na produção biotecnológica de ácido láctico, faz-se necessário um tipo bacteriano capaz de transformar as moléculas fontes de carbono em ácido láctico. Dentre estes organismos, encontramos diversas bactérias produtoras de ácido láctico. Os *Lactobacillus* sp fazem parte deste grupo e incluem o *Lactobacillus plantarum*, uma bactéria utilizada na produção de alimentos fermentados ou como probiótico (MAZZEO et al., 2012; HU et al., 2013).

Diante deste cenário, torna-se relevante estudar novas possibilidades de produção de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 utilizando o melaço de cana-de-açúcar, uma vez que não há na literatura científica trabalhos descrevendo o metabolismo desta bactéria, especificamente. Além da importância em caracterizar os parâmetros fermentativos, uma comparação entre os custos operacionais efetivos justifica-se pela suposta substituição de uma fonte de carbono já utilizada por melaço.

Com base no princípio da sustentabilidade que prevê o atendimento a demanda econômica das sociedades sem prejudicar o desenvolvimento das gerações futuras, seria então possível produzir ácido láctico concomitantemente à produção de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono sustentável? Será que, de fato, seria vantajosa a substituição dos açúcares já utilizados na cadeia produtiva de ácido láctico por melaço, considerando os custos operacionais efetivos encontrados em ambos os processos? Para elucidar estas questões, foram realizados experimentos em escala laboratorial, visando comparar as produções de ácido láctico e biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 em meios de cultura contendo glicose e melaço. Os resultados encontrados foram submetidos a análises de custos operacionais efetivos e orçamentações parciais.

Caso as soluções das questões acima sejam positivas, pode tratar-se de uma nova metodologia aplicável ao conceito da química verde, uma vez que reduziria o consumo de matéria-prima nobre por utilizar um subproduto de outra indústria, tornando este trabalho associável à linha de pesquisa em Tecnologias para Aproveitamento de Resíduos do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental (PGTA) da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda na Universidade Federal Fluminense (EEIMVR-UFF).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de ácido láctico e de biomassa bacteriana de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 em diferentes meios de cultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as produções de ácido láctico e biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando melaço de cana-de-açúcar e glicose como fontes de carbono, tendo o meio MRS como controle.
- Comparar os parâmetros fermentativos, produtividade e rendimento da produção de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando melaço de cana-de-açúcar e glicose como fontes de carbono, sendo o meio MRS um controle.
- Quantificar os custos operacionais efetivos da produção de ácido láctico e biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando melaço de cana-de-açúcar, glicose e meio MRS.
- Comparar, pela técnica da orçamentação parcial, as relações custos-benefícios da substituição da glicose e MRS por melaço nos diferentes tempos da fermentação (24h, 48h e 72h).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SUSTENTABILIDADE

A racionalidade humana conferiu habilidades que permitiram a obtenção de alimentos e ferramentas extraindo matérias-primas da natureza, sem que ela muitas vezes pudesse se recuperar. Atualmente, percebe-se que esta relação entre homem e natureza nos traz problemas quanto à disponibilidade finita dos seus recursos, bem como as consequências ambientais que esta forma de relação predativa pode acarretar.

Observou-se, principalmente após a revolução industrial, a poluição do ar, da água e do solo. À época, a produção de bens de consumo era vista como desenvolvimento econômico, tal como hoje. No entanto, problemas de saúde decorrentes da grande produção industrial e seus impactos ambientais começaram a chamar atenção dos cidadãos, cientistas e das autoridades governamentais.

Em 1972, foi realizada a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, em Estocolmo, gerando a Declaração de Estocolmo, que em seu item 4 ressalta:

“In the developing countries must direct their efforts to development, bearing in mind their priorities and the need to safeguard and improve the environment. For the same purpose, the industrialized countries should make efforts to reduce the gap themselves and the developing countries.” (UN, 1972).

Naquela época, países em desenvolvimento tinham maiores desafios sociais para alcançar o desenvolvimento sustentável, uma vez que a maior parcela de sua população sofria com problemas socioeconômicos graves, como: falta de saneamento básico, carência de alimentos, educação precária etc. Tais problemas tornavam estes países reféns das atividades extrativistas e outras que impactavam diretamente o ambiente em que viviam. Já nos países industrializados, desenvolvidos, o principal fator impactante era a poluição ambiental provocada pela produção industrial, que se utilizava das explorações nos países em desenvolvimento.

Ainda na Declaração sobre o Ambiente Humano de 1972, surgiram as prerrogativas para um desenvolvimento ambiental equilibrado, como pode ser visto em seu primeiro princípio:

“Man has the fundamental right to freedom, equality and adequate conditions of life, in an environment of a quality that permits a life of dignity and well-being, and he bears a solemn responsibility to protect and improve the environment for present and future generations. In this respect, policies promoting or perpetuating apartheid,

racial segregation, discrimination, colonial and other forms of oppression and foreign domination stand condemned and must be eliminated.” (UN, 1972).

Percebe-se a inclusão do homem no ambiente e sua relação com o mesmo. A preocupação, no entanto, é com a preservação deste ambiente para àquela geração, bem como as gerações posteriores, incluindo a atual e as futuras. Ressalta também, como os problemas socioeconômicos estão interligados à problemática ambiental, sendo impossível desvinculá-los.

O termo desenvolvimento sustentável, incorporando as prerrogativas da Declaração de Estocolmo, foi discutido em 1987 pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, presidida por Gro Harlem Brundtland, ex-primeira ministra da Noruega. Como resultado desta comissão, surgiu o documento *Nosso Futuro Comum* ou Relatório Brundtland. Neste documento, as definições básicas para desenvolvimento sustentável são estabelecidas:

“Believing that sustainable development, which implies meeting the needs of the present without compromising the ability of future generations to meet their own needs, should become a central guiding principle of the United Nations, Governments and private institutions, organizations and enterprises. [...] the critical objectives for environment and development policies which follow from the need for sustainable development must include preserving peace, reviving growth and changing its quality, remedying the problems of poverty and satisfying human needs, addressing the problems of population growth and of conserving and enhancing the resource base, reorienting technology and managing risk, and merging environment and economics in decision-making.” (UN, 1987).

Desta forma, o desenvolvimento sustentável consiste em um desenvolvimento capaz de atender as demandas sociais, políticas e econômicas da sociedade atual sem impactar negativamente sobre as necessidades das futuras gerações. Não é possível, sob este aspecto, separar os desenvolvimentos econômico e tecnológico dos desenvolvimentos sociais e políticos, como já previa a Declaração de Estocolmo de 1972.

Em 1992, no Rio de Janeiro, durante a Rio 92, foi realizada outra Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. Nela, foi elaborado o documento intitulado “Agenda 21”, que determinava ações para redução de problemas ambientais para o século XXI, tais como: a emissão de gases do efeito estufa, de energia a partir de recursos não renováveis (petróleo e carvão mineral), extração de matéria prima não renovável, dentre outros.

Torresi, Pardini e Ferreira (2010), chamaram a atenção para a problemática do desenvolvimento ambiental ser preocupação de todos os cidadãos e, para isto, inclui

mudanças culturais da população que deve estar consciente de sua importância para a preservação ambiental. No caso das indústrias químicas, assunto deste trabalho, algumas preocupações podem ser citadas a fim de mitigar os impactos ambientais causados por elas ou pelo consumo de seus produtos.

“[...] a Química pode trazer o ponto de equilíbrio para este desenvolvimento melhorando os produtos de consumo com novos materiais mais adequados, além de novos métodos de produção de fármacos e produtos químicos intermediários, ambientalmente recomendáveis. [...] Devem ser pesquisadas novas reações mais eficientes, visando a diminuição da quantidade de rejeitos gerados e o uso de reagentes mais baratos e menos tóxicos.” (TORRESI; PARDINI; FERREIRA, 2010).

Neste contexto, a química verde vem contribuindo para reduzir os impactos ambientais de sua cadeia produtiva por meio da ecologia industrial. A ecologia industrial ocorre pela integração dos princípios da ciência, da engenharia e da ecologia em sistemas industriais para que a geração de produtos e serviços prestados minimizem o impacto ambiental e otimizem a utilização de recursos, energia e capital (MANAHAN, 2006).

Tal como ecossistemas biológicos, o sistema produtivo de uma indústria ecológica funciona de forma cíclica considerando todos os aspectos da prestação de bens e serviços, desde a concepção, passando pela produção, e para o destino final dos produtos remanescentes após terem sido utilizados. Funciona através de grupos de interesses industriais, distribuidores e outras empresas trabalhando em busca de benefício mútuo, usando os produtos uns dos outros, potenciais resíduos e utilização de energia da forma mais eficiente possível (MANAHAN, 2006).

As indústrias que utilizam cana-de-açúcar como matéria-prima, por exemplo, podem ser classificadas em 3 categorias: (1) indústrias açucareiras, cujo produto principal é o açúcar de mesa (sacarose); (2) indústrias alcooleiras, produzem essencialmente etanol; e (3) indústrias sucroalcooleiras, as quais produzem tanto açúcar quanto etanol (GOPAL; KAMMEM, 2009). A figura 1 mostra a proporção destas indústrias no Brasil.

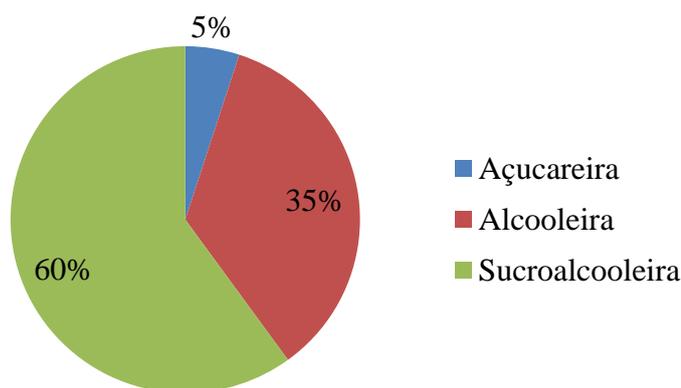


Figura 1: Proporções das agroindústrias de cana-de-açúcar no Brasil (BNDES; CGEE, 2008).

Além da produção de açúcar e de etanol, pode-se produzir energia a partir da combustão da biomassa de cana-de-açúcar (palha e bagaço). No Brasil, em 2014, foram utilizadas 58,5 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar na geração de energia térmica e elétrica, correspondendo a 36,4% de toda biomassa produzida (EPE, 2015a). Esta utilização representou 15,7% da energia obtida no país em 2014. (EPE, 2015b). A figura 2 apresenta a relação de produção energética por categorias produtivas no Brasil em 2014.

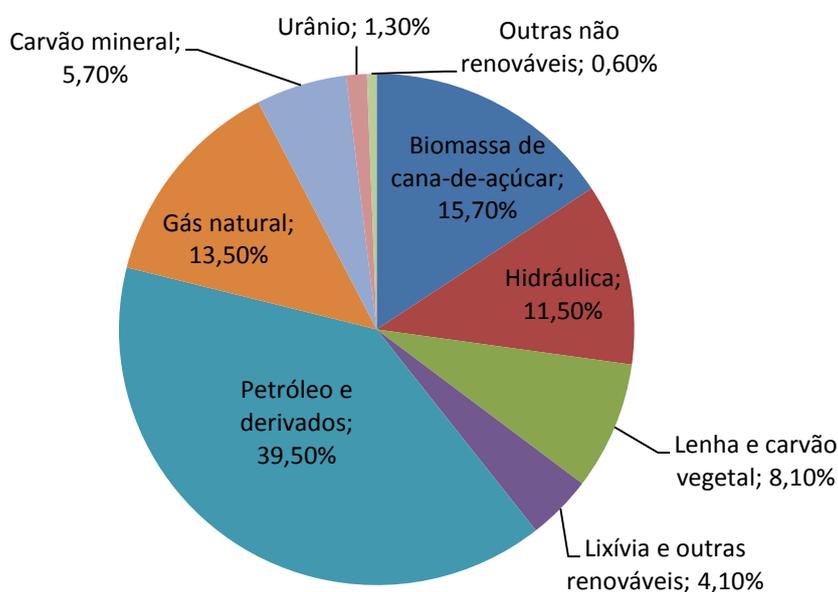


Figura 2: Proporções das produções de energia por categoria de insumos no Brasil em 2014 (EPE, 2015b).

Em relação à produção de energia elétrica, em 2014, no Brasil, a biomassa originária de cana-de-açúcar, lenha, lixo e outros, representou 7,9% de toda produção. A figura 3, evidencia as proporções das categorias de fontes de energia na matriz elétrica brasileira.

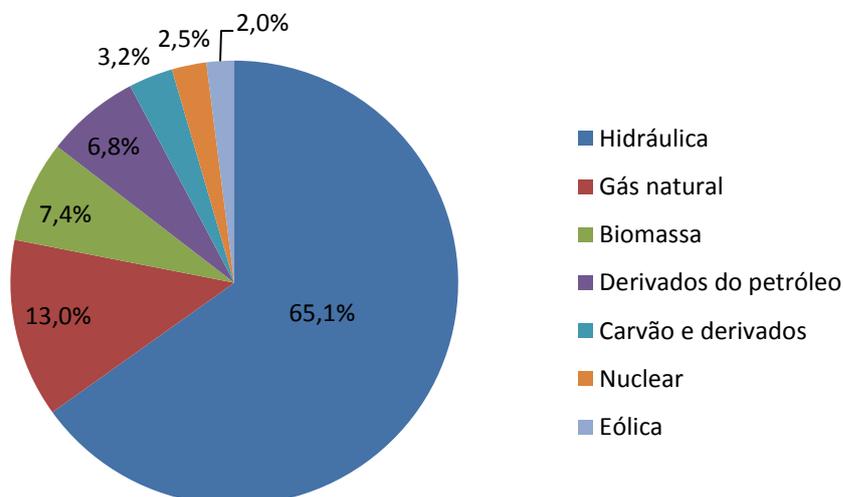


Figura 3: Matriz elétrica brasileira, evidenciando as proporções das utilizações das fontes energia elétrica (EPE, 2015b).

Além do bagaço, nas indústrias açucareiras e sucroalcooleiras há formação de um subproduto rico em carboidratos, o melaço. As indústrias sucroalcooleiras aproveitam o melaço, produzido na obtenção do açúcar, para produzir o etanol por meio de fermentação (PIACENTE, 2005; SEBRAE, 2008). Neste processo, o bagaço da cana-de-açúcar pode ser utilizado como fonte energética por combustão para a destilação do etanol e para a concentração do açúcar (GOPAL; KAMMEM, 2009). A produção de etanol, conseqüentemente gera a vinhaça como um resíduo, que pode ser aproveitado como adubo nos canaviais.

Tal produção evidencia um ecossistema industrial no qual, um subproduto (melaço) e resíduos (bagaço e vinhaça) são aproveitados na geração de produtos comercializáveis: etanol e energia elétrica. Pode-se, então, caracterizar as indústrias sucroalcooleiras como indústrias ecológicas.

No entanto, qual o destino do melaço nas indústrias açucareiras?

Além de ser aproveitado nas indústrias sucroalcooleiras e alcooleiras, o melaço pode ser utilizado como suplemento de rações de gado, ser comercializado como adoçante natural, utilizado como fonte de carbono para a produção de bioplástico a partir da fermentação em ácido láctico, dentre outros fins. Ou seja, outras indústrias podem utilizar este subproduto das indústrias açucareiras, fechando o ecossistema industrial.

A figura 4 ilustra o ecossistema industrial formado entre as indústrias de cana-de-açúcar.

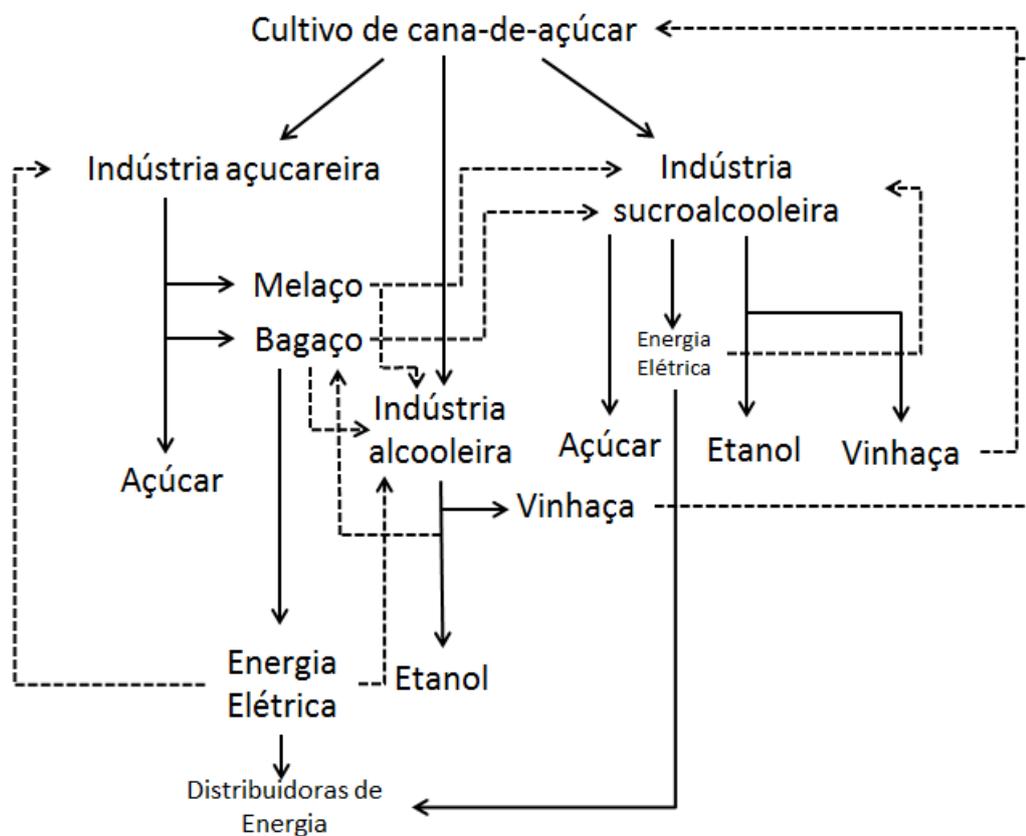


Figura 4: Ecossistema industrial evidenciando a dependência dos “organismos” envolvidos: indústrias açucareira, alcooleira e sucroalcooleira.

Confirma-se a partir destas premissas que o aproveitamento do melaço como fonte de carbono nas fermentações alcoólica e láctica pode reduzir o consumo de matéria-prima (cana-de-açúcar), reduzindo concomitantemente as despesas com energia e outros insumos para seu cultivo, além de diminuir a emissão de gases do efeito estufa.

No caso da fermentação láctica, assunto central deste trabalho, seus produtos, ácido láctico e biomassa de *Lactobacillus plantarum*, podem ainda ser aproveitados por outras indústrias farmacêuticas e alimentícias, aumentando o número de “organismos” participantes deste ecossistema industrial. É o que será discutido nos próximos tópicos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO *Lactobacillus plantarum* CCT 0580

Buscou-se neste trabalho, comparar a produção de biomassa de bactérias da espécie *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) e ácido láctico (ácido láctico) utilizando-se diferentes meios de cultura e fontes de carbono. Neste capítulo, serão abordados temas gerais sobre estas bactérias, caracterizando sua filogenia, seu metabolismo e suas utilizações comerciais.

3.2.1 Caracterização filogenética

Lactobacillus é um gênero de bactérias constituído por mais de 125 espécies e subespécies de bactérias classificadas como Bactérias de Ácido Láctico (LAB), sendo gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase-negativas, desprovidas de citocromos, estritamente fermentativa com ácido láctico sendo o principal produto das fermentações (VRIES et al., 2006). A figura 5 apresenta a árvore filogenética de algumas LAB, em destaque, o *L. plantarum*.

Como uma LAB típica, *L. plantarum*, é de hábito anaeróbico, porém tolerante a meio aeróbico e adaptada a meios ácidos (VRIES et al., 2006; PANESAR et al., 2007). A espécie *L. plantarum* é heterofermentativa facultativa, isto é, produz majoritariamente ácido láctico ao final do catabolismo de carboidratos, mas em determinadas condições de cultivo, podem produzir ácido acético ou etanol (PANESAR et al., 2007; MAZZEO et al., 2012). Encontrada em diversos tipos de vegetais, carne e produtos lácteos fermentados, *L. plantarum* tem desenvolvido mecanismos de resposta molecular complexos, que a permite sobreviver em condições de estresses ambientais: oxidação, aquecimento e refrigeração, ácido/básico, alta osmolaridade/desidratação, carência nutricional entre outros (MAZZEO et al., 2012).

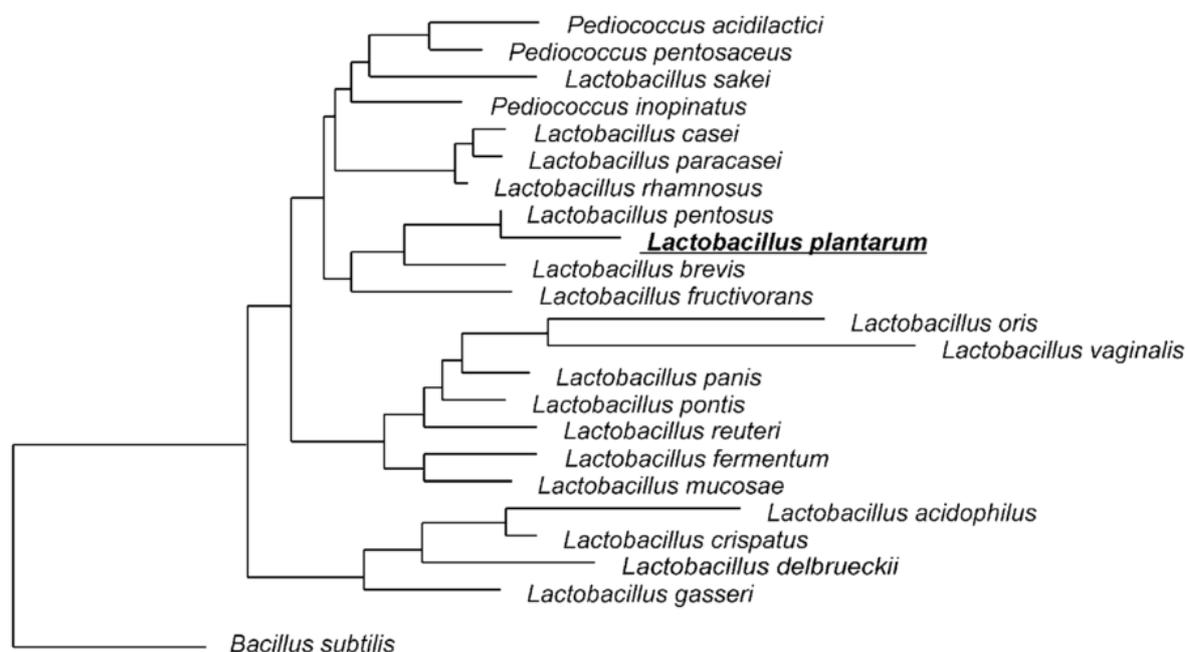


Figura 5: Relação filogenética de *Lactobacillus plantarum* em relação a outras Bactérias de Ácido Láctico (LAB). Fonte: VRIES et al. (2006).

3.2.2 Metabolismo do *Lactobacillus plantarum*

Diferentes fatores afetam o crescimento de LAB em meio de fermentação. Além de necessidades nutricionais complexas, a temperatura, o pH, a concentração de açúcares e a concentração ácido láctico são fatores importantes que influenciam o crescimento de *Lactobacillus* sp (EITEMAN; RAMALINGAM, 2015).

Existe uma temperatura ótima na qual a taxa de crescimento é a mais elevada e que depende das características do micro-organismo utilizado, bem como das condições ambientais. Quando a temperatura do meio é superior àquela adequada para um crescimento ótimo, a atividade microbiana é substancialmente reduzida pela desnaturação provocada em suas enzimas e os micro-organismos podem, eventualmente, morrer (PANESAR et al., 2007). Se a temperatura, no entanto, for menor, as velocidades das reações enzimáticas nas células microbianas podem ser reduzidas, levando ao crescimento mínimo ou nulo. A temperatura ideal para o crescimento de LAB varia entre 30°C e 45°C de acordo com as espécies. Em relação à temperatura ótima, a maioria dos lactobacilos é mesófila. No entanto, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. thermophilus* podem ser considerados termofílicos, uma vez que a produção de ácido láctico por fermentação pode ser realizada a temperaturas comparativamente elevadas. Em fermentações utilizando *thermophilus* a temperatura de 45°C

ou mais elevada pode ser mantida. No entanto, para outras espécies de lactobacilos, tais como *L. paracasei* e *L. lactis*, uma temperatura entre 30°C e 32°C são as ideais, respectivamente (ADAMBERG et al. 2003). Eiteman e Ramalingam (2015) comentaram que a escolha por um micro-organismo termotolerante reduz a contaminação por outros não tolerantes se cultivados em temperaturas elevadas.

A concentração de íons de hidrogênio do ambiente durante a fermentação também afeta o crescimento microbiano e a taxa de produção de ácido láctico. O pH afeta, pelo menos, dois aspectos das células microbianas: o funcionamento das suas enzimas e o transporte de nutrientes dentro da célula. Ele pode, também, limitar a síntese de enzimas metabólicas responsáveis pela síntese de novo protoplasma, uma vez que afeta o RNA e a síntese proteica (PANESAR et al., 2007). Desta forma, a produção de ácido láctico ao reduzir o pH do meio de cultivo, limita o crescimento e metabolismo do *L. plantarum*, sendo necessária a correção do pH, que pode ser feita com adição de NaOH. No entanto, a geração de cátions Na⁺ limita o metabolismo das LAB, podendo ser utilizados KOH ou Ca(OH)₂. Assim, de acordo com Eiteman e Ramalingam (2015), a produção biotecnológica depende de dois aspectos do micro-organismo relacionados ao pH: sua tolerância a baixo pH e à elevação da concentração de cátions.

A fermentação é eficiente na oxidação de carboidratos acoplada à fosforilação em nível de substrato através da via glicolítica de Embden–Meyerhof (Figura 6A). O *L. plantarum* é uma espécie de bactéria heterofermentativa facultativa, isto é, prioritariamente produz, a partir de hexoses, um racemo de ácido láctico (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008; CHRAMOSTOVÁ et al., 2014). Porém, no metabolismo de pentoses e outros nutrientes energéticos, a via metabólica depende de fosfoctolase e seus produtos podem ser: ácido láctico, etanol ou ácido acético (Figura 6B) (PANESAR et al., 2007, WOUTERS et al., 2013). A figura 6 evidencia as duas vias metabólicas das bactérias lácticas heterofermentativas facultativas.

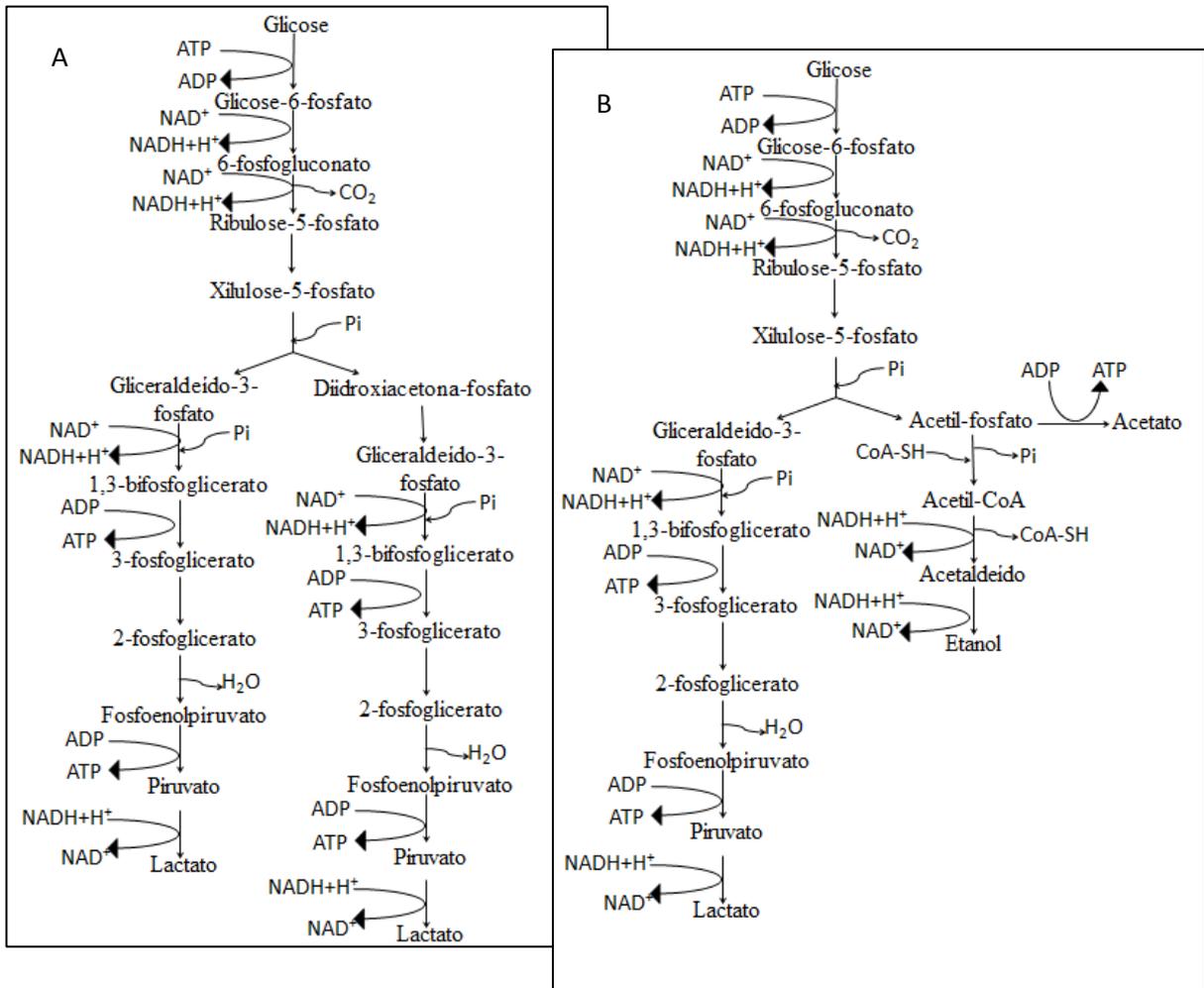


Figura 6: Vias metabólicas de oxidação anaeróbica da glicose. (A) homofermentativa e (B) heterofermentativa com formação de etanol e/ou acetato. De acordo com Eiteman e Ramalingam (2015), pode ser utilizado NADP⁺ ou NAD⁺ na formação de 6-fosfogluconato e ribulose-5-fosfato.

Outra condição também pode ter como produto final o acetato. Em baixa disponibilidade de glicose e tendo disponibilidade de O₂, *L. plantarum* converte lactato em acetato produzindo dióxido de carbono (CO₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e um mol de ATP adicional para cada mol de lactato convertido (figura 7). Nestes casos, por serem catalases-negativas, o aumento da concentração de H₂O₂ torna-se tóxico, limitando o crescimento e o metabolismo de *L. plantarum* (QUATRAVAUX et al., 2006).

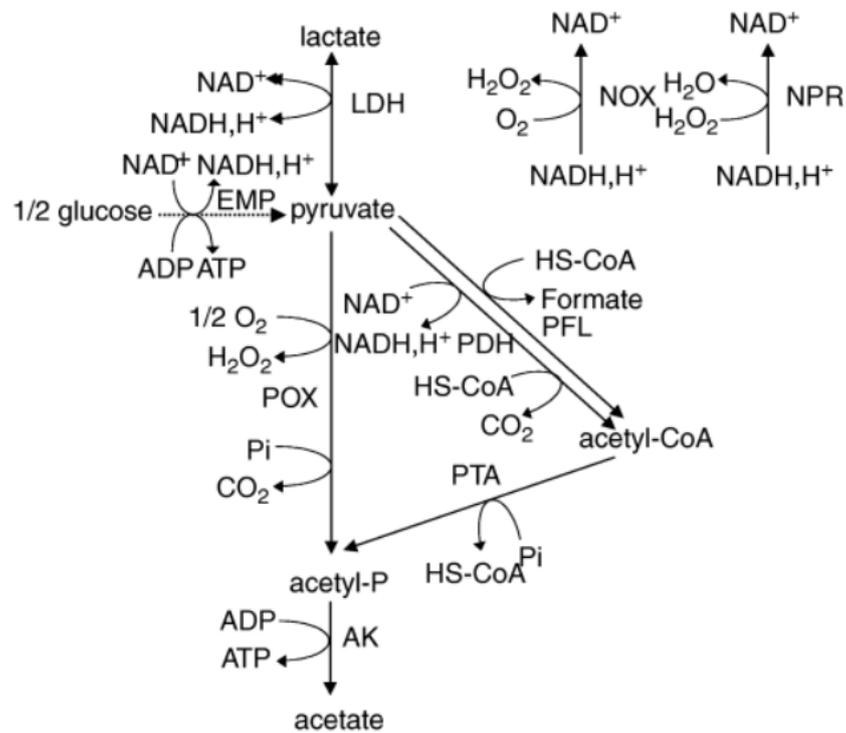


Figura 7: Vias de conversão de lactato em acetato por *Lactobacillus plantarum*. EMP, Via Embden–Meyerhof Parnas; LDH, lactato desidrogenase; POX, piruvato oxidase; PDH, piruvato desidrogenase; PFL, piruvato formato liase; PTA, fosfotransacetilase; AK, acetato quinase. Fonte: QUATRAVAUX et al. (2006).

Em muitas células, o transporte de sacarose, glicose e frutose pela membrana plasmática requer o acoplamento a um sistema fosfotransferase específico (PTS) para cada um destes carboidratos, simultaneamente acoplados à fosforilação do carboidrato por fosfoenolpiruvato, havendo algumas exceções (TARANTO; VALDEZ; PEREZ-MARTINEZ, 1999; NAUMOFF; LIVSHITS, 2001). Nestes casos, a concentração de fosfato disponível regula a glicólise: baixas concentrações de fosfato tendem a inibi-la, principalmente em altas concentrações de glicose. (EITEMAN; RAMALINGAM, 2015). O transporte de frutose por PTS-frutose, no entanto, não depende da concentração de prótons, especialmente em condições ácidas (TARANTO; VALDEZ; PEREZ-MARTINEZ, 1999).

Kleerebezem et al. (2003) encontraram, ao estudar o genoma de *Lactobacillus plantarum* WCFS1, diferentes genes para PTS, sendo possível a utilização de sacarose, glicose e frutose por estes transportadores.

3.2.3 Utilização de *Lactobacillus plantarum*

Tais bactérias podem ser utilizadas para fins relativos à saúde humana e animal, à indústria alimentícia e também à redução de impactos ambientais.

Uma das principais razões de sua utilização é a produção de bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos produzidos nos ribossomos de bactérias. Em especial, as LAB são utilizadas para a produção em grande escala de bacteriocinas sendo consideradas Geralmente Reconhecidas como Seguras (Generally Recognized as Safe - GRAS) (HU et al., 2013).

As bacteriocinas produzidas por LAB são divididas em quatro classes de acordo com as características bioquímicas, massa molecular e resistência ao calor (KLAENHAMMER, 1993 apud HU et al., 2013). A tabela 1 apresenta, resumidamente, esta classificação.

Tabela 1: Classificação de bacteriocinas de acordo com Klaenhammer (1993) apud HU et al. (2013).

Classe	Massa Molecular (kDa)	Tamanho	Natureza química	Presença de Lantionina	Resistência ao calor
I	< 5	Pequenas	Peptídeos	Presente	Estáveis
II	< 10	Pequenas	Peptídeos	Ausente	Estáveis
III	> 30	Grandes	Proteínas	Ausente	Instáveis
IV	> 30	Grandes	Lipoproteínas /glicoproteínas	Ausente	Instáveis

Plantaricina, bacteriocina produzida por LAB, principalmente *L. plantarum*, é agrupada na classe II, podendo ser classe IIa, apenas uma cadeia peptídica; ou IIb, com duas cadeias peptídicas (MALDONADO et al., 2002; VAN REENEN et al., 2003; SOLIMAN et al., 2011).

Hu et al. (2013) estudaram a produção de uma bacteriocina por *L. plantarum* 163, a plantaricina 163, e obtiveram resultados significativos no espectro antimicrobiano contra algumas bactérias gram-positivas e também negativas. A tabela 2 apresenta a relação de micro-organismos com o crescimento inibido por plantaricina 163.

Tabela 2: Espectro de ação antimicrobiana de plantaricina 163. Não foi observada ação antimicrobiana contra os fungos: *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus nigricans* (HU et al., 2013).

Classificação das bactérias de acordo com a complexidade estrutural de seus envoltórios	Bactérias com crescimento inibido por plantaricina 163
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Lactobacillus thermophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Gram-negativas	<i>Escherechia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Por possuir ação antimicrobiana, plantaricinas – assim como outras bacteriocinas – podem ser utilizadas como antibióticos em caso de infecções bacterianas patogênicas resistentes a outros fármacos (SOLIMAN et al., 2011).

Além de servir como fármaco, a plantaricina é produzida também pelos *L. plantarum* encontrados na microbiota intestinal, tornando possível considerar tais bactérias como probióticos. A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FOA) definem probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para o hospedeiro” (FAO; WHO, 2006)

Vries et al. (2006) discutiram sobre a função probiótica dos *L. plantarum*. De acordo com seu trabalho, LAB são encontradas naturalmente no intestino humano e, quando ingeridas, podem se estabelecer mais adequadamente reduzindo a flatulência, formando bolos fecais mais macios e controlando as comunidades de outras bactérias anaeróbicas enteropatogênicas ou simbióticas graças à ação de bacteriocinas.

Cunningham-Rundles et al. (2000) estudaram a resposta imune em crianças expostas, congenitamente, ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) que foram tratadas com *L. plantarum* 299v liofilizados administrados uma vez ao dia. *Lactobacillus plantarum* 299v foi capaz de colonizar o trato digestivo destas crianças e os resultados preliminares mostraram um aumento no peso e resposta imune específica, tornando-as menos suscetíveis

às diferentes doenças que acometem os portadores de HIV, inclusive tratando candidíase esofágica e diarreia crônica.

A figura 8 ilustra a utilização do *L. plantarum* como probiótico como produto comercializável.



Figura 8: Exemplos de produtos comercializáveis como probióticos compostos por *Lactobacillus plantarum*.

L. plantarum são utilizados na indústria de alimentos fermentados a base de leite, vegetais e carnes. A presença destes micro-organismos limita o desenvolvimento de outros que possam deteriorar tais alimentos na prateleira. Isto acontece pela (1) produção de ácido láctico que diminui o pH do meio, restringindo as ações de micro-organismos sujeitos a estas variações; (2) pela competição por nutrientes entre os *L. plantarum* e os outros micro-organismos; (3) pela produção de bacteriocinas, que como visto, possui ação antimicrobiana contra diversos micro-organismos; e (4) pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que afeta o desenvolvimento de bactérias catalase-negativas. (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; VRIES et al., 2006; QUATRAVAUX et al., 2006; WOUTERS et al., 2013). Em muitos casos, o uso industrial e artesanal destes lactobacilos, além de proporcionar maior tempo de conservação, promove também melhoras no sabor e na textura dos alimentos fermentados (WOUTERS et al., 2013), como nas diferentes condições de aeração, porque a formação de diferentes aromas e gostos em alimentos fermentados é criticamente dependente do equilíbrio entre as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (acetato) e não-voláteis (lactato) em conjunto com o nível de açúcar (ADLER-NISSEN; DEMAIN, 1994; LEJEUNE et al., 2004). Na figura 9, estão representados alguns alimentos em que se utiliza *L. plantarum* como micro-organismo fermentador, atribuindo propriedades aos alimentos descritas no parágrafo anterior.



Figura 9: Alimentos em conserva contendo *Lactobacillus plantarum*. A fotografia a esquerda refere-se à conserva de azeitonas.

Para o meio ambiente, bons resultados estão sendo obtidos com *L. plantarum* para a absorção e isolamento de cádmio, um metal pesado que pode contaminar o meio ambiente (HAO; REISKE; WILSON, 1999). Além desta aplicabilidade, *L. plantarum* podem ser mais eficazes que outras LAB na clarificação do melão e de águas residuais, uma função importante para permitir a entrada da luz nos corpos d'água contaminados para que as micro e macroalgas possam realizar fotossíntese, permitindo o fluxo de energia no ambiente aquático (TONDEE; SIRIANUNTAPIBOON, 2008).

No próximo tópico, apresentam-se as propriedades do melão, que o tornam uma fonte eficaz de nutrientes para o metabolismo de *L. plantarum*.

3.3 MELAÇO

O melaço é um subproduto das indústrias açucareiras rico em nutrientes. Consumido em natura, é bastante adocicado e utilizado em substituição ao próprio açúcar comercial por algumas pessoas, sendo encontrado com facilidade em lojas para produtos naturais. Serão abordados neste capítulo a produção do melaço, suas características físico-químicas e suas diversas utilizações. A figura 10 mostra o melaço como produto comercial.



Figura 10: Fotografia de um frasco de melaço comercial.

A Agência Nacional de Vigilância em Sanitária (ANVISA) na resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) n° 12, de 1978, definiu melaço como: “o líquido que se obtêm como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto”. Diferenciando-o do melado: “líquido xaroposo obtido pela evaporação do caldo de cana (*Saccharum officinarum*) ou a partir da rapadura, por processos tecnológicos adequados” (BRASIL, 1978).

O melaço é rico em açúcares fermentescíveis e alguns componentes inorgânicos, principalmente, potássio, ferro e nitrogênio. Desta forma, o melaço tem sido muito estudado como fonte de energia para processos fermentativos, como a produção de ácido láctico e etanol (FELTRIN et al., 2000, OLIVEIRA; BUZATO; HAULY, 2005; SILVA et al., 2005; SEBRAE, 2008; Xu; Xu, 2014). As características nutricionais do melaço podem variar de acordo com a safra da cana-de-açúcar que o originou, com o processo de obtenção, dentre outros fatores, normalmente apresentando proteínas, vitaminas, oligoelementos e minerais, dentre eles Ca, Fe, Mg, Se, Br e Cr (COSTA et al., 2000). A tabela 3 apresenta as

concentrações de açúcares encontradas em melaços utilizados em diferentes trabalhos, ilustrando a diversidade nas concentrações de alguns nutrientes, nestes casos, de açúcares.

Tabela 3: Concentrações de açúcares encontrados em melaços utilizados em trabalhos diferentes.

Trabalhos	Concentração de sacarose (%)	Concentração de açúcares redutores (%)	Concentração de açúcares totais (%)
Feltrin; Anna e Porto (2000)	33,78	14,72	48,5
Haully; Oliveira e Oliveira (2003)	50	16	66
Oliveira; Buzato e Haully (2005)	54	16	70
Ortiz et al. (2012)	42	7	49

3.3.1 Produção do melaço

O melaço de cana-de-açúcar é produzido em indústrias açucareiras e sucroalcooleiras a partir da produção de caldo de cana-de-açúcar, numa proporção de 40 a 60 kg por tonelada de cana processada (PIACENTE, 2005), sendo produzido por ano cerca de 18 milhões de toneladas de melaço (OLIVEIRA et al., 2009). O processo produtivo destas indústrias inclui algumas etapas até a obtenção do melaço: (1) moagem da cana, (2) purificação do caldo, (3) concentração do caldo e (4) turbinagem.

- 1- A **moagem** consiste na extração do caldo de cana-de-açúcar a partir de sua compressão em grandes moendas. Esta etapa do processo gera, além do caldo, o bagaço que pode ser utilizado como fonte energética para incineradores da própria usina.
- 2- Após a extração do caldo, este é **purificado** por peneiramento e clarificação química com anidrido sulfuroso, que retira impurezas grosseiras e precipita impurezas menores, respectivamente. A purificação gera o caldo rico em sacarose e as impurezas formam a torta de filtro, um resíduo.
- 3- A **concentração do caldo** dá-se pelo aquecimento e conseqüente evaporação da água, cristalizando espontaneamente a sacarose contida no caldo.

4- O caldo concentrado passa então pela **turbinagem**, uma centrifugação que separa os cristais de sacarose do restante do caldo: o mel. O mel é recirculado até que não se obtenha quantidades satisfatórias de cristais de sacarose. Após todo o processo, o mel que não é mais aproveitado forma o melaço (PIACENTE, 2005).

O melaço contém pigmentos melanoidinas formados pela combinação de aminoácidos e açúcares em altas temperaturas e baixa atividade de água nas etapas de concentração do caldo. Tondee e Surianuntapiboon (2008) estudaram a clarificação do melaço por *Lactobacillus plantarum* PV71-1861 e obtiveram bons resultados, de até 68,12%. Caso o melaço seja descartado, deve passar um tratamento que reduza a concentração de melanoidinas. Porém, no Brasil, a maior parte do melaço é reaproveitada em indústrias sucroalcooleiras e alcooleiras.

3.3.2 Utilização do melaço

O melaço da cana-de-açúcar é utilizado principalmente na produção de etanol nas indústrias sucroalcooleiras, mas também pode ser utilizado em outros segmentos como: nutrição animal, como complementação nutricional de bovinos (AYALA; TUN, 1991); produção de alimentos, por exemplo, na fabricação de casquinhas de sorvete; indústria de papel e celulose no fabrico de papelão; na produção de cerâmicas e tijolos, protegendo-os contra as altas temperaturas dos fornos; em fundições, na confecção de moldes de fundições (MELAÇOS BRASILEIROS, 2014), dentre outras utilizações. A figura 11 ilustra as diferentes utilizações do melaço.



Figura 11: Utilização do melaço da cana-de-açúcar em diferentes segmentos, em sentido horário: agropecuária, alimentos, papel e celulose, fundição e cerâmica.

Devido a sua maior importância na produção de etanol, serão discutidos a seguir alguns aspectos da utilização de melaço na cadeia produtiva de etanol.

Partindo da extração do caldo de cana-de-açúcar, na moagem, podemos simplificar o processo de produção de etanol em mais seis etapas: (1) preparo do mosto, (2) preparo do fermento, (3) fermentação, (4) destilação, (5) retificação e (6) desidratação.

1- O **mosto** é um meio líquido rico em açúcares fermentescíveis, pode ser originado do caldo extraído na moagem – principalmente em usinas autônomas – ou do melaço – mais comum em usinas de álcool anexas às usinas de açúcar. Este mosto recebe nutrientes fundamentais ao metabolismo das leveduras que serão utilizadas na fermentação: nitrogênio e fósforo. Além disso, tem seu pH ajustado.

2- O **preparo do fermento** consiste na elaboração do concentrado de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, fungos unicelulares, mais conhecidos como fermento biológico, adicionado em meios de cultura favoráveis ao seu metabolismo. Pode se definir esta fase como a preparação do inóculo.

3- A **fermentação** inicia-se com o acréscimo das leveduras ao caldo a ser fermentado. A fermentação alcoólica consiste na transformação de açúcares, neste caso sacarose, em etanol e CO_2 . Com duas reações adicionais a via de Embden–

Meyerhof Parnas (ou glicólise). A figura 12 apresenta via EMP com as reações adicionais para a fermentação alcoólica.

4- A **destilação** consiste na extração dos componentes voláteis do caldo fermentado (vinho). Parte das leveduras é reaproveitada em outra etapa fermentativa e o restante pode ser comercializado como suplemento proteico para nutrição animal.

5- Na purificação ou **retificação**, obtém-se o álcool bruto após uma segunda destilação do vinhoto.

6- Na **desidratação**, outra destilação acontece com adição de benzol. Agora, etanol atinge maior concentração, sendo obtido o álcool anidro utilizado como biocombustível, por exemplo (PIACENTE, 2005).

As figuras 13 e 14 apresentam, respectivamente, as etapas de produção de etanol em usina sucroalcooleira e alcooleira.

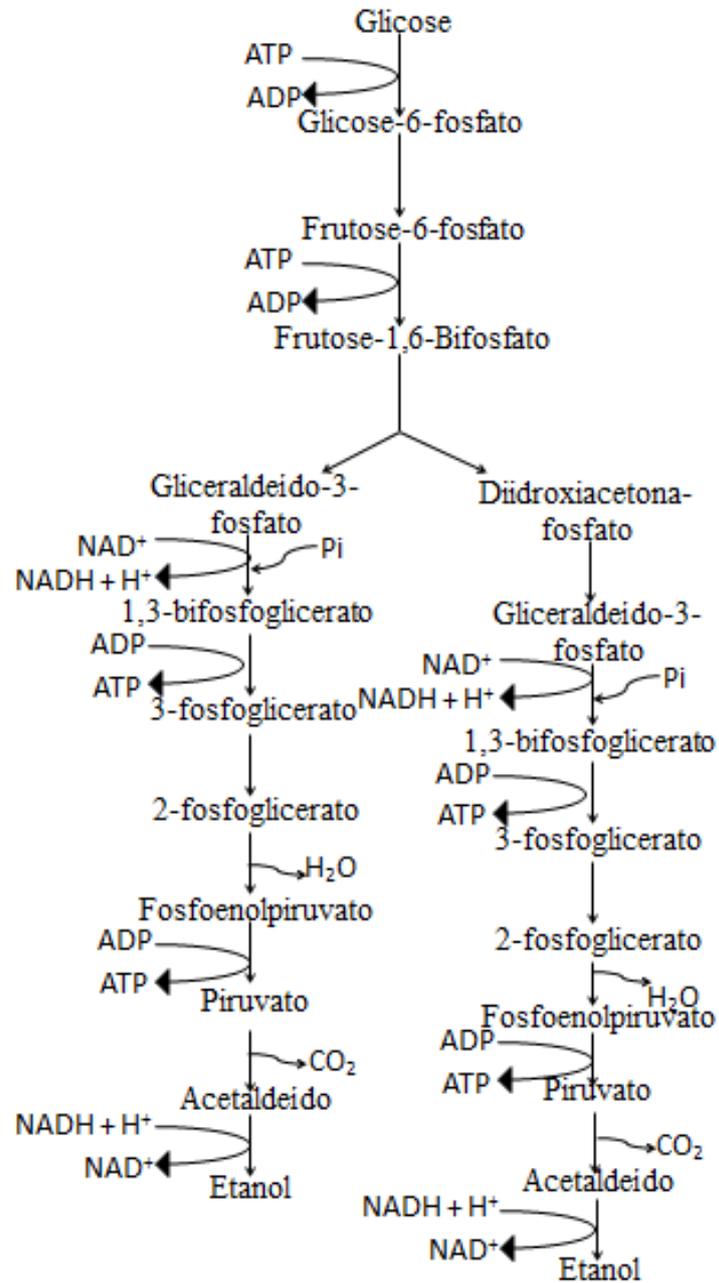


Figura 12: Via de Embden-Meyerhof Parnas com as reações adicionais para a formação de etanol.

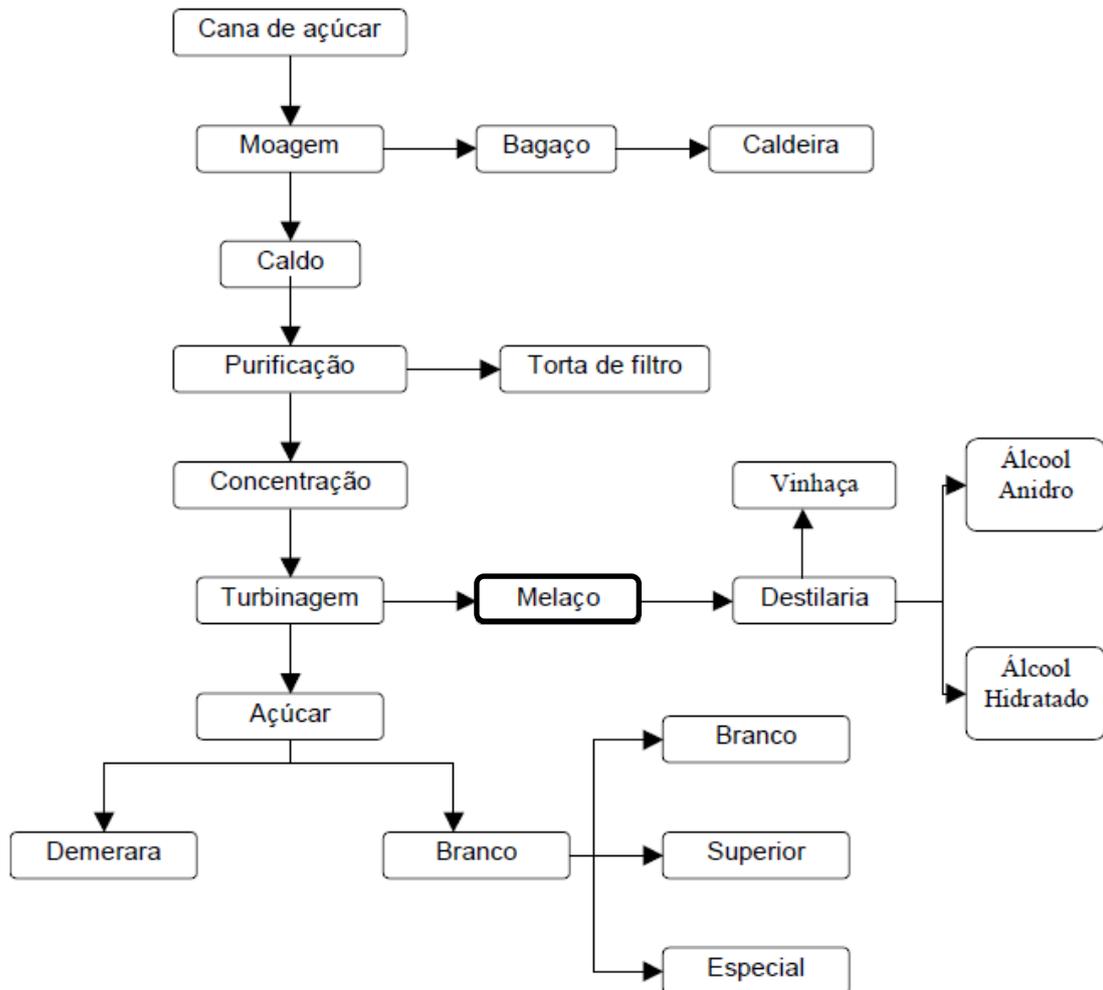


Figura 13: Melaço na cadeia produtiva de etanol anexado à produção de açúcar, indústria sucroalcooleira. Adaptado de Piacente (2005).

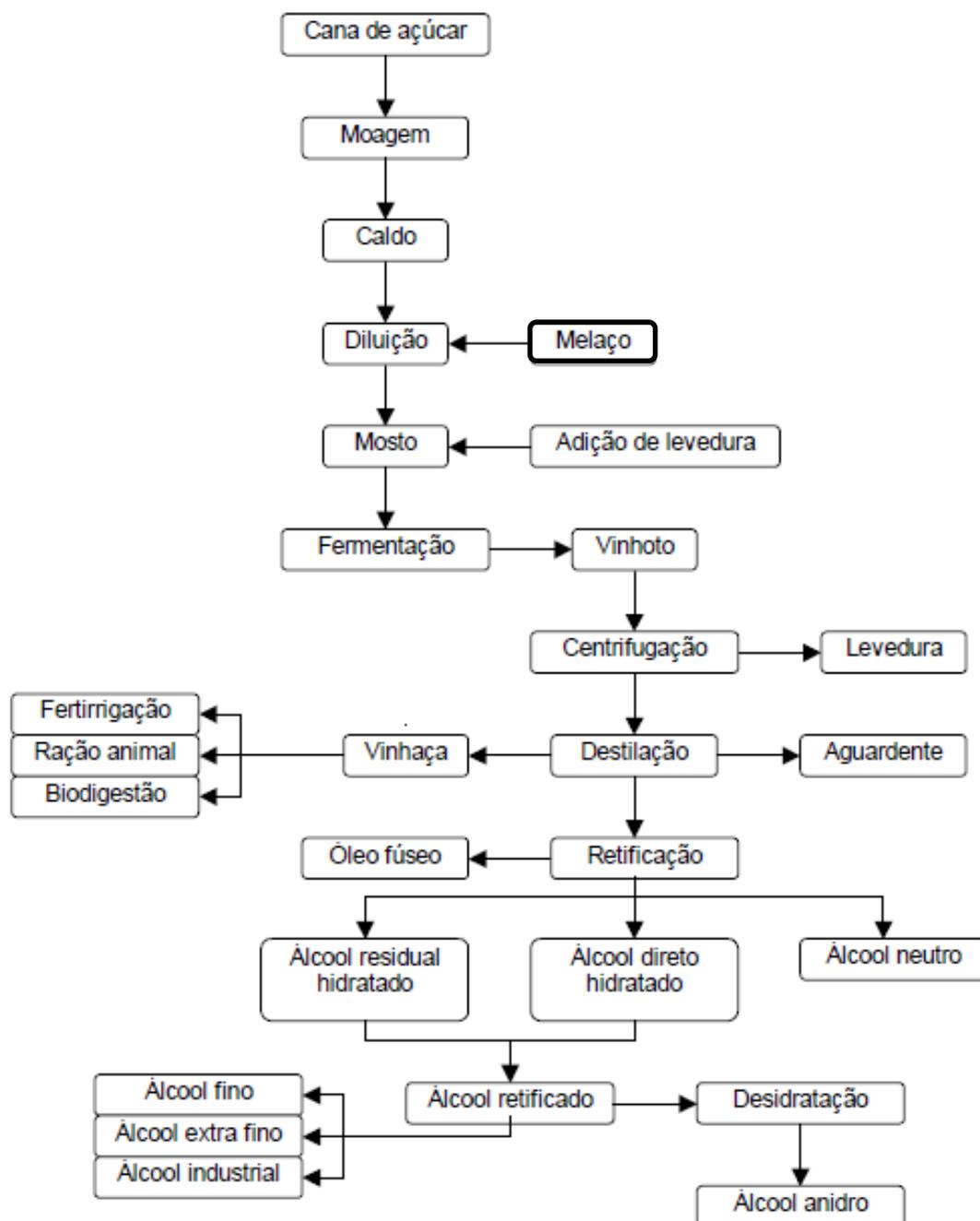


Figura 14: Melaço na cadeia produtiva de etanol em usina alcooleira. Adaptado de Piacente, (2005).

Discute-se no próximo capítulo, a produção de ácido láctico a partir do melaço como alternativa de atividade industrial sustentável por reduzir os insumos ao utilizar um subproduto da cadeia produtiva do açúcar, tal como tem sido usado na produção do etanol.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

O ácido láctico é um ácido orgânico, obtido a partir de processos químicos ou biotecnológicos a partir de derivados de petróleo e de açúcares, respectivamente, tendo utilidades diversas nas indústrias de vários segmentos. Neste capítulo, será abordada a caracterização do ácido láctico, suas formas de produção e utilização.

Com fórmula molecular $C_3H_6O_3$, o ácido láctico, também denominado ácido 2-hidroxiopropiônico ou ácido α -hidroxiopropiônico, é amplamente distribuído na natureza e, em solução, apresenta-se como o ânion lactato. Pode ser encontrado como isômeros ópticos D (-) ou L(+) (PANESAR et al., 2010; MARTINEZ et al., 2013; EITEMAN; RAMALINGAM, 2015). A figura 15 apresenta projeções de Fischer de ambos os isômeros.

De acordo com Martinez et al. (2013) as propriedades físico-químicas do ácido láctico incluem: (1) carácter ácido, em meio aquoso; b) reatividade bifuncional associado com a presença de um grupo carboxila e um grupo hidroxila, o que lhe confere grande versatilidade de reação; e c) atividade óptica assimétrica do carbono 2 (C2).

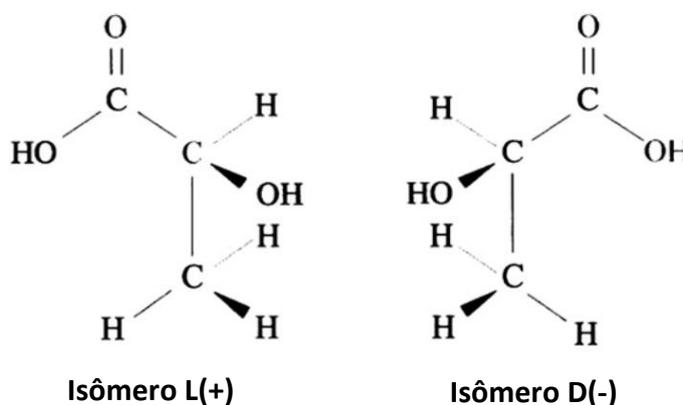


Figura 15: Projeções de Fischer dos isômeros L(+) e D(-) da molécula de ácido láctico (MARTINEZ, 2013).

3.4.1 Produção de ácido láctico

O ácido láctico pode ser produzido por síntese química ou por fermentação microbiana (fermentação láctica). A síntese química dá-se a partir de insumos petroquímicos (lactonitrilo) e produz um racemo formado pelos isômeros D(-) e L(+)-ácido láctico. Em contrapartida, a partir da fermentação de compostos orgânicos, pode-se gerar D(-)-ácido láctico ou L(+)-ácido láctico a depender do micro-organismo fermentador. Há, também, a

possibilidade de se obter um racemo na fermentação (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011), como no caso em que se utiliza *Lactobacillus plantarum* (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008; CHRAMOSTOVÁ et al., 2014).

3.4.1.1 Síntese química

A síntese química de ácido láctico é baseada principalmente na hidrólise de lactonitrilo por ácidos fortes, que fornecem apenas a mistura racêmica de D(-) e L(+)-ácido láctico. Outras vias de síntese química para o ácido láctico incluem: (1) a degradação de açúcares catalisada por base (*base-catalyzed*); (2) a oxidação de propilenoglicol; (3) a reação do acetaldeído, monóxido de carbono e água a temperaturas e pressões elevadas; (4) a hidrólise de ácido cloropropanóico, e (5) oxidação de propileno por ácido nítrico, entre outros. Nenhuma destas rotas levou a técnica e processos economicamente viáveis (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

3.4.1.2 Produção biotecnológica

Aproximadamente 90% da produção de ácido láctico em todo o mundo são obtidos por fermentação bacteriana, por ser mais rentável que a produção química (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; COELHO et al., 2010; WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015). Isto pode ser favorecido pela possibilidade de se produzir ácido láctico via fermentação de diferentes resíduos ou subprodutos das agroindústrias, que normalmente são ricos em fonte de carbono fermentáveis. Estas matérias-primas têm custos bem menores que os açúcares purificados, sejam, glicose, frutose, sacarose e outros, mais utilizados nestes processos. Dentre os possíveis resíduos e subprodutos que podem ser utilizados na produção biológica de ácido láctico, estão: melaço da cana-de-açúcar, soro de leite, bagaço de cana, bagaço de mandioca, amido de batata, trigo, cevada e cenoura (VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002; JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

A produção por fermentação oferece grandes vantagens em relação à produção química, uma vez que: os substratos para a fermentação têm baixos custos, a temperatura para fermentação é baixa e o consumo de energia é menor, além da produção de resíduos ser reduzida e com menor potencial contaminante (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Existem diferentes tipos de processos fermentativos. A tabela 4 apresenta as vantagens e desvantagens de alguns deles.

Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos principais processos fermentativos utilizados na produção de ácido láctico (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Processo Fermentativo	Vantagens	Desvantagens
Fermentação em batelada	- operação simples - alta concentração de produto - risco de contaminação reduzido	- baixa produtividade - inibição por substrato e/ou produto final
Fermentação em batelada alimentada	- evita o problema de inibição por substrato - alta concentração de produto	- inibição pelo produto final - dificuldade na condução do projeto ideal
Fermentação repetida	- fermentação em menor tempo - economia de trabalho - altas taxas de crescimento - cultura principal curta	- exigências de equipamentos especiais ou linhas de conexões especiais utilizados para a concentração de células
Fermentação contínua	- alta produtividade - controle das taxas de crescimento - menor frequência de interrupção do processo	- utilização incompleta da fonte de carbono

Diferentes micro-organismos utilizados em fermentações podem produzir o isômero D (-), outros o isômero L(+) e outros podem produzir ambos. Diferente da produção química que produz apenas o racemo. As enzimas ácido láctico (ou lactato) desidrogenases são responsáveis por reduzirem o ácido pirúvico a ácido láctico (figura 4A). Se um micro-organismo possuir a enzima D-ácido láctico desidrogenase, produzirá a forma D(-)-ácido láctico, se possuir a enzima L-ácido láctico desidrogenase, produzirá a forma L(+)-ácido láctico e se possuir ambas as enzimas, produzirá um racemo de ácido láctico contendo ambos os isômeros (D e L) (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; SILVA, 2011; MARTINEZ et al., 2013, EITEMAN; RAMALINGAM, 2015). O *L. plantarum* se encontra no grupo dos micro-organismos que possuem ambas as enzimas, portanto, produz um racemo de isômeros de ácido láctico.

A tabela 5 apresenta os micro-organismos e o(s) referente(s) isômero(s) de ácido láctico por eles produzido(s).

Tabela 5: Relação dos micro-organismos utilizados em processos fermentativos para obtenção de seus respectivos isômeros de ácido láctico. (VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; MARTINEZ et al., 2013).

Micro-organismo	Isômero de ácido láctico produzido
Bactérias	
<i>Lactobacillus lactis</i>	L(+)
<i>Lactobacillus casei</i>	L(+)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L(+)
<i>Bacillus coagulans</i>	L(+)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	D(-)
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	L(+)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	L(+) e D(-)
Fungos	
<i>Rhizopus oryzae</i>	L(+)

Como o metabolismo das bactérias lácticas pode ser limitado pela redução do pH, na produção biotecnológica, este deve ser controlado por adição de bases (NaOH, KOH ou Ca(OH)₂). No caso de utilização de NaOH, o aumento nas concentrações de Na⁺ podem inibir a fermentação, sendo necessária sua remoção para continuidade da produção (EITEMAN; RAMALINGAM, 2015).

Wang, Tashiro e Sonomoto (2015), explicaram que a relação entre a fonte de carbono e a fonte de azoto (C/N) é um dos fatores que mais afetam a produção de ácido láctico. Para uma relação C/N adequada capaz de elevar a conversão do substrato em ácido láctico, os meios podem ser complementados com fontes complexas de azoto, por exemplo, extrato de levedura, peptona, e extrato de carne. Uma produção significativamente maior ocorre quando suplementado com extrato de levedura, no entanto, este insumo eleva os custos da produção.

3.4.2 Utilização industrial do ácido láctico

O isômero D(-) não é assimilável pelo organismo humano, desta forma, os isômeros D(-) e L(+) têm destinos diferentes nas indústrias, dentre elas as indústrias de biopolímeros. Nelas, a estereoespecificidade do produto é influenciada pelas aplicações pretendidas de ácido láctico. O polímero racêmico e D(-) ou L(+)-polilactato diferem uns dos outros nas suas propriedades físicas. A presença de D(-) ou L(+)-ácido láctico com maior pureza óptica no polilactato (homopolímeros) confere maior ponto de fusão e cristalinidade ao passo que o polímero racêmico (heteropolímero) é amorfo (WANG;

TASHIRO; SONOMOTO, 2015). Os seres humanos e os animais têm apenas L-lactato desidrogenase (L-LDH) que degrada os compostos derivados de L(+)-ácido láctico, por conseguinte, D(-)-ácido láctico se acumula no sangue, resultando em problemas de saúde, como acidúria – redução do pH sanguíneo – e/ou descalcificação (VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002).

Assim, L(+)-ácido láctico é utilizado preferencialmente pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas, sendo utilizado na produção de biopolímeros para próteses a partir da polimerização do ácido láctico, formando o poliácido láctico ou polilactato (PLA) (POYATOS et al., 2011), constituintes de fios para suturas cirúrgicas, *stents* para procedimentos cardiovasculares, em procedimentos odontológicos, entre outros (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). A figura 16 apresenta alguns exemplos de utilização do PLA.



Figura 16: Utilização do polilactato na indústria médica, exemplificada pelo fio de sutura (imagem superior à direita) e um *stent* (imagem inferior à direita), e na indústria de plásticos e embalagens biodegradáveis (imagem à esquerda).

Segundo Evangelista e Nicolov (1996), eram produzidos cerca de 36 mil toneladas de ácido láctico em todo o mundo por ano. Segundo Hofvendahl e Hägerdal (2000), a produção anual mundial alcançou 80 mil toneladas. Cerca de 70% a 85% de todo o ácido láctico produzido destina-se a indústria alimentícia, principalmente na produção de queijos e iogurtes (EVANGELISTA; NICOLOV, 1996; JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; MARTINEZ et al., 2013). A figura 17, apresenta alguns alimentos nos quais possuem o ácido láctico em suas formulações, agindo como acidulante.



Figura 17: Exemplos de alimentos que contêm ácido láctico como acidulante.

Na indústria farmacêutica, o ácido láctico é utilizado na produção de cosméticos por ser um hidratante e inibir a proliferação de micro-organismos, além de ser utilizado na produção de drogas para tratamento de osteoporose (MARTINEZ et al., 2013). Encontram-se, na figura 18, exemplos de produtos cosméticos e de higiene, cujas composições incluem o ácido láctico.



Figura 18: Produtos cosméticos e de higiene pessoal com ácido láctico em suas constituições.

Com os mercados de ácido láctico e de probióticos cada vez mais crescentes, faz-se necessária uma análise de custos utilizando diferentes matérias primas, assim como, uma análise de mercado mais detalhada. No próximo item, serão abordados assuntos referentes à análise de custos de uma forma geral e a análises de mercado referentes aos produtos obtidos a partir do ácido láctico e de *L. plantarum*.

3.5 ANÁLISES DE CUSTOS E DE MERCADO

Um dos objetivos deste trabalho requer analisar os custos para as produções de ácido láctico e de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580, por isso, neste capítulo, serão abordados alguns conceitos relevantes sobre análises de custos, bem como uma breve análise de mercado destes produtos.

De acordo com Dubois, Kulpa e Souza (2009), um empreendimento deve ser administrado focando em suas funções básicas: planejamento, execução e controle. A rentabilidade e a liquidez de uma empresa dependem de uma gestão competente que garanta tais funções.

A partir de alguns métodos e roteiros específicos, podem-se planejar os trabalhos para qualquer tipo de empreendimento. O **planejamento** é um processo de ações coordenadas com objetivos específicos. Após o planejamento, cabe executá-lo, colocando suas atividades em andamento. Durante a **execução**, a empresa buscará aproveitar de forma mais responsável os recursos disponíveis, eliminando perdas, desperdícios e ociosidades. O **controle** é o monitoramento da execução das atividades enquanto elas ocorrem. A contabilidade de custos serve ao controle por fornecer dados e informações que podem auxiliar a alta direção de uma empresa na tomada de decisões, inclusive alterando o planejamento (DUBOIS, KULPA e SOUZA, 2009).

Os gastos que representam a aquisição de bens e/ou serviços que serão utilizados na produção de outros bens e/ou serviços são conhecidos como custos. Desta forma, os custos são considerados como o valor monetário investido em recursos utilizados na elaboração de um determinado produto.

Os custos incluem exclusivamente os gastos relacionados às necessidades da produção como: matéria-prima, depreciações de equipamentos, salários dos funcionários que atuam na produção, entre outros. A aquisição de equipamentos ou máquinas é tida como investimento, do qual espera-se algum retorno em determinado momento seguindo o planejamento.

Dubois, Kulpa e Souza (2009) classificaram os custos quanto aos produtos fabricados e quanto à relação com o volume de produção. Quanto aos produtos fabricados, os custos podem ser separados em diretos e indiretos. De acordo com a relação do volume de produção, os custos podem ser classificados em fixos ou variáveis. Ainda, segundo estes autores, a maioria dos custos indiretos são custos fixos., Para Martins (2010), a maioria dos custos diretos são custos variáveis.

3.5.1 Componentes do custo de produção em relação ao volume produzido

Martins (2010) ressaltou que esta classificação dos custos é a mais importante dentre todas as outras por considerar a relação entre o valor total de um custo e o volume de produção numa unidade de tempo. Podem ser divididos em custos variáveis e fixos.

3.5.1.1 *Custos variáveis (CV)*

São os custos que têm seus valores alterados em função do volume produzido, ou seja, se a produção aumentar, os custos variáveis também aumentarão. Por exemplo, para produzir um determinado material, há necessidade de consumir matéria-prima, logo, para maior produção, haverá necessidade de um maior consumo de matéria-prima, elevando os CV. Dubois, Kulpa e Souza (2009) explicaram que estes custos variam de forma diretamente proporcional ao volume de produção. Martins (2010) reforçou que esta variação de custos deve ser mensurada por períodos de tempo estabelecidos, normalmente utilizando-se o intervalo mensal para a mensuração dos custos.

3.5.1.2 *Custos Fixos (CF)*

São os custos que independente do volume da produção serão contabilizados sob a mesma demanda, por exemplo, independente do volume produzido, os custos com aluguel ou depreciação de equipamentos existirão e deverão ser pagos, pois não dependem do volume de produção para serem quitados. Tal como os CV, os CF são mensurados por um determinado período de tempo (DUBOIS, KULPA e SOUZA, 2009; MARTINS, 2010). Martins (2010) subdividiu os custos fixos em repetitivos e não repetitivos. Os custos fixos repetitivos são aqueles que apresentaram os mesmos valores em períodos de tempo diferentes, em ciclos de produção diferentes, como salários, aluguéis, entre outros. De forma antagônica, os custos fixos não repetitivos são aqueles que apresentaram seus valores alterados em intervalos de tempo diferentes, como energia elétrica, água, manutenção, entre outros.

Na determinação do custo total de produção (CT) considera-se o somatório dos CF e dos CV, ou ainda, dos custos diretos e indiretos. Além destes tipos de custos, existem ainda os custos mistos que apresentam uma parcela variável e outra fixa que existirá mesmo que nada seja produzido. Por exemplo, o custo com água pode ser variável, porém, mesmo que nada

seja produzido, a concessionária cobra uma taxa fixa mínima para fornecimento (MARTIN, 2010).

3.5.2 Custo Operacional Efetivo (COE)

O CT inclui os CV e os CF (MATSUNAGA, 1976). Já o COE, inclui apenas os CV (MORAES, 2013).

Este trabalho apresentou uma análise comparativa dos COE entre as produções de ácido láctico (ácido láctico) e biomassa de *Lactobacillus plantarum* utilizando meios de cultura diferentes. Os COE utilizando as diferentes fontes de carbono na produção de ácido láctico e *L. plantarum* são diferentes, podendo apresentar diferenças na determinação do custo total de produção. Não foram considerados os custos fixos, por terem os mesmos valores para os diferentes meios testados.

3.5.3 Orçamentação parcial

Com base nos custos obtidos, foi realizada uma orçamentação parcial (OP) comparando os benefícios e os custos obtidos nas produções de *L. plantarum* e ácido láctico utilizando melão e glicose. O melão por ser um subproduto agroindustrial e a glicose por ser um dos insumos mais utilizados na síntese biológica de ácido láctico. Além disso, a produção utilizando o meio de cultura comercial Man-Rogosa-Sharpe (MRS) também foi comparada por ser considerado um meio com suporte nutricional para um bom crescimento de LAB (LEROY; VUYST, 2001; HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003).

De acordo com Noronha (1981), a OP serve para analisar as decisões a serem tomadas em uma empresa desde que estas envolvam apenas modificações parciais na sua organização. Assim, a modificação proposta não deve alterar significativamente a organização administrativa nem o estoque de capital da empresa. Neste tipo de orçamento, comparam-se os benefícios com os custos das decisões que envolvem as modificações marginais.

Para o cálculo da OP, devem-se considerar os CF e CV da modificação e do modelo de referência e comparar com as vantagens de cada sistema de produção, isto é, com as receitas obtidas com os produtos (NORONHA, 1981). No caso deste trabalho, os CF seriam anulados, por serem incluídos de forma igualitária nos custos e nos benefícios, assim, não foram considerados nos cálculos das OP. Segundo Noronha (1981), a alternativa mais

rentável para as produções de *L. plantarum* e de ácido láctico será aquela que apresentar maiores benefícios líquidos, assim, deve-se optar pela alternativa em que os benefícios forem superiores aos custos da modificação.

Noronha (1981) ainda ressaltou três aspectos financeiros que devem ser considerados na orçamentação parcial: (1) rentabilidade: os benefícios adicionais da nova alternativa devem ser maiores que os custos adicionais envolvidos na modificação. Caso os benefícios adicionais sejam menores que os custos adicionais, a modificação não é rentável, e caso sejam iguais, a nova alternativa é rentavelmente indiferente; (2) capacidade de pagamento: uma vez comprovada a rentabilidade de uma decisão, cabe a empresa verificar a capacidade de pagamento dos compromissos assumidos com a nova alternativa; e (3) posição financeira: a decisão poderá – mesmo sendo rentável e a empresa tendo garantido a capacidade de pagamento – ter efeito sobre os indicadores de liquidez e solvência no período considerado.

Foram considerados os custos variáveis para a obtenção de *L. plantarum* e ácido láctico em escala laboratorial realizada em apenas um ciclo produtivo. Com isto, pretende-se obter os mesmos produtos com custos diferentes, possibilitando a escolha da alternativa mais vantajosa para a fabricação. Cabe ressaltar, que haverá diferença apenas nos custos variáveis e, conseqüentemente, nos custos totais de produção, em condições de laboratório, por isso, não foram considerados, neste caso, os CF por terem os mesmos valores independentes da fonte de carbono testados: glicose ou melaço.

3.5.4 Análise de mercado do ácido láctico

O ácido láctico pode ter diferentes aplicações servindo como matéria-prima para diversas indústrias de segmentos variados, tais como: indústria de biopolímeros, indústria farmacêutica, indústria alimentícia. No Brasil, uma unidade produtora de ácido láctico da PURAC, é tida como umas das principais produtoras no mundo (JHON; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Na indústria de biopolímeros, o polilactato tem ganhado destaques por sua utilidade em diferentes segmentos, desde embalagens biodegradáveis a materiais médicos.

Como acidulante, é componente de diversos alimentos industrializados em conservas, diminuindo o pH e aumentando o tempo de viabilidade do alimento.

Para todos estes segmentos, o ácido láctico produzido – seja em processos químicos ou biotecnológicos – precisa ser purificado. Gonzalez et al. (2007) afirmaram que os maiores custos na produção de ácido láctico estão alocados na etapa de *downstream*. Segundo eles, a

purificação do ácido láctico é a etapa com custos mais elevados, tendo incentivado a pesquisa de diferentes metodologias para esta tarefa.

3.5.4.1 Mercado de biopolímeros

O mercado mundial de plásticos é estimado em cerca de 200 milhões de toneladas por ano. No Brasil, estima-se em 4 milhões de toneladas por ano. Destes, 20% são descartados na natureza sem qualquer tratamento (BASTOS, 2007). Estas informações sugerem que novas tecnologias de geração de polímeros biodegradáveis e de origem sustentável, os biopolímeros, podem ocupar uma parcela considerável destes mercados, dentre eles o polilactato (PLA) originado da polimerização de ácido láctico.

De acordo com um relatório recente da *Research and Market* (apud NNFCC, 2015), o mercado de plásticos biodegradáveis deve atingir 804,58 toneladas em 2020, registrando uma taxa de crescimento de 12,5% entre 2015 e 2020. Em termos de valor, o mercado está projetado para chegar a US\$ 3,4 bilhões em 2020, em uma taxa de crescimento de 10,8% entre 2015 e 2020.

Os plásticos biodegradáveis vêm ganhando maior popularidade a partir da última década. O mercado de plásticos biodegradáveis ainda representa 1% do mercado global de plásticos, sendo a Europa Ocidental e a América do Norte os maiores consumidores. Porém, como visto no parágrafo anterior, esta parcela deve aumentar nos próximos anos, com investimentos em novos processos de fabricação que pode resultar em preços mais baixos (NNFCC, 2015).

Patenteado na década de 1950 pela DuPont, o PLA começou a ser produzido em escala industrial a partir de 1997. Em 2006, suas vendas alcançaram cerca de US\$ 100 milhões (BASTOS, 2007).

3.5.4.2 Mercado de ácido láctico na indústria de alimentos

Entre 2004 e 2012, o mercado mundial de aditivos alimentícios para humanos cresceu 3,8% ao ano (maior taxa de crescimento que o PIB mundial de 3,7%). Estima-se que de 2012 até 2018, o crescimento seja de 4,5% por ano, totalizando em US\$ 28 bilhões. Este crescimento deve-se principalmente: (1) ao aumento da população mundial, (2) ao aumento da renda *per capita* e (3) mudança dos hábitos de consumo (BNDES, 2014).

Seguindo as tendências mundiais, estima-se que o mercado brasileiro de aditivos alimentares movimentou 654 milhões de dólares em 2012, com taxa de crescimento entre 2004 e 2012 de 4,2% ao ano e estimativa de 5,5% ao ano para o período de 2012 a 2018. Espera-se um crescimento de 6% ao ano no mercado brasileiro entre 2012 e 2018 apenas para conservantes e acidulantes de alimentos (BNDES, 2014), categoria na qual se enquadra o ácido láctico.

3.5.4.3 Mercado de ácido láctico na indústria de cosméticos

Como é um alfa-hidroxiácido, o ácido láctico pode ser utilizado como princípio ativo de diferentes formulações cosméticas voltadas para diferentes tipos de tratamentos para a pele, dentre eles: hidratação, esfoliação, *peeling* e antirrugas (NARDIN; GUTERRES, 1999).

Em 2012, o mercado mundial de cosméticos e higiene pessoal arrecadou, aproximadamente, 433 bilhões de dólares. Entre 2008 e 2012, o faturamento mundial destas indústrias cresceu em média 4,1% ao ano. Já as indústrias brasileiras cresceram cerca de três vezes mais: 12,4% ao ano, em média (BNDES, 2014).

Alguns fatores foram responsáveis pelo impulso nas indústrias de cosméticos e de higiene pessoal no Brasil, dentre eles: (1) aumento da renda *per capita* no país, (2) aumento da participação das mulheres no mercado de trabalho, (3) aumento da expectativa de vida da população (BNDES, 2014), (4) modernização das instalações industriais, (5) redução de impostos federais, (6) aumento da produtividade e (7) inovações de produtos (ABDI, 2009).

Segundo a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2009), o setor da indústria de cosméticos responsável pelos cuidados da pele – onde está inserido o principal uso do ácido láctico em cosméticos – no Brasil, ocupava a oitava posição do mercado mundial. Em 2012, o mercado brasileiro representava o terceiro maior mercado do mundo. Com faturamento de cerca de 41,8 bilhões de dólares, o Brasil ficando atrás apenas dos Estados Unidos e do Japão (BNDES, 2014). Em 2006, este mercado passou a ser o principal segmento do mercado de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos no mundo, chegando a atingir valores de 60 bilhões de dólares (ABDI, 2009).

3.5.5 Análise de mercado de *Lactobacillus plantarum* como probióticos

Problemas gastrointestinais acarretam duas a cada dez pessoas em todo mundo. Cerca de 33 milhões de lares norte-americanos tem um integrante com constipação, por isso,

em 2011, 17% dos norte-americanos consumiram alimentos ou bebidas com probióticos. Destes, 42% buscaram nos probióticos uma maneira para regularizar a digestão. A favor disso, as indústrias alimentícias lançaram na última década, mais de 500 novos produtos contendo probióticos (ITAL, 2014).

Em 2011, o mercado mundial de probióticos faturou cerca de 27,9 bilhões de dólares. Segundo as estimativas de crescimento anual médio de 6,8% entre 2013 e 2018, este valor deve chegar a 44,9 bilhões de dólares (ITAL, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Com abordagem hipotético-dedutiva, a natureza desta pesquisa foi aplicada (MARCONI; LAKATOS, 2011). Os métodos de procedimentos utilizados foram: (1) Bibliográfico, por consultar diferentes artigos científicos e livros referentes aos assuntos tratados para embasamento teórico; (2) Experimental, por testar hipóteses e ser realizado de forma controlada em laboratório; e (3) Estatístico, para corroborar ou não os resultados encontrados (GERHARDT; SILVEIRA, 2009).

4.1 MICRO-ORGANISMO UTILIZADO

As cepas liofilizadas de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello (FAT), situada em Campinas, São Paulo.

4.2 MELAÇO UTILIZADO

Foi utilizado melaço comercial, adquirido em loja de produtos naturais.

4.3 PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

O metabolismo das bactérias liofilizadas foi ativado em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS). Após o crescimento microbiano, as bactérias foram repicadas em meio MRS e Agar, preparados de acordo com as instruções do fabricante, em tubos de ensaio esterilizados a 120°C e 1 atm. durante 15 minutos em autoclave Prismatec® CS. Os tubos contendo as bactérias foram incubados a 35°C por 24h, seguindo para armazenamento em refrigerador mantido entre 2°C e 8°C para utilização posterior.

4.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo utilizado foi preparado em 50 mL de caldo MRS em erlenmeyer com capacidade para 125 mL, esterilizado a 120°C e pressão de 1atm por 15 minutos. As bactérias repicadas em tubo de ensaio foram transferidas para o meio em câmara de fluxo laminar

Pachane® PA 420 devidamente higienizada. Após a preparação, a cultura foi incubada a 35°C por 24 horas.

Antes da inoculação, uma amostra de 5 mL do inóculo foi analisada, após centrifugação e descarte do sobrenadante, para mensurar a concentração de massa úmida de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580. Com base no resultado obtido, a suspensão bacteriana contendo 10 g.L⁻¹ de biomassa úmida foi construída com adição de água destilada esterilizada a 120°C e pressão de 1atm por 15 minutos.

4.5 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Foram comparadas as produções de biomassa e de ácido láctico, bem como os consumos de açúcares redutores e sacarose por *L. plantarum* CCT 0580 em diferentes meios de cultura (GLIC, MEL e MRS) a cada 24 horas por 72 horas de incubação:

- GLIC: 30 g.L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆), 3 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g.L⁻¹ de ureia (CH₄N₂O);

- MEL: melação a 8% (m/v), 3 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g.L⁻¹ de ureia (CH₄N₂O); e

- MRS: seguiram-se as instruções do fabricante HIMEDIA®, na proporção de 55,15 g para 1L de água destilada, resultando nas concentrações de 10 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆), 1 g.L⁻¹ de polissorbato 80 (C₁₈H₄₃O₂₃), 2 g.L⁻¹ de citrato de amônio (C₆H₁₄O₇N₂), 5 g.L⁻¹ de acetato de sódio (C₂H₃NaO₂), 0,10 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 0,05 g.L⁻¹ de sulfato de manganês (MnSO₄) e 2 g.L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄).

Foram preparados 198 mL de cada meio, com pH ajustados para 6,0 (± 0,05) com NaOH 10M, utilizando potenciômetro de bancada Tecnal TEC 5. Todos os caldos foram esterilizados à 120°C e pressão de 1atm por 15 minutos em autoclave vertical Primatec CS (75L).

4.6 CONDIÇÕES DE CULTURA

Após esterilização dos caldos, foram adicionados em cada frasco 2 mL do inóculo com concentração de 10 g.L⁻¹ de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, resultando em uma concentração final de 0,1 g.L⁻¹ de biomassa. Dos 200 mL de cada meio inoculado, 50 mL foram distribuídos em seus 3 frascos erlenmeyers de 250 mL, respectivos. Todos os frascos

foram devidamente identificados, cada um destinado à coleta de amostras para análises a cada tempo de observação (24h, 48h e 72h). Os 50 mL restantes de cada meio foram tratados como o tempo inicial (tempo 0). Os frascos foram incubados a 35°C sem agitação, uma vez que, segundo Hwang et al. (2012), a produção de *L. plantarum* é maior que em agitação.

4.7 ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO

A concentração de biomassa foi analisada pela massa úmida obtida a cada tempo. Foram coletados 5 mL de amostra de cada frasco em tubos cônicos plásticos com capacidade para 10 mL. Centrifugou-se a 450g em centrífuga Centribio® 80-2B por 20 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados para análises posteriores de pH, ácido láctico e açúcares. Drenou-se o remanescente do sobrenadante por inversão em papel absorvente e compararam-se as massas obtidas dos tubos cônicos limpos e secos com as massas obtidas após a centrifugação. As massas foram aferidas em balança analítica Shimadzu® AW 220.

4.8 ANÁLISE DO CONSUMO DE AÇÚCARES

As concentrações de açúcares redutores (AR) foram obtidas pela reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que oxida grupos funcionais aldeído e cetona dos AR, sendo reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (MARQUEZ, 2007). O DNS foi preparado com uma solução de hidróxido de sódio 2N (16 g de NaOH em 200 mL de água destilada), em seguida, preparou-se a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) (10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 500 mL de água destilada). Foram misturadas a solução DNS e a solução NaOH 2N, a solução resultante foi incorporada a 300g de sal de Rochelle ($KNaC_4H_4O_6$) (tartarato de sódio e potássio) em banho-maria a 40°C. Completou-se com água destilada até 1000 mL (MARQUEZ, 2007).

Para a reação com DNS, amostras dos sobrenadantes de cada meio de cultura a cada tempo foram diluídas 10x em água destilada. Foram utilizados 1 mL das amostras diluídas e 1 mL do reativo DNS. Após aquecimento a 100°C por 5 minutos, completou-se o volume com 13 mL de água destilada. A absorbância de cada solução foi mensurada utilizando o analisador bioquímico semi-automático Quick-Lab® em comprimento de onda de 546 nm, comparando-se com a curva padrão de concentrações de glicose variando entre 0,0 e 3,125 g.L⁻¹.

As concentrações de glicose foram medidas a partir de uma adaptação de Daudt e Simon (2001), utilizando o método enzimático BioTécnica®, constituído por: tampão fosfato $182,42 \text{ mmol.L}^{-1}$, glicose oxidase $>15000 \text{ U.L}^{-1}$, peroxidase $>1200 \text{ U.L}^{-1}$, 4-aminoantipirina $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e fenol 10 mmol.L^{-1} . A enzima glicose oxidase na presença de oxigênio molecular oxida a glicose, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido glucônico. Com a enzima peroxidase, ocorre a oxidação do fenol a partir do peróxido de hidrogênio na presença de 4-aminoantipirina a 37°C por 10 minutos em banho-maria, formando quinonimina, um composto de cor rósea com intensidade proporcional à concentração de glicose.

As amostras dos sobrenadantes de cada meio de cultura a cada tempo foram diluídas 5x em água destilada. De acordo com as instruções de trabalho do kit para análise clínica de glicose BioTécnica®, foram utilizados $10 \mu\text{L}$ de cada amostra diluída em 1 mL da solução contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase. As concentrações de glicose foram obtidas a partir do analisador bioquímico semi-automático Quick-Lab® no modo absorvância em comprimento de onda de 505 nm , comparando-se com o padrão de glicose fornecido no próprio kit BioTécnica®.

As concentrações de frutose foram estimadas pelas concentrações dos compostos determinados pela reação com DNS e as concentrações de glicose obtidas com o kit BioTécnica®. A equação 1 foi utilizada nesta estimativa.

$$[\text{Frutose}] = [\text{AR}] - [\text{Glicose}] \quad \text{Eq. 1}$$

Na qual,

[Frutose]: Concentração de frutose em g.L^{-1} ;

[AR]: Concentração de açúcares redutores em g.L^{-1} , obtida pela reação com DNS; e

[Glicose]: Concentração de glicose em g.L^{-1} , obtida pelo método enzimático BioTécnica®.

As concentrações de sacarose foram obtidas com reações das amostras com reativo Seliwanoff, constituído por 0,01% de resorcinol ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$) diluído em ácido clorídrico (HCl) à 50%, que estima a concentração de cetoses, incluindo frutose. Como sacarose é um dissacarídeo composto por glicose e frutose, o reagente Seliwanoff também determina a concentração de sacarose. Os açúcares encontrados no melaço são frutose, glicose e sacarose.

Para a determinação de cetoses utilizando o reativo Seliwanoff, as amostras dos sobrenadantes de cada meio de cultura a cada tempo foram diluídas 10x em água destilada. Foram utilizados $0,250 \text{ mL}$ de cada amostra diluída e 1 mL do reativo Seliwanoff aquecidos a

100°C por 20 minutos em banho-maria. As absorvâncias foram medidas em analisador bioquímico semi-automático Quick-Lab® em comprimento de onda de 546 nm, após resfriamento das amostras em banho-maria em temperatura ambiente. Os resultados das absorvâncias foram comparados com curva padrão com concentrações de sacarose entre 0,0 e 1,0 g.L⁻¹.

A partir das diferenças encontradas entre as concentrações de cetoses pelo Seliwanoff e as concentrações de frutose estimadas, pode-se calcular as concentrações de sacarose. A Eq. 2 representa os cálculos realizados para estas estimativas.

$$[\text{Sacarose}] = [\text{Cetoses}] - [\text{Frutose}] \quad \text{Eq. 2}$$

Na qual,

[Sacarose]: Concentração de sacarose em g.L⁻¹;

[Cetoses]: Concentração de cetoses em g.L⁻¹, determinada pela reação com Seliwanoff; e

[Frutose]: Concentração de frutose em g.L⁻¹, obtida pela Eq.1.

As concentrações de açúcares totais (AT) foram calculadas a partir da soma das concentrações de açúcares redutores (obtidas com DNS) com as concentrações de sacarose. A Eq. 3 representa a forma de obtenção dos valores das concentrações de AT.

$$[\text{AT}] = [\text{AR}] + [\text{Sacarose}] \quad \text{Eq.3}$$

Na qual,

[AT]: Concentração de açúcares totais em g.L⁻¹;

[AR]: Concentração de açúcares redutores em g.L⁻¹, obtida pela reação com DNS; e

[Sacarose]: Concentração de sacarose em g.L⁻¹, obtida na Eq. 2.

Todas as curvas padrões e equações de suas retas foram obtidas utilizando o *software* Br.Office.org Calc®, bem como, os cálculos das concentrações de açúcares.

4.9 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL E DE ÁCIDO LÁCTICO

Para a estimativa da concentração de ácido láctico gerada pelos micro-organismos, utilizou-se a técnica de acidez titulável em graus Dornic. Os sobrenadantes das amostras coletadas de cada meio de cultura em seu respectivo tempo de incubação foram diluídos 3 vezes (2 mL de amostra e 4 mL de água destilada) em erlenmeyer de 100 mL com boca larga. Acrescentou-se 2 gotas de fenolftaleína alcóolica a 1% e titulou-se com NaOH 0,111M, fatorada com solução de biftalato de potássio ($C_8H_5O_4K$), até obter uma coloração rósea.

De acordo com esta metodologia, considera-se o volume de NaOH 0,111M utilizado na titulação como o volume de ácido láctico contido na solução.

4.10 ANÁLISES DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

As análises de produtividade de biomassa de *L. plantarum* e de ácido láctico foram calculadas de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente.

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{Eq.4}$$

Na qual,

Q_p : produtividade de ácido láctico em $g.L^{-1}h^{-1}$;

ΔP : diferença entre as concentrações inicial e final de ácido láctico em $g.L^{-1}$; e

Δt : diferença entre o tempo final e o inicial em horas (h).

$$Q_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad \text{Eq.5}$$

Na qual,

Q_x : Produtividade de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 em $g.L^{-1}h^{-1}$;

ΔX : diferença entre as concentrações inicial e final de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 em $g.L^{-1}$; e

Δt : diferença entre o tempo final e o inicial em horas (h).

Os rendimentos de AR em ácido láctico e biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 para cada meio testado, foram obtidas pelas equações 6 e 7, respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad \text{Eq. 6}$$

Na qual,

$Y_{p/s}$: Conversão de substrato (açúcares redutores) em ácido láctico;

ΔP : diferença entre as concentrações inicial e final de ácido láctico em g.L^{-1} ; e

ΔS : diferença entre as concentrações final e inicial de açúcares redutores em g.L^{-1} .

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{Eq. 7}$$

Na qual,

$Y_{x/s}$: Conversão de substrato (açúcares redutores) em biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580;

ΔX : diferença entre as concentrações inicial e final de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 em g.L^{-1} ; e

ΔS : diferença entre as concentrações final e inicial de açúcares redutores em g.L^{-1} .

4.11 ANÁLISES DOS CUSTOS

Foram orçados os preços de todos os materiais necessários para a pesquisa entre agosto de 2015 e janeiro de 2016, totalizando 6 meses. Estes dados foram obtidos em diferentes lojas virtuais a cada mês, a fim de se obter uma maior variação dos custos, resultando em um preço médio que refletisse a real variação do mercado. Os valores obtidos em cada período foram deflacionados, ou seja, monetariamente corrigidos com base no Índice Geral de Preços – Disponibilidade Interna (IGP-DI), publicado pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Para esta correção, adotou-se o mês de janeiro de 2016 como base para a correção, isto é, como base 100, servindo como referência para os preços dos períodos anteriores. Após a correção dos valores a cada mês, foram obtidos os preços médios de cada item.

Os custos operacionais efetivos (COE) para as produções de biomassa de *Lactobacillus plantarum* e ácido láctico foram obtidos a partir dos custos variáveis, incluindo para a produção de biomassa: melaço, glicose (dextrose), MRS, ureia, peptona e extrato de levedura. No caso da produção de ácido láctico, incluem-se além dos itens constituintes dos

meios de cultura, citados anteriormente, os custos com os reagentes analíticos: NaOH, biftalato de potássio, fenolftaleína e álcool absoluto. A equação 8 relaciona COE com CV.

$$\text{COE} = \text{CV} \quad \text{Eq.8}$$

Na qual,

COE: Custo operacional efetivo; e

CV: Custo variável.

4.12 ANÁLISES DAS ORÇAMENTAÇÕES PARCIAIS

Para a orçamentação parcial, seguiu-se a metodologia de Noronha (1981), a partir das comparações entre os benefícios (receitas) e os custos de uma nova alternativa de produção em relação aos meios de produção já padronizados. As receitas incluem a arrecadação de valores obtidos com a comercialização dos produtos principais (biomassa de *L. plantarum* e ácido láctico) considerando os valores médios deflacionados encontrados no mercado e do resíduo dos meios de cultura, valorizados em R\$ 0,01/L. Os custos incluem os valores gastos na aquisição dos meios de cultura e dos reagentes analíticos, ou seja, os custos variáveis. Nesta etapa do trabalho, considerou-se a produção de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 e ácido láctico em meio GLIC, já que a glicose é uma das fontes utilizadas na produção de ácido láctico por fermentação (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015). Foi realizada, em complemento às análises, uma possível substituição da utilização de glicose e melação por MRS. A orçamentação parcial seguiu a equação 9:

$$\text{OP} = (\text{B1} + \text{B2}) - (\text{C1} + \text{C2}) \quad \text{Eq.9}$$

Na qual,

OP: Orçamentação Parcial.

B1: Benefício da receita obtida com a nova alternativa.

B2: Benefício em desprezar o custo com o método controle ou atual, trata-se dos custos obtidos com as produções a partir destes métodos.

C1: Custo com a produção a partir da nova alternativa.

C2: Custo por considerar a receita com o método controle ou atual que deixou de ser obtida, trata-se da receita obtida a partir destes métodos.

Se os benefícios da nova alternativa superarem os custos, a substituição pela nova alternativa pode ser rentável. Caso os custos superem os benefícios, a nova alternativa deve ser desconsiderada. Custos e benefícios sendo iguais, a alteração não representará ganhos efetivos, mas poderá gerar mais ou menos custos relacionados a outros fatores da produção, tais como: armazenamento, frete, disponibilidade, tempo de viabilidade, dentre outros.

Assim:

$OP > 0$ Aceita-se a nova alternativa, pela superação dos benefícios em relação aos custos do emprego da nova alternativa.

$OP = 0$ Não há diferenças entre os benefícios e custos da nova alternativa e a anterior.

$OP < 0$ Rejeita-se a nova alternativa, pela superação dos custos em relação aos benefícios do emprego da nova alternativa.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos (meios de cultura) e duas repetições.

Os dados das amostras dos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade ($p=0,05$), a partir do *software* Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011) utilizando planilhas de dados do BrOffice Calc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE AÇÚCARES NO MELAÇO

O melaço utilizado no experimento foi analisado seguindo a metodologia citada para as dosagens de açúcares. Encontrou-se uma concentração de sacarose de 42% e de açúcares redutores (AR) de 37%, sendo 27% frutose e 10% glicose, resultando em 79% de açúcares totais.

Diversos autores encontraram, de fato, uma concentração maior de sacarose em relação aos AR em melaços, dentre eles, Feltrin et al. (2000) que, utilizaram um melaço com 48,5 de açúcares totais, sendo 33,78% sacarose e 14,72% AR. Haully; Oliveira e Oliveira (2003) utilizaram um melaço com 66% de açúcares totais, dos quais, 50% eram sacarose e 16% eram AR. Este melaço foi obtido na Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda)-PR. O melaço utilizado no trabalho de Oliveira, Buzato e Haully (2005) foi procedente da mesma usina COROL e apresentava 70% de açúcares totais, sendo 54% de sacarose e 16% de AR. Estas concentrações foram obtidas em melaço descartado pela indústria açucareira, após reciclagem do melaço no processo de obtenção de sacarose.

Neste trabalho, no entanto, foi utilizado um melaço comercial, rico em nutrientes.

5.2 PROCESSO FERMENTATIVO

5.2.1 Consumo de açúcares

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações iniciais de AR em GLIC e MEL, permitindo comparar as produções de ácido láctico (ácido láctico) e de biomassa entre estes meios. Em MRS, tratamento testemunha, também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de AR inicial ($20,8 \text{ g.L}^{-1}$) e a esperada ($20,0 \text{ g.L}^{-1}$) de acordo com o fabricante, indicando que o meio foi preparado adequadamente.

Os sobrenadantes dos meios GLIC e MRS não reagiram ao Seliwanoff, confirmando a não ocorrência de cetoses nestes meios, sendo a glicose suas fontes de carbono. Em MEL, foram encontradas as concentrações iniciais de $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, $20,7 \text{ g.L}^{-1}$ de frutose e $33,7 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de AR em GLIC apenas nas primeiras 24h, o mesmo sendo encontrado no meio MEL. Em MRS, houve diferença até

48h de incubação. Evidenciando a continuidade do processo fermentativo em MRS por um tempo mais prolongado que nos meios GLIC e MEL.

Analisando as concentrações de sacarose no meio MEL, verificou-se não haver diferença significativa ($p>0,05$) entre as médias das concentrações de sacarose ao longo da fermentação, indicando o consumo dos AR.

Apesar da maioria dos autores relatarem a preferência pelo consumo de glicose em relação ao consumo de frutose (SILVA et al., 2010; PAUCEAN et al., 2013; MOUSAVI et al., 2013), houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as concentrações de frutose nas primeiras 24h, mas não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nas concentrações de glicose ao longo do tempo de fermentação, revelando o favorecimento do consumo de frutose.

Taranto, Valdez e Perez-Martinez (1999), descreveram a preferência pelo consumo de frutose em relação ao consumo de glicose, uma vez que PTS-frutose não depende da concentração de prótons, logo, com a redução rápida do pH no meio MEL em 24h, a frutose foi assimilada, além disso, a deficiência de fosfato pode ter inibido consideravelmente a utilização da glicose.

A figura 19 ilustra o consumo dos açúcares redutores por *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 no meio MEL.

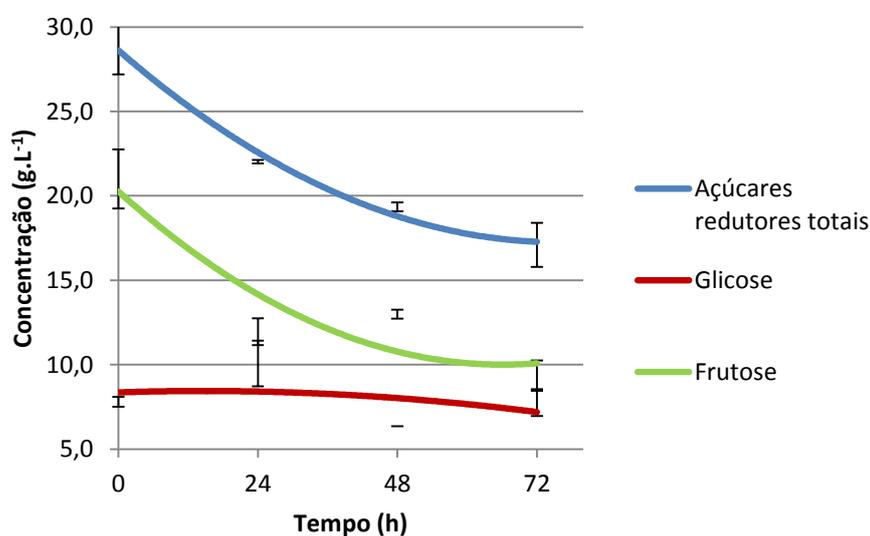


Figura 19: Consumo de açúcares redutores por *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 no meio MEL em relação ao tempo de fermentação.

Paucean et al. (2013), ao estudarem o consumo de glicose e sacarose por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, verificaram a conversão de sacarose em glicose e frutose pelas bactérias. Eles partiram de um meio com concentrações de 2 g.L⁻¹ de glicose

complementado com 15 g.L^{-1} de sacarose. Os açúcares foram totalmente consumidos entre 08h e 10h de fermentação a 30°C em agitação de 150 RPM.

Com base nos resultados, pode haver uma preferência do *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 por açúcares redutores ao invés da sacarose. Vrancken et al. (2011) estudaram a produção de biomassa e de ácido láctico por *L. plantarum* IMDO130201 isolado de trigo em diferentes pH. Todos os resultados em pH variando entre 3,5 e 5,5 apresentaram um consumo de sacarose, porém, somente após um decréscimo significativo de frutose e glicose.

Feltrin et al. (2000) estudaram a produção de biomassa de *L. plantarum* ATCC 8014 comparando dois meios contendo melaço com o meio MRS. O meio 1 era constituído por melaço a 3% enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de citrato de amônio e 0,5% de acetato de sódio. Já o meio 2 era constituído por melaço a 3% enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de acetato de sódio, 0,5% de fosfato de amônio, 0,5% de citrato de amônio, 0,1% Tween 80 e sulfato de manganês. Eles observaram o processo fermentativo por 24h de incubação a 35°C com agitação de 150 rpm em fermentador com capacidade para 3,5L. Analisando o consumo médio de açúcares totais disponíveis, eles observaram maiores consumos nos meios MRS e Meio 2, comparados ao Meio 1, respectivamente, 87,21%, 83,80% e 60,11%. Pode-se perceber que nos meios contendo melaço, o consumo de AR foi inferior ao consumo no meio MRS, tal como o encontrado no meio MEL.

A partir dos dados da tabela 6, pode-se observar o consumo de AR em 24h de incubação a 35°C nos meios MRS, GLIC e MEL, respectivamente, 62,43%, 13,75% e 25,35%.

5.2.2 Produção de ácido láctico e biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580

Os dados dos consumos de AR e produções de ácido láctico e *L. plantarum* CCT 0580 estão representados na tabela 6.

A figura 20 relaciona a produção de ácido láctico e de biomassa a partir do consumo de AR em cada meio testado.

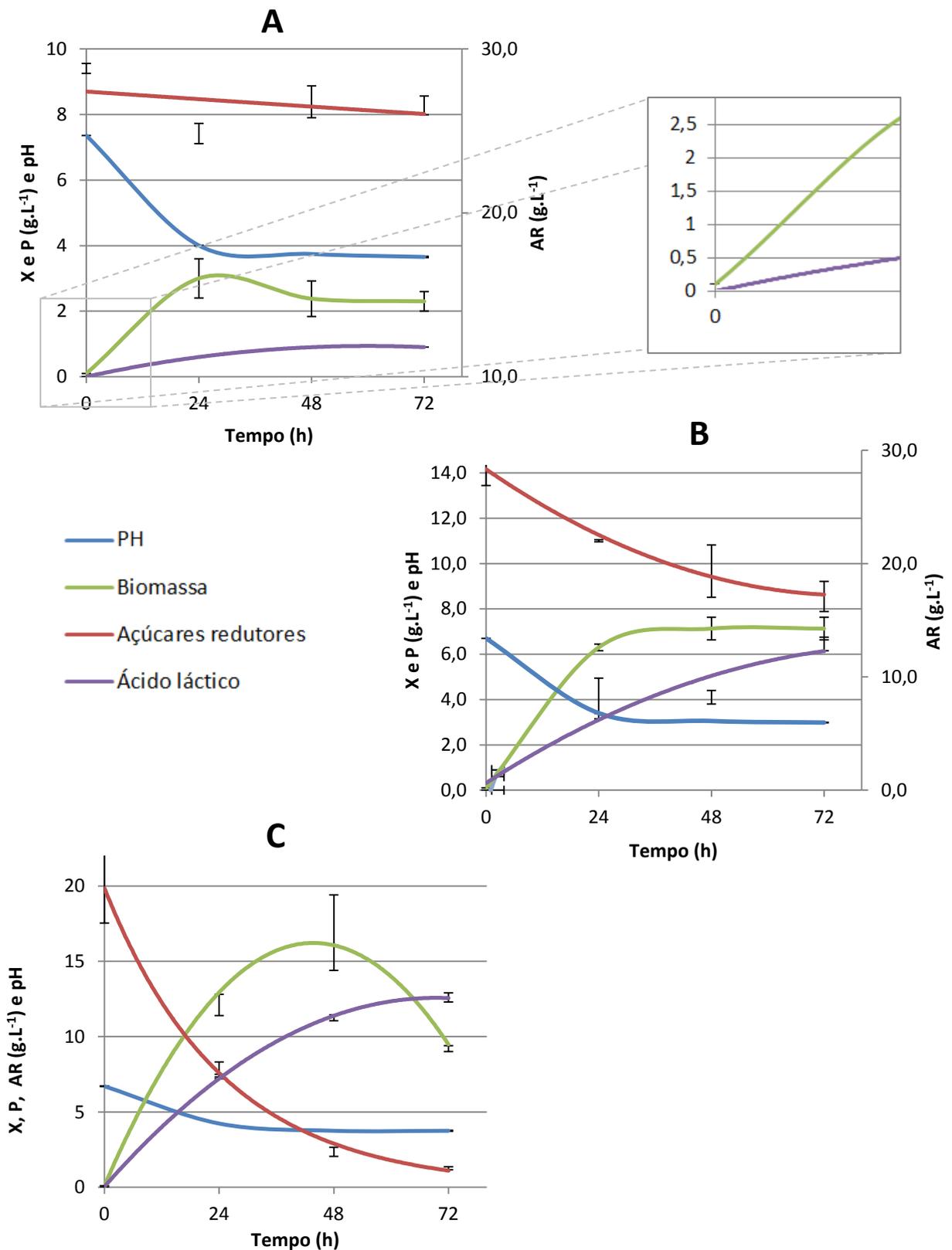


Figura 20: Correlação entre o consumo de açúcares redutores (AR) e as produções de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 (X) e de ácido láctico (P) nos diferentes meios testados: GLIC (A), MEL (B) e MRS (C). Em incubação de 35°C sem agitação. Em destaque, a concentração inicial de biomassa (0,1 g.L⁻¹), evidenciando não se tratar de geração espontânea em todas as culturas testadas.

As variações de pH no meio GLIC foram significantes ($p < 0,05$) durante todos os tempos de incubação. Nos meios MEL e MRS, as variações foram significativas até 48h de incubação. A tabela 7 mostra as médias de pH anteriores à esterilização dos meios e a cada tempo da fermentação. Pode-se perceber que houve aumento do pH nos meios após a esterilização a 120°C e 1 atm. durante 15 minutos com diferença significativa ($p < 0,05$).

Paucean et al. (2013) verificaram a redução do pH de 6,12 para menor que 4,0 em 24h de fermentação por *L. plantarum* ATCC 8014, atingindo estabilidade entre 20h e 22h de fermentação.

As concentrações de ácido láctico no meio GLIC apresentaram diferenças significantes ($p < 0,05$) até 48h de incubação. No meio MEL, as concentrações de ácido láctico variaram significativamente ($p < 0,05$) até 72h de incubação, excetuando-se o intervalo entre 24h e 48h, que não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Em MRS, as concentrações de ácido láctico variaram significativamente ($p < 0,05$) até 72h de incubação.

As maiores concentrações de ácido láctico nos meios GLIC, MEL e MRS foram 0,9 g.L⁻¹, 6,5 g.L⁻¹ e 12,6 g.L⁻¹, respectivamente. Todos em 72h de incubação.

Pode-se perceber a correlação indiretamente proporcional entre a concentração de ácido láctico e de AR em todos os meios testados (figura 20).

Em 72h, as concentrações de ácido láctico nos meios GLIC, MEL e MRS foram, respectivamente, 0,9 g.L⁻¹, 6,5 g.L⁻¹ e 12,6 g.L⁻¹. Pela concentração de ácido láctico obtida no meio MEL, pode-se inferir, que este meio continha nutrientes oriundos do melaço de cana-de-açúcar suficientes para o metabolismo dos *L. plantarum* CCT 0580 em relação ao meio GLIC.

Demirci et al. (1998), testaram a produção de ácido láctico em biorreator com *L. plantarum* e *L. casei*, utilizando como fonte de nitrogênio, produtos de origem animal e marinha, suplementados ou não com 1 g.L⁻¹ de melaço e encontraram concentrações significativamente maiores de ácido láctico nos meios contendo melaço de cana-de-açúcar, seja utilizando *L. plantarum* ou *L. casei*.

Coelho et al. (2010) estudaram a produção de ácido láctico por *L. plantarum* LMISM-6 utilizando melaço, porém hidrolisado com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 20%, resultando em 100% de AR. Eles utilizaram melaço a 19,35% em biorreator com capacidade de 4,0L com agitação de 150 rpm e a 35°C e chegaram a uma concentração de 94,8 g.L⁻¹ de ácido láctico. Com base neste resultado, a hidrólise ácida do melaço, convertendo sacarose em frutose e glicose, aumentou produtividade de ácido láctico.

Tabela 6: Valores médios das concentrações de açúcares redutores (AR), ácido láctico (ácido láctico) e biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 (*L. plantarum*) em g.L⁻¹ de acordo com os tempos de fermentação a 35°C sem agitação.

Tempo	AR			Ácido láctico			<i>L. plantarum</i>		
	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS
0h	28,8 ±0,40a	28,5 ±2,3a	20,8 ±2,43cd	0,0a	0,0a	0,0a	0,1 ±0,0a	0,1 ±0,0a	0,1 ±0,0a
24h	24,8 ±0,87bc	22,0 ±0,67bcd	7,8 ±0,67e	0,6 ±0,0b	4,1 ±0,64d	7,4 ±0,21e	3,0 ±0,85bc	7,13 ±0,21cd	12,1 ±0,99e
48h	26,8 ±1,37ab	19,3 ±0,46d	2,4 ±0,46f	0,9 ±0,0c	5,0 ±0,21d	11,3 ±0,21f	2,4 ±0,76b	6,53 ±0,66bcd	16,9 ±3,54f
72h	26,6 ±0,81ab	17,1 ±0,18d	1,3 ±0,18f	0,9 ±0,0c	6,5 ±0,21e	12,6 ±0,42g	2,3 ±0,4b	7,59 ±0,66de	9,2 ±0,28de

Valores referentes a cada grupo analisado (AR, ácido láctico e *L. Plantarum*) seguidos por letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (p <0,05).

Tabela 7: Variação do pH nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação.

Tempo	GLIC			MEL			MRS*		
	Média	DP	CV(%)	Média	DP	CV(%)	Média	DP	CV(%)
Pré-esterilização	6,05	±0,00	0,00	6,00	±0,03	0,47	6,02	±0,01	0,23
0h	7,36	±0,00	0,00	6,70	±0,00	0,00	6,71	±0,01	0,11
24h	4,01	±0,01	0,18	3,24	±0,01	0,22	4,23	±0,00	0,00
48h	3,75	±0,02	0,57	3,06	±0,01	0,23	3,98	±0,01	0,36
72h	3,66	±0,02	0,58	2,99	±0,01	0,24	3,94	±0,04	0,90

* Tratamento testemunha. DP = Desvio Padrão. CV = Coeficiente de Variação.

Vargas, Lepsch e Branco (2015) também observaram uma maior produção de ácido láctico por *L. plantarum* CCT 0580 em MRS suplementado com melação a 5%, 10% e 15%, comparado com MRS sem suplementação em 24h e 48h de incubação a 35°C com agitação de 150 rpm. Esta diferença chegou a 27% entre as concentrações obtidas com MRS suplementado com melação 15% em 48h de incubação.

Analisando a figura 20 e tabela 6, houve aumento significativo ($p < 0,05$) de biomassa de *L. plantarum* até às 48h de cultivo no meio MRS com concentração de 16,9 g.L⁻¹. Com o aumento da concentração de ácido láctico, reduzindo o pH, e o consumo – quase total – dos AR, o crescimento das bactérias foi limitado, decrescendo com a morte de boa parcela da biomassa em 72h, chegando aos níveis de concentração encontrados em 24h ($p > 0,05$).

Nos outros meios, GLIC e MEL, as concentrações de biomassa variaram significativamente ($p < 0,05$) apenas entre o tempo inicial e as primeiras 24h, chegando ao máximo de concentração de biomassa úmida igual a 3,0 g.L⁻¹ em 24h e 7,59 g.L⁻¹ em 72h, respectivamente. Assim, para os meios GLIC, MEL e MRS os tempos de incubação necessários para a máxima produção de biomassa foram, respectivamente, 24h, 72h e 48h.

Feltrin et al. (2000) estudaram a produção de biomassa de *L. plantarum* ATCC 8014 comparando dois meios contendo de melação com o meio MRS. Eles também observaram que a produção de biomassa seca foi maior em MRS (2,22 g.L⁻¹) que nos meios contendo melação (1,37 g.L⁻¹ e 2,01 g.L⁻¹) incubados em 35°C por 24h com agitação de 150 rpm em fermentador de 3,5L.

Wu et al. (2015) testaram a produção de biomassa de *L. plantarum* utilizando leite de feijão mungo (*Vigna radiata*) de acordo com a concentração de sacarose, temperatura, concentração do inóculo e tempo de fermentação. Segundo estes autores, as melhores condições para a produção de biomassa de *L. plantarum* seriam em 5,55% de sacarose, 5,19% de inóculo, temperatura de 35,42°C em 4,89h de fermentação, resultando em viabilidade celular de 8,96 log UFC/ml.

Quanto aos rendimentos, os maiores encontrados para a produção de ácido láctico foram em MRS, seguidos por MEL e GLIC. De acordo com o esperado, considerando o MRS como meio testemunha por ser especificamente produzido para *Lactobacillus* sp e melação por conter, naturalmente, outros nutrientes inorgânicos não encontrados no meio GLIC.

Entre os rendimentos de biomassa em 72h, o meio a utilizar mais eficientemente os açúcares redutores foi o GLIC, seguido por MEL e MRS com diferenças significativas ($p < 0,05$). O maior rendimento até 72h do meio GLIC pode estar relacionado a sua menor produção de biomassa e ácido láctico (figura 20), desta forma, o baixo consumo de açúcares

redutores ($2,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 72h) foi praticamente convertido em biomassa. MRS, mesmo sendo o tratamento testemunha, apresentou o menor rendimento da conversão de açúcares redutores em biomassa por ter havido um decréscimo nas concentrações de biomassa entre 48h e 72h (figura 20).

As produtividades ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e os rendimentos (g.g^{-1}) de biomassa de *L. plantarum* e de ácido láctico em GLIC, MEL e MRS ao final do período de incubação (72h) a 35°C sem agitação estão relacionados na tabela 8.

Tabela 8: Produtividades médias de ácido láctico (Q_p) e de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 (Q_x) em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e rendimentos médios da conversão de açúcares redutores em ácido láctico ($Y_{p/s}$) e em biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 ($Y_{x/s}$) em g.g^{-1} ao final de 72h em incubação a 35°C sem agitação nos meios GLIC, MEL e MRS.

	Q_p ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ (g.g^{-1})	Q_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$Y_{x/s}$ (g.g^{-1})
GLIC	0,01a	0,40a	0,03a	0,98a
MEL	0,09b	0,52b	0,10b	0,60b
MRS	0,17c	0,64c	0,13c	0,46c

Valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nas produtividades de ácido láctico e de biomassa entre todos os meios testados em 72h de fermentação, ou seja, os meios mais produtivos de ácido láctico e biomassa foram, respectivamente, MRS, MEL e GLIC.

A figura 21 evidencia os intervalos de tempo de maior geração de biomassa de *L. plantarum* nos diferentes meios. Pode-se perceber a maior produção em menor tempo, ou seja, maior velocidade de produção no meio MRS, seguido pelos meios MEL e GLIC, respectivamente.

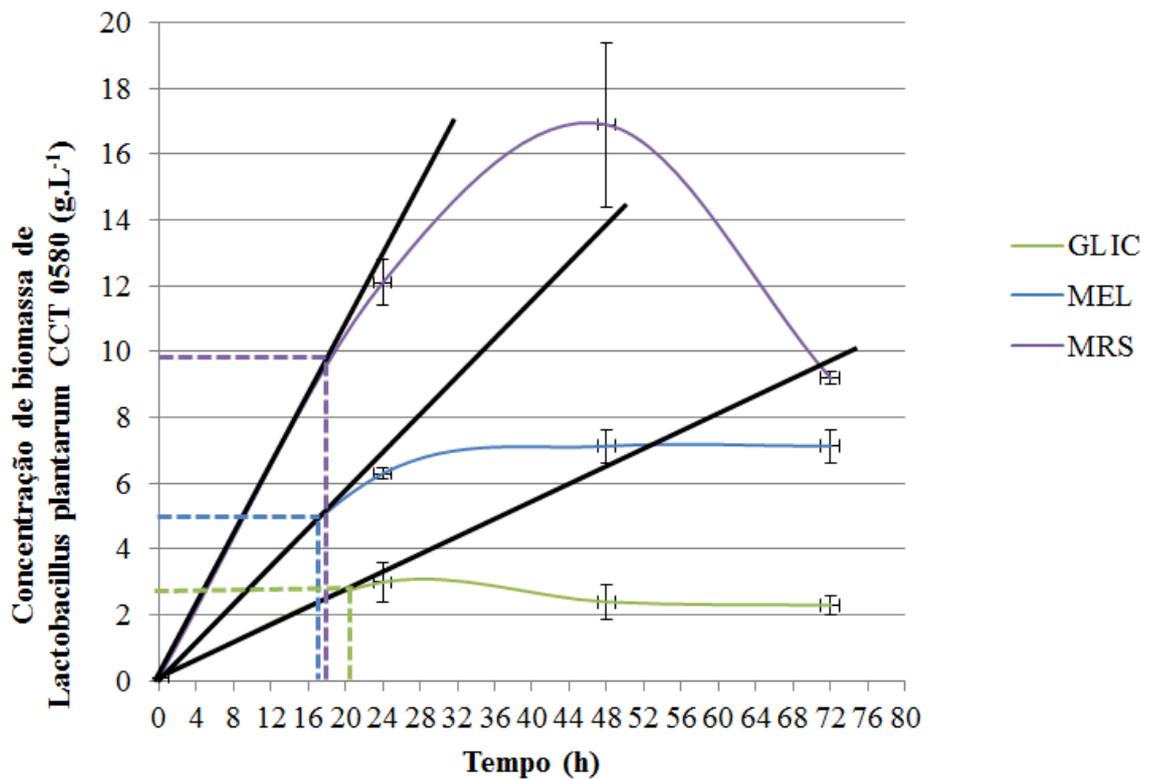


Figura 21: Intervalos de tempo de maior produção de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 de acordo com os meios de cultura GLIC, MEL e MRS.

Oliveira et al. (2009) estudaram a formação de ácido láctico por *Lactobacillus casei* utilizando melão de cana-de-açúcar a 10% e hidrolisado por invertase incubados em 37°C sob agitação de 100 rpm durante 48h. A concentração de AR inicial foi de 21 g.L⁻¹ e após a hidrólise resultou em 93,25 g.L⁻¹. Eles encontraram maior rendimento (0,76g.g⁻¹) e produtividade (1,22 g.L⁻¹.h⁻¹) no meio contendo melão suplementado com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Comparando com Oliveira et al. (2009), para 48h de fermentação, foram encontrados rendimento de 0,54 g.g⁻¹ e produtividade de 0,10 g.L⁻¹.h⁻¹ de ácido láctico no meio MEL. Mesmo utilizando LAB diferentes, Oliveira et al. (2009), encontraram maior produtividade e rendimento utilizando o melão hidrolisado por invertase.

Silva et al. (2010) compararam a produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* utilizando melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, fécula de mandioca e frutose. O melão, a farinha de varredura e a fécula de mandioca foram hidrolisadas enzimaticamente e suplementados igualmente com 2% de peptona e 2% de extrato de levedura. Todos foram mantidos em temperatura de 37°C e agitação de 100 rpm. Eles concluíram que, a partir do

melaço houve maior produção de ácido láctico diante a carga de nutrientes que este naturalmente apresenta em relação às demais fontes de carbono testadas por eles.

Feltrin et al. (2000) encontraram produtividades de biomassa de *L. plantarum* ATCC 8014 significativamente diferentes ($p < 0,05$), sendo a produtividade em MRS ($0,086 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) superior aos meios contendo melaço ($0,077 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,050 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), todos em 24h de incubação a 35°C com agitação de 150 rpm em fermentador de 3,5L.

Neste trabalho, foi encontrada maior produtividade de biomassa úmida de *L. plantarum* em 24h de incubação, também em MRS ($0,500 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), seguido por MEL ($0,293 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e GLIC ($0,121 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Assim como no trabalho de Feltrin et al. (2000), foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas taxas de produção de biomassa entre todos os meios testados em incubação de 24h.

5.3 ANÁLISES DE CUSTO

Poucos trabalhos trazem discussões sobre os custos operacionais efetivos (COE) e/ou custos totais (CT) a respeito da produção de ácido láctico e de biomassa de micro-organismos. No entanto, muitos autores que compararam a produção de ácido láctico e de biomassa utilizando subprodutos ou resíduos agroindustriais, afirmaram ser vantajosas estas produções a partir do melaço, considerando apenas o baixo custo deste subproduto, porém, sem a inclusão dos custos dos outros insumos necessários a sua utilização, principalmente as enzimas e reagentes ácidos necessários para a hidrólise da sacarose contida no melaço. Apresenta-se neste tópico, uma análise de COE baseada nos resultados encontrados em escala laboratorial para a produção de ácido e de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, utilizando o melaço da cana-de-açúcar comparado, principalmente, com a glicose como fontes de carbono.

5.3.1 Análises dos custos das produções de ácido láctico

A partir da tabela 9, pode-se verificar que os maiores COE para a produção de ácido láctico foram encontrados no meio GLIC para todos os tempos de incubação. Isto porque, neste meio, o rendimento de AR em ácido láctico foi o menor (tabela 8). Logo, para a produção padronizada de 1g, seriam necessárias maiores despesas com os insumos para a preparação do meio de cultura em maior volume comparado com os meios MEL e MRS. Os menores COE foram encontrados no meio MEL, que teve um rendimento de conversão de AR em ácido láctico maior que o meio GLIC e menor que o meio MRS. No entanto, o meio MEL apresentou menor custo com a fonte de carbono que o meio MRS. Assim, os menores COE para a produção de ácido láctico em GLIC (R\$ 16,37), MEL (R\$ 0,88) e MRS (R\$ 4,47) foram, respectivamente, em 48h, 72h e 72h.

A figura 22 apresenta os COE para a produção de ácido láctico em cada meio por tempo de incubação. Pode-se perceber que com o aumento da produção de ácido láctico (tabela 8), há uma redução nos COE, por isso, os custos obtidos no tempo 24h, foram maiores em todos os meios testados. O melaço, como um subproduto de baixo custo, fez a produção de ácido láctico no meio MEL apresentar os menores COE em todos os tempos de cultivo em relação aos demais meios testados.

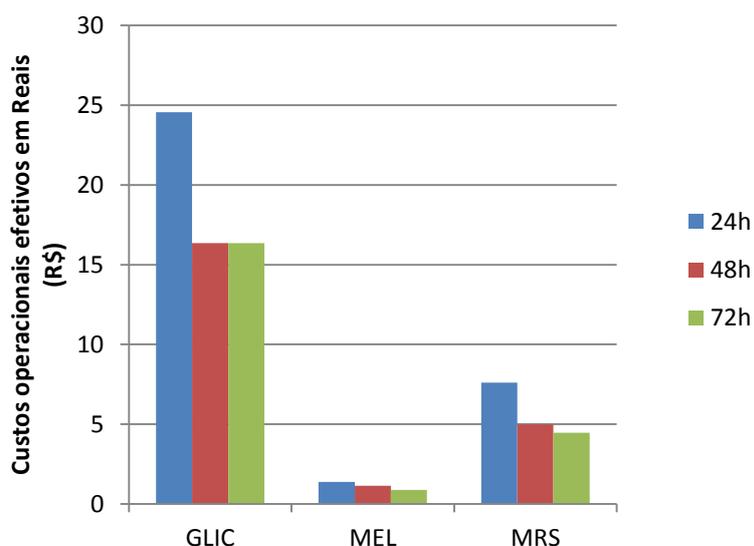


Figura 22: Custos operacionais efetivos obtidos para a produção de ácido láctico nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação. US\$ 1,00 = R\$ 4,05 – Cotação média do dólar para o mês de janeiro de 2016 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2016).

De acordo com a tabela 10, nos meios GLIC e MRS, os custos com a fonte de carbono tiveram a maior parcela do COE para a produção de 1g de ácido láctico. O MRS não é apenas uma fonte de carbono, é um meio de cultivo elaborado especificamente para atender as demandas metabólicas de *Lactobacillus* sp., contendo suplementos, por isso, neste meio, não houve custo com materiais desta categoria. No meio MEL, a parcela mais impactante nos custos refere-se às despesas com suplementos, uma vez que o custo com a fonte de carbono (melaço) foi praticamente nula, representando apenas 0,1% do COE.

Åkerberg e Zacchi (2000) compararam os COE com os CT das produções de ácido láctico por fermentação utilizando *Lactococcus lactis* ssp *lactis* ATCC 19435 em diferentes concentrações de glicose e concluíram que os COE representaram cerca de 80% do CT da produção de ácido láctico. Demirci et al. (1998) comentaram que os meios de cultura, incluindo as fontes de carbono, representaram mais de 30% do CT da produção de ácido láctico.

Com base nas observações de Åkerberg e Zacchi (2000) e Demirci et al. (1998) e analisando os dados da tabela 9, pode-se perceber que reduzindo os COE da produção de ácido láctico com a substituição de GLIC por MEL, o CT pode ser consideravelmente reduzido.

González et al. (2007) estudaram os custos de produção de ácido láctico a partir do soro de leite, incluindo todas as etapas da produção. Eles observaram que a fermentação é responsável por 50% dos custos anuais da produção de ácido láctico a 50%, sendo 25% apenas com extrato de levedura. Mais uma vez, os gastos com meio de cultura foram o mais

impactante na produção de ácido láctico utilizando um resíduo agroindustrial (soro de leite), corroborando com o achado para o meio MEL de 98,5% dos COE sendo com suplementos.

Nancib et al. (2001) estudaram a substituição de extrato de levedura por outras fontes de nutrientes a partir da fermentação de suco de tâmara por *Lactobacillus casei* ssp *rhamnosus* e concluíram que ao utilizarem sulfato de amônio e extrato de levedura na proporção 4:1, não houve redução significativa na produção de ácido láctico, porém, uma redução significativa nos custos.

Tabela 9: Custos operacionais efetivos para a produção, por grama, de ácido láctico em laboratório de acordo com os meios de cultura testados (GLIC, MEL e MRS).

Insumos	24h			48h			72h		
	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS
Fonte de carbono	R\$ 14,99	R\$ 0,00	R\$ 7,59	R\$ 10,00	R\$ 0,00	R\$ 4,97	R\$ 10,00	R\$ 0,00	R\$ 4,46
Suplementos									
Ureia	R\$ 1,46	R\$ 0,21	-	R\$ 0,97	R\$ 0,18	-	R\$ 0,97	R\$ 0,13	-
Peptona	R\$ 4,52	R\$ 0,66	-	R\$ 3,01	R\$ 0,54	-	R\$ 3,01	R\$ 0,42	-
Ext. de levedura	R\$ 3,44	R\$ 0,50	-	R\$ 2,29	R\$ 0,41	-	R\$ 2,29	R\$ 0,32	-
Subtotal	R\$ 9,42	R\$ 1,37	-	R\$ 6,27	R\$ 1,13	-	R\$ 6,27	R\$ 0,87	-
Reagentes Analíticos									
Hidróxido de Sódio	R\$ 0,10	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,06	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,06	R\$ 0,01	R\$ 0,00
Fenolftaleína	R\$ 0,01	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,01	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,01	R\$ 0,00	R\$ 0,00
Álcool absoluto	R\$ 0,03	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,02	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,02	R\$ 0,00	R\$ 0,00
Subtotal	R\$ 0,14	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,09	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,09	R\$ 0,01	R\$ 0,00
Custo Operacional Efetivo									
Total	R\$ 24,55	R\$ 1,38	R\$ 7,60	R\$ 16,36	R\$ 1,14	R\$ 4,98	R\$ 16,36	R\$ 0,88	R\$ 4,46

US\$ 1,00 = R\$ 4,05. Cotação média do dólar para o mês de janeiro de 2016 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2016).

Tabela 10: Composição dos custos operacionais, em porcentagem (%), da produção de ácido láctico, de acordo com os meios de cultura testados: GLIC, MEL e MRS.

Insumos	24h			48h			72h		
	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS
Fonte de carbono	61,06	0,00	99,87	61,12	0,00	99,80	61,12	0,00	100,00
Suplementos									
Ureia	5,95	15,22	0,0	5,93	15,79	0,0	5,93	14,77	0,0
Peptona	18,41	47,83	0,0	18,40	47,37	0,0	18,40	47,73	0,0
Ext. de levedura	14,01	36,23	0,0	14,0	35,96	0,0	14,0	36,36	0,0
Subtotal	38,37	99,28	0,0	38,33	99,12	0,0	38,33	98,86	0,0
Reagentes Analíticos									
Hidróxido de Sódio	0,41	0,72	0,13	0,37	0,88	0,20	0,37	1,14	0,00
Fenolftaleína	0,04	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
Álcool absoluto	0,12	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
Subtotal	0,57	0,72	0,13	0,55	0,88	0,20	0,55	1,14	0,00
Total	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

5.3.2 Orçamentações parciais entre as produções de ácido láctico

Considerando o MRS como meio de cultivo adequado para o crescimento de *Lactobacillus* sp e a glicose como uma fonte importante para a produção industrial de ácido láctico por fermentação, realizaram-se orçamentações parciais (OP) simulando todas as alternativas possíveis de substituição da produção de ácido láctico, a partir dos meios GLIC e MRS pela utilização de melão, meio MEL. Complementando as análises comparativas das OP, verificou-se, também, a possível substituição de GLIC por MRS (tabela 11).

As receitas obtidas para produção de 1g ácido láctico em cada meio testado de acordo com o tempo de incubação foram iguais, uma vez que se padronizou a produção (1g). O valor encontrado para receita de 1g de ácido láctico foi de R\$0,05.

Tabela 11: Orçamentações parciais simulando as substituições das produções, por grama de ácido láctico, utilizando *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 a partir das substituições de GLIC e MRS por MEL e a partir de GLIC por MRS.

Meios a serem substituídos	Meios alternativos		
	MEL 24h	MEL 48h	MEL 72h
GLIC 24h	R\$ 23,17	R\$ 23,41	R\$ 23,67
GLIC 48h	R\$ 14,98	R\$ 15,22	R\$ 15,48
GLIC 72h	R\$ 14,98	R\$ 15,22	R\$ 15,48
MRS 24h	R\$ 6,22	R\$ 6,46	R\$ 6,72
MRS 48h	R\$ 3,60	R\$ 3,84	R\$ 4,10
MRS 72h	R\$ 3,08	R\$ 3,32	R\$ 3,58
	MRS 24h	MRS 48h	MRS 72h
GLIC 24h	R\$ 16,95	R\$ 19,57	R\$ 20,09
GLIC 48h	R\$ 8,76	R\$ 11,38	R\$ 11,90
GLIC 72h	R\$ 8,76	R\$ 11,38	R\$ 11,90

Valores positivos significam alteração favorável. Para verificar as simulações em sentido inverso, basta inverter os sinais dos valores.

Pode-se perceber que as substituições de GLIC por MRS seriam vantajosas para a produção de ácido láctico, isto não quer dizer que as indústrias produtoras de ácido láctico devam utilizar MRS, ao invés de GLIC. Estes foram os resultados encontrados baseados em um meio (GLIC) não suplementado para o máximo desempenho, como o MRS, em condições de laboratório.

No entanto, mesmo sem suplementações que atendam ao máximo desempenho nas fermentações, a OP mostrou ser vantajosa ao substituir tanto o MRS, quanto a glicose por melão. Todos os valores das simulações nas quais o melão seria utilizado foram positivos.

5.3.3 Análises de custos para a produção de biomassa de *Lactobacillus plantarum*

A tabela 12 apresenta os COE para a produção de 1g de biomassa de *L. plantarum* a cada tempo de fermentação nos meios testados (GLIC, MEL e MRS). Pode-se observar novamente que o meio MEL resultou nos menores COE em todos os tempos de fermentação. Os custos mais elevados foram encontrados no meio GLIC.

Com estes resultados, os menores COE para a produção de biomassa em GLIC (R\$ 5,05), MEL (R\$ 0,76) e MRS (R\$ 3,34) foram, respectivamente, em 24h, 72h e 48h.

A figura 23 apresenta os COE para a produção de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 em cada meio por tempo de incubação. Assim como na produção de ácido láctico, o melado, como um subproduto de baixo custo, fez a produção de biomassa de *L. plantarum* no meio MEL apresentar os menores COE em todos os tempos de cultivo.

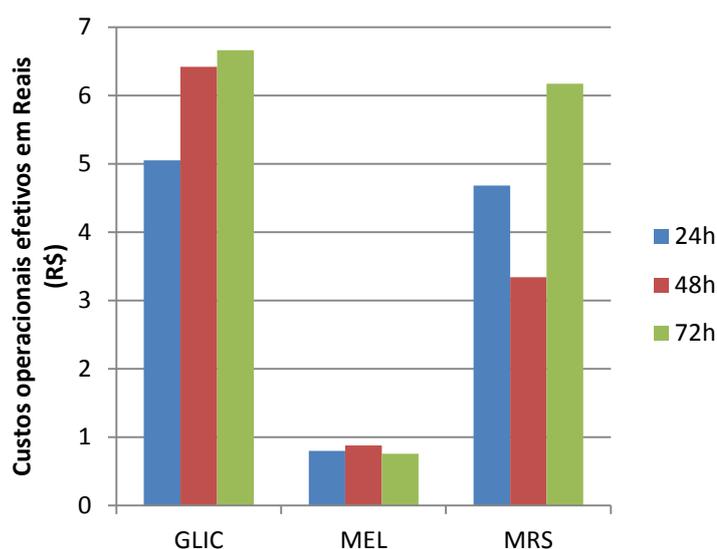


Figura 23: Custos operacionais efetivos obtidos para a produção de biomassa de *Lactobacillus plantarum* nos meios GLIC, MEL e MRS a cada tempo de incubação. US\$ 1,00 = R\$ 4,05 – Cotação média do dólar para o mês de janeiro de 2016 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2016).

Ao se comparar as proporções dos COE para produção de biomassa de *L. plantarum* por categoria de insumos (tabela 13), verificou-se que a maior parcela no meio GLIC referiu-se à fonte de carbono (61,4% do COE). No meio MEL, considerando o baixo custo com a fonte de carbono, foram os suplementos os responsáveis por quase a totalidade do COE, principalmente com a peptona (47,9% do COE). Como o meio MRS não foi suplementado, por já ser um meio complexo, todo o COE (100%) referiu-se a ele. Não foram obtidos custos com reagentes analíticos na produção de biomassa de *L. plantarum*, pois na metodologia utilizada, não houve necessidade destes recursos.

Tabela 12: Custos operacionais efetivos para a produção, por grama, de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 em laboratório de acordo com os meios de cultura testados (GLIC, MEL e MRS).

Insumos	24h			48h			72h		
	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS
Fonte de carbono	R\$ 3,10	R\$ 0,00	R\$ 4,68	R\$ 3,95	R\$ 0,00	R\$ 3,34	R\$ 4,09	R\$ 0,00	R\$ 6,17
Suplementos									
Ureia	R\$ 0,30	R\$ 0,12	-	R\$ 0,38	R\$ 0,14	-	R\$ 0,40	R\$ 0,12	-
Peptona	R\$ 0,94	R\$ 0,39	-	R\$ 1,19	R\$ 0,42	-	R\$ 1,23	R\$ 0,36	-
Ext. de levedura	R\$ 0,71	R\$ 0,29	-	R\$ 0,90	R\$ 0,32	-	R\$ 0,94	R\$ 0,28	-
Subtotal	R\$ 1,95	R\$ 0,80	-	R\$ 2,47	R\$ 0,88	-	R\$ 2,57	R\$ 0,76	-
Custo Operacional Efetivo									
Total	R\$ 5,05	R\$ 0,80	R\$ 4,68	R\$ 6,42	R\$ 0,88	R\$ 3,34	R\$ 6,66	R\$ 0,76	R\$ 6,17

US\$ 1,00 = R\$ 4,05. Cotação média do dólar para o mês de janeiro de 2016 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2016).

Tabela 13: Composição dos custos operacionais, em porcentagem (%), da produção de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580, de acordo com os meios de cultura testados: GLIC, MEL e MRS.

Insumos	24h			48h			72h		
	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS	GLIC	MEL	MRS
Fonte de carbono	61,4	0,1	100,0	61,4	0,1	100,0	61,4	0,1	100,0
Suplementos									
Ureia	6,0	15,5	0,0	6,0	15,5	0,0	6,0	15,5	0,0
Peptona	18,5	47,9	0,0	18,5	47,9	0,0	18,5	47,9	0,0
Ext. de levedura	14,1	36,5	0,0	14,1	36,5	0,0	14,1	36,5	0,0
Subtotal	38,6	99,9	0,0	38,6	99,9	0,0	38,6	99,9	0,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

5.3.4 Orçamentações parciais entre as produções de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580

Foram realizadas análises de OP para comparações entre os benefícios-custos das produções de biomassa de *L. plantarum* a partir de GLIC e MRS por MEL. Também, considerou-se a substituição de GLIC por MRS (tabela 14).

As receitas obtidas para produção de 1g de biomassa úmida de *L. plantarum* CCT 0580 em cada meio testado de acordo com o tempo de incubação foram iguais, uma vez que se padronizou a produção (1g). O valor encontrado para receita de 1g de biomassa foi de R\$412,17.

Tabela 14: Orçamentações parciais simulando as substituições das produções, por grama de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 a partir das substituições de GLIC e MRS por MEL e a partir de GLIC por MRS.

Meios a serem substituídos	Meios alternativos		
	MEL 24h	MEL 48h	MEL 72h
GLIC 24h	R\$ 4,25	R\$ 4,25	R\$ 4,29
GLIC 48h	R\$ 5,62	R\$ 5,62	R\$ 5,66
GLIC 72h	R\$ 5,86	R\$ 5,86	R\$ 5,90
MRS 24h	R\$ 3,88	R\$ 3,80	R\$ 3,92
MRS 48h	R\$ 2,54	R\$ 2,46	R\$ 2,58
MRS 72h	R\$ 5,37	R\$ 5,29	R\$ 5,41
	MRS 24h	MRS 48h	MRS 72h
GLIC 24h	R\$ 0,37	R\$ 1,71	-R\$ 1,12
GLIC 48h	R\$ 1,74	R\$ 3,08	R\$ 0,25
GLIC 72h	R\$ 1,98	R\$ 3,32	R\$ 0,49

Valores positivos significam alteração favorável. Para verificar as simulações em sentido inverso, basta inverter os sinais dos valores.

Encontraram-se a partir da OP, comparando as receitas e os custos das produções de biomassa de *L. plantarum*, os mesmos padrões de resultados encontrados na OP realizada para a produção de ácido láctico, sendo assim, a substituição das produções de biomassa em GLIC e MRS por MEL seria, mais uma vez, vantajosa. É mais vantajoso utilizar melão do que glicose em qualquer tempo de incubação. Isto é importante, pois menos ciclos produtivos podem ser realizados em um mesmo período atingindo maior produção com melão.

Figuroa-González et al. (2011) comentaram que a utilização de efluentes agroindustriais podem reduzir os custos de produção de probióticos, uma vez que constituiriam um meio de cultura de baixo custo, desde que o efluente tenha as características necessárias ao desenvolvimento do micro-organismo.

De um modo geral, Chaves (2015) comparou os custos operacionais da produção de polihidroxibutirato (PHB) por *Bradyrhizobium japonicum* utilizando diferentes fontes de carbono, dentre elas, o melaço. Ela constatou que os custos com meios de cultura foram mais representativos, principalmente os custos com extrato de levedura (entre 24,82% e 46,96%). Segundo a autora, os custos da utilização do melaço (R\$ 3,35/g de PHB) superaram os custos quando se utilizou sacarose (R\$ 2,86/g de PHB). No entanto, os custos com a utilização do melaço, foram menores que com a utilização dos demais meios testados: sacarose < melaço < glicerol < soro de leite < lactose < glicose. Estes resultados corroboraram os menores custos na produção ao utilizar o melaço comparado ao glicerol (R\$ 3,46/g de PHB) e ao soro de leite (R\$ 4,73/g de PHB), ambos resíduos agroindustriais na produção de biomassa de PHB em *Bradyrhizobium japonicum*.

De acordo com os conceitos de química verde trazidos por Torresi, Pardini e Ferreira (2010), a substituição de glicose por melaço, pode ser ambientalmente sustentável, considerando que a produção de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 foi maior utilizando melaço e apresentou COE menores.

Desta forma, a figura 24 apresenta um modelo de ecossistema industrial com a incorporação da produção de ácido láctico e de *L. plantarum* utilizando o melaço da indústria açucareira.

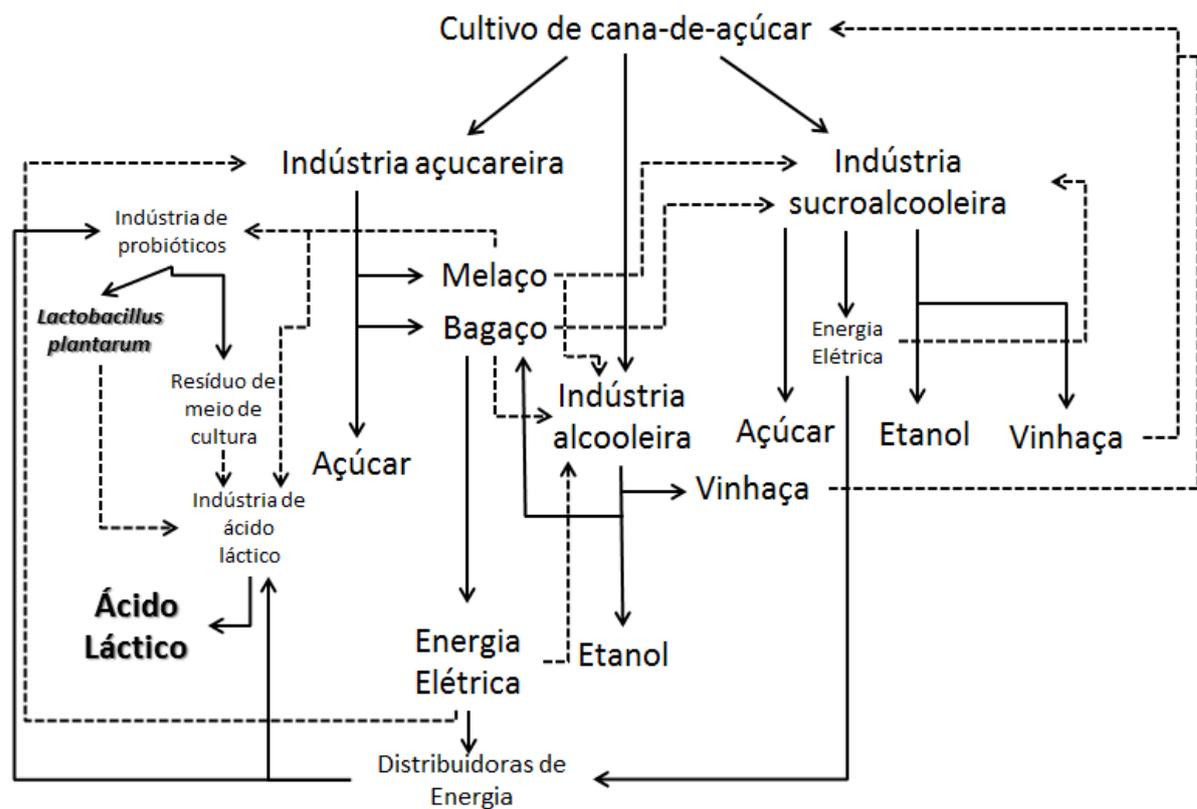


Figura 24: Ecossistema industrial das usinas de cana-de-açúcar com a possível inclusão das indústrias de ácido láctico e/ou de probióticos. Por razões de simplificação, não foram incluídas indústrias de outras categorias que possam utilizar o etanol, o ácido láctico e *Lactobacillus plantarum*.

6 CONCLUSÃO

As análises de produção de ácido láctico revelaram maior produtividade em 72h de incubação para todos os meios testados: GLIC, MEL e MRS. Como esperado, no meio MRS, utilizado como controle experimental, houve maior produção que nos demais meios, resultando em $12,6 \pm 0,42 \text{ g.L}^{-1}$. No entanto, no meio MEL houve maior produção que no meio GLIC, gerando, respectivamente, $6,5 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,9 \pm 0,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Em relação à produção de biomassa úmida de *L. plantarum* CCT 0580, verificou-se maior produção no meio MRS em 48h de incubação, com concentração de $16,9 \pm 3,54 \text{ g.L}^{-1}$. Comparando os meios GLIC e MEL, estes apresentaram maior produção de biomassa, respectivamente em 24h e 72h de incubação. A produção de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 foi maior em MEL que em GLIC, sendo as concentrações máximas para cada meio, respectivamente, $7,59 \pm 0,66 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,0 \pm 0,85 \text{ g.L}^{-1}$.

Comparando a produtividade de ácido láctico entre os meios testados ao final da incubação, 72h, verificou-se maior produtividade em MRS, seguido por MEL e GLIC, que apresentaram produtividades de ácido láctico de, respectivamente, $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

O mesmo perfil da produtividade de ácido láctico foi encontrado para a produtividade de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, no qual os meios MRS, MEL e GLIC apresentaram, respectivamente, as seguintes taxas de produtividade: $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Verificando os rendimentos, ou seja, a conversão de açúcares redutores (AR) em ácido láctico ao final do tempo de incubação, 72h, verificou-se maior rendimento no meio MRS, sendo $0,64 \text{ g.g}^{-1}$ (gramas de ácido láctico por gramas de AR). Comparando os meios GLIC e MEL, obteve-se maior rendimento no meio MEL que no meio GLIC, apresentando taxas de conversão iguais a $0,52 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,40 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente.

Considerando a conversão de AR em biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 ao final de 72h de incubação, o meio controle (MRS) apresentou menor rendimento, igual a $0,46 \text{ g.g}^{-1}$. O meio GLIC apresentou o maior rendimento de biomassa a partir de AR, seguido pelo meio MEL, que apresentaram, respectivamente, os valores de $0,98 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,60 \text{ g.g}^{-1}$.

Os maiores custos operacionais efetivos (COE) para a produção de 1g de ácido láctico em escala laboratorial foram observados utilizando os meios GLIC e MRS, seguidos pelo meio MEL. Em 72h de incubação, tempo em que houve maior produção de ácido láctico,

observaram-se os seguintes valores de COE para os meios GLIC, MRS e MEL, respectivamente: R\$ 16,36, R\$ 4,46 e R\$ 0,88.

Para a produção de 1g de biomassa de *L. plantarum* CCT 0580, por cada tempo de maior produção nos meios testados, observou-se maior COE utilizando GLIC, seguido por MRS e MEL, respectivamente: R\$ 5,05 (24h), R\$ 3,34 (48h) e R\$ 0,76 (72h).

A partir das orçamentações parciais, o melão pode substituir a glicose na produção de ácido láctico e biomassa de *L. plantarum* CCT 0580 de forma vantajosa.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as produções de ácido láctico e de biomassa de *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 de acordo com o pH, concentração de AR, fonte de nitrogênio, fonte de fosfato e outras fontes sustentáveis de carbono.
- Realizar as fermentações em biorreator, simulando melhor os processos industriais de obtenção de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum*.
- Analisar os custos de produção de ácido láctico e de biomassa de *L. plantarum* a partir dos custos das matérias primas obtidos pelas indústrias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. Elsevier, v. 156, n. 4, p. 286-301, dez. 2011.

_____. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. Elsevier, v. 31, n. 6, p. 877-902, nov. 2013.

ABEE, Tjakko; KROCKEL, Lothar; HILL, Colin. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 28, n. 2, p. 169-185, dez. 1995.

ADAMBERG, Kaarel et al. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 85, n. 1-2, p. 181-183, ago. 2003.

ADLER-NISSEN, Jens; DEMAIN, Arnold L. Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations. *Journal of Industrial Microbiology*. Fairfax: Society for Industrial Microbiology, v. 13, n. 6, p. 335-343, nov. 1994.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – ABDI. *Estudo prospectivo [da indústria de] higiene pessoal, perfumaria e cosméticos*. Brasília: ABDI, 2009. 347 p. (Série Cadernos da indústria ABDI XIII).

ÅKERBERG, Christina; ZACCHI, Guido. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology*. Elsevier, v. 75, n. 2, p. 119-126, nov. 2000.

AYALA, A.; TUN, E. Effect of consumption of molasses/urea block on the growth of housed bullocks fed ad libitum with *Pennisetum purpureum*. *Tropical Animal Health and Production*. Dordrecht: Springer, v. 23, n. 2, p. 95-98, jun. 1991.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL – BNDES. *Potencial de diversificação da indústria química Brasileira – Relatório 4: aditivos alimentícios*. Rio de Janeiro: BNDES, 2014. 47p. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produ%20tos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_Aditivos_alimenticios_v34.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2016.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL – BNDES; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. *Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: BNDES, 2008, 316 p.

BASTOS, Valéria Delgado. Biopolímeros e Polímeros de Matérias-Primas Renováveis Alternativos aos Petroquímicos. *Revista do BNDES*. Rio de Janeiro: BNDES, v. 14, n. 28, p. 201-234, dez. 2007.

BRASIL. Resolução CNNPA nº 12, de 1978. [Aprova as normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro]. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 jul. 1978.

CHAVES, Marcela Cassin. *Avaliação da síntese de poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de resíduos agroindustriais e análise do custo operacional de produção*. Volta Redonda, 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2015.

CHRAMOSTOVÁ, Jana et al. Influence of cultivation on the growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., and *Streptococcus termophilus* and on the production of organic acids in fermented milks. *Czech Journal of Food Sciences*. Prague: Czech Academy of Agricultural Sciences, v. 32, n. 5, p. 422-429, 2014.

COELHO, L. F. et al. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* Lmism-6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Engenharia Química, v. 28, n. 1, p. 27-36, jan. 2011.

COSTA, M. J. de C. C. et al. Avaliação da eficácia da suplementação com melaço na dieta de ratos normais e depletados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas: Sociedad Latinoamericana de Nutrición, v. 50, n. 4, s/p, 2000.

CUNNINGHAM-RUNDLES, Susanna et al. Probiotics and immune response. *The American Journal of Gastroenterology*. Elsevier, v. 95, n. 1, p. 22-25, jan. 2000.

DAUDT, Carlos Eugenio; SIMON, José Antônio. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*. Santa Maria: UFSM, v. 31, n. 4, p. 697-701, ago. 2001.

DEMIRCI, Ali et al. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington: American Chemical Society, v. 46, n. 11, p. 4771-4774, out. 1998.

DUBOIS, Alexy; KULPA, Luciana; SOUZA, Luiz Eurico de. *Gestão de custos e formação de preços: conceitos, modelos e instrumentos: abordagem do capital de giro e da margem da competitividade*. 3 ed. São Paulo: Atlas, 2009. 254p.

EITEMAN, Mark A.; RAMALINGAM, Subramanian. Microbial production of lactic acid. *Biotechnology Letters*. Dordrecht: Springer, v. 37, n. 5, p. 955-972, jan. 2015.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. Balanço energético nacional 2015 – ano base 2014. Rio de Janeiro: EPE, 2015a, 34p. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/10584/1143895/2.4+-+Cap%C3%ADtulo+2+-+Oferta+e+Demanda+de+Energia+por+Fonte+%28PDF%29/9d076e24-f879-464b-a767-a7e0d27feb76?version=1.0>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

_____. Balanço energético nacional 2015: relatório síntese – ano base 2014. Rio de Janeiro: EPE, 2015b, 61p. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final_2015_Web.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2016.

EVANGELISTA, Roque L.; NIKOLOV, Zivko L. Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Totowa: Humana Press Inc., v. 57, n. 1, p. 471-480, mar. 1996.

FELTRIN, Valdemar P. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, v. 43, n. 1, s/p, 2000.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* Lavras: UFLA, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov. 2011.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, Ivonne et al. Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Chichester: Society of Chemical Industry, v. 91, n. 8, p. 1341-1348, mar. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Roma: FAO/WHO, 2006. 53 p.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS – FGV. Índice Geral de Preços - Disponibilidade Interna (IGP-DI). Disponível em: <http://www.antigofgvdados.fgv.br/bf/dsp_periodo.htm>. Acesso em: 05 fev. 2016.

GERHARDT, Tatiana Engel; SILVEIRA, Denise Tolfo. *Métodos de Pesquisa*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. 120 p. (Série Educação a Distância).

GONZÁLEZ, M. I. et al. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*. Pullman: *International Society of Food Engineering*, v. 80, n. 2, p. 553-561, mai. 2007.

GOPAL, Anand R. KAMMEM, Daniel M. Molasses for ethanol: the economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol. *Environmental Research Letters*, Bristol: IOP Publishing Ltd, v. 4, n. 4, p. 1-5, out. 2009.

HAO, Zhiqi; REISKE, Heinz R.; WILSON, David B. Characterization of Cadmium Uptake in *Lactobacillus plantarum* and Isolation of Cadmium and Manganese Uptake Mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, v. 65, n. 11, p. 4741-4745, nov. 1999.

HAULY, Maria Celia de Oliveira; OLIVEIRA, Andréa Rocha de; OLIVEIRA, Antonio Sérgio. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: EDUEL, v. 24, n. 1, p. 133-142, jan. 2003.

HOFVENDAHL, Karin; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. Atlanta: Georgia Institute of Technology, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, fev. 2000.

HU, Meizhong et al. Purification and Characterization of Plantaricin 163, a Novel Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* 163 Isolated from Traditional Chinese Fermented Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington: American Chemical Society, v. 61, n. 47, p. 11676-11682, nov. 2013.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ITAL. *Brasil ingredients trends 2020*. Campinas: ITAL, 2014. 389 p.

JOHN, Rojan P.; NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; PANDEY, Ashok. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg: Springer-Verlag, v. 74, n. 3, p. 524-534, jan 2007.

KLEEREBEZEM, Michiel et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Washington: National Academy of Sciences of the USA, v. 100, n. 4, p. 1990-1995, fev. 2003.

LEJEUNE, P. et al. A sour dough, the use thereof and bakery products produced from the same. *World Intellectual Property Organization Pat. WO2004/080187, 23 set. 2004. 52p.*

LEROY, Frédéric; VUYST, Luc de. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, v. 67, n. 10, p. 4407-4413, out. 2001.

MALDONADO, Antonio et al. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 77, n. 1-2, p. 117-124, jul. 2002.

MANAHAN, Stanley E. Green Chemistry and the Ten Commandments of sustainability. 2ed. Columbia [Missouri]: ChemChar Research, 2006. 379p.

MARCONI, Marina de Andrade; LAKATOS, Eva Maria. *Metodologia Científica*. 6. ed. São Paulo: Editora Atlas, 2011. 312 p.

MARQUEZ, Líbia Diniz Santos. *Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas*. Uberlândia, 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MARTINEZ, Fabio Andres Castillo et al. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science & Technology*. Wageningen: European Federation of Food Science and Technology, v. 30, n. 1, p. 70-83, mar. 2013.

MARTINS, Eliseu. *Contabilidade de custos*. 10 ed. São Paulo: Atlas, 2010. 370p.

MATSUNAGA, Minoru et al. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. *Boletim Técnico do Instituto de Economia Agrícola*. São Paulo: IEA, 23: 123-139, 1976.

MAZZEO, Maria F. et al. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, Martinsried: EuPA, v. 75, n. 13, p. 4050-4061, jul. 2012.

MELAÇOS BRASILEIROS. *Outras Aplicações*. Disponível em: <<http://www.melacos.com.br/melacos-brasileiros-outras-aplicacoes.html>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

MORAES, Flávio de. *Análise da rentabilidade de sistemas de produção de leite participantes do programa “Balde Cheio” no estado do Rio de Janeiro*. Lavras, 2013. 278 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MOUSAVI, Zeinab E. et al. Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. *Food Biotechnology*. New York: Taylor & Francis Group, v. 27, n. 1, p. 1-13, fev. 2013.

NANCIB, Nabil et al. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource technology*. Elsevier, v. 78, n. 2, p. 149-153, jun. 2001.

NARDIN, P; GUTERRES, S. S. Alfa-hidroxiácidos: aplicações cosméticas e dermatológicas. *Caderno de Farmácia*. Porto Alegre: UFRGS, v. 15, n. 1, p. 7-14. 1999.

NATIONAL NON-FOOD CROPS CENTRE – NNFCC. *NNFCC Biobased Products Market Review*. n. 43, p. 1-17, out. 2015. Disponível em: <<http://www.nnfcc.co.uk/publications/nnfcc-market-review-biobased-products-issue-43-october2015>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

NAUMOFF, D. G.; LIVSHITS, V. A. Molecular structure of the *Lactobacillus plantarum* sucrose utilization locus: comparison with *Pediococcus pentosaceus*. *Molekulyarnaya Biologiya*. Moscow: Russian Academy of Sciences, v. 35, n. 1, p. 19-27, jan. 2001.

NORONHA, F. José. *Projetos agropecuários: administração financeira, orçamentação e avaliação econômica*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. 274p.

OLIVEIRA, Andréa Rocha de; BUZATO, João Batista; HAULY, Maria Célia de Oliveira. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: EDUEL, v. 26, n. 1, p. 53-60, jan. 2005.

OLIVEIRA, Roselene Ferreira et al. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, [edição especial], p. 34-40, jun. 2009.

ORTIZ, Maria Eugenia et al. *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Heidelberg: Springer-Verlag, v. 95, n. 4, p. 991-999, fev. 2012.

PANESAR, Parmjit et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. Elsevier, 105, n. 1, p. 1-14, 2007.

PANESAR, Parmjit S. et al. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, v. 53, n. 1, p. 219-226, jan. 2010.

PAUCEAN, Adriana et al. Carbohydrate metabolic conversions to lactic acid and volatile derivatives, as influenced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus casei* ATCC 393 efficiency during in vitro and sourdough fermentation. *European Food Research and Technology*. Berlin: Springer, v. 237, n. 5, p. 679-689, jun. 2013.

PIACENTE, Fabrício José. *Agroindústria Canavieira e o Sistema de Gestão Ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá*. Campinas, 2005, 187 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) – Instituto de Economia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

POYATOS, Vilà et al. Uso de placas de ácido poli-L-láctico en reconstrucción de pared torácica: use of poly-L-lactic plates in chest wall reconstruction. *Cirurgia Plástica Ibero-Latinoamericana*. Madrid: Sociedad Española de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética, v. 37, n. 4, p. 375-380, out. 2011.

QUATRAVAUX, S et al. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*. Bedford: The Society for Applied Microbiology, v. 101, n. 4, p. 903-912, 2006.

REES, Ronald. The great copper trials. *History Today*. London: History Today, v. 43, n. 12, p. 38-44, dez. 1993.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. Cadeia Produtiva da Indústria Sucroalcooleira: cenários econômicos e estudos setoriais. Recife: SEBRAE, 2008, 52p.

SILVA, Gervásio P. da Silva et al. Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 36, n. 4, p. 395-404, out. 2005.

SILVA, Lucrécia de Jesus Melo da. *Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP*. Angra do Heroísmo, 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

SILVA, Milena V. et al. Obtenção de ácido láctico via fermentação descontínua utilizando melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, v. 1, n. 2, p. 97-102, jul. 2010.

SOLIMAN, Wael et al. Structure-Activity Relationships of an Antimicrobial Peptide Plantaricin S from Two-Peptide Class IIb Bacteriocins. *Journal of Medicinal Chemistry*. Washington: American Chemical Society, v. 54, n. 7, p. 2399-2408, mar. 2011.

TARANTO, Maria Pia; VALDEZ, Graciela Font de; PEREZ-MARTINEZ, Gaspar. Evidence of a glucose proton motive force-dependent permease and a fructose phosphoenolpyruvate: phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. *FEMS Microbiology Letters*. Delft: Federation of European Microbiological Societies, v. 181, n. 1, p. 109-112, dez. 1999.

TONDEE, Tusanee; SIRIANUNTAPIBOON, Suntud. Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. *Bioresource technology*. Elsevier, v. 99, n. 14, p. 6258-6265, set. 2008.

TORRESI, Susana I. Córdoba de; PARDINI, Vera L.; FERREIRA, Vitor F. O que é sustentabilidade. [Editorial]. *Química Nova*, São Paulo: SBQ, v. 33, n 1, p. 5, 2010.

UN. *Agenda 21*. 1992. Disponível em: <<https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/Agenda21.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

_____. *Declaration of the United Nations Conference on the Human Environment*. 1972. Disponível em: <<http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=97&ArticleID=1503&l=en>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

_____. *Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future*. 1987. Disponível em: <<http://www.un-documents.net/our-common-future.pdf>>. Acesso em: 29 mai. 2014.

VAN REENEN, C. A. et al. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 81, n. 1, p. 29-40, fev. 2003.

VANDERMOTTEN, Christian. L'interaction urbain-rural: une problématique renouvelée. *Articulo – Journal of Urban Research*. Elsevier, [edição especial], n. 3, dez. 2010.

VARGAS, André Luiz V.; LEPSCH, Letícia H.; BRANCO, Ricardo de F. Lactic Acid production by *Lactobacillus plantarum* CCT 0580 using sugarcane molasses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA, 6. Brasília: Sociedade Brasileira de Biotecnologia, nov. 2015.

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

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY Gopal. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 18, n. 5, p. 429-433, 2002.

VRANCKEN, Gino et al. Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, v. 77, n. 10, p. 3406-3412, abr. 2011.

VRIES, Maaïke C. de et al. *Lactobacillus plantarum*: survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. Edmonton: University of Alberta, v. 16, n. 9, p. 1018-1028, 2006.

WANG, Ying; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Suita: Society for Biotechnology, v. 119, n. 1, p. 10-18, jan. 2015.

WOUTERS, Dorrit et al. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Chichester: Society of Chemical Industry, v. 93, n. 13, p. 3352-3361, jun. 2013.

WU, Han et al. Mung bean (*Vigna radiata*) as probiotic food through fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier, v. 63, n. 1, p. 445-451, set. 2015.

XU, Ke; XU, Ping. Efficient production of l-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*. Elsevier, v. 153, n. 1, p. 23-29, fev. 2014.