



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE SUBSTRATOS
ALTERNATIVOS

CURITIBA

2022

PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE SUBSTRATOS
ALTERNATIVOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Oliveira, Priscilla Zwiercheczewski de
Produção e purificação de ácido láctico a partir de substratos alternativos. /
Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.
Orientadora: Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe. Coorientador:
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.

1. Bioprocessos. 2. Ácido láctico. 3. Cana-de-açúcar. 4. Resinas de troca
iônica. I. Vandenberghe, Luciana Porto de Souza. II. Soccol, Carlos Ricardo. III.
Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA** intitulada: **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica

28/04/2022 12:29:16.0

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/04/2022 12:48:06.0

MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2022 18:53:09.0

JULIO CESAR DE CARVALHO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2022 08:19:49.0

MARCELA CÂNDIDO CÂMARA

Avaliador Externo (LIBBS FARMACÊUTICA)

Assinatura Eletrônica

29/04/2022 07:19:29.0

CRISTINE RODRIGUES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Universidade Federal do Paraná- Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná -

Brasil CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3695 - E-mail: secretaria.pb@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única:

179129

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 179129

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento, e bem como a dedicação deste trabalho, é destinado à minha querida avó, Isabela. Por sua presença em metade desse meu caminho desafiador, e agora, em memória. Nunca desistiu de acreditar que teria uma neta Doutora. Seguirei sempre trabalhando inspirada pelo seu legado de ensinamentos e de amor.

Agradeço todo o amor e suporte de minha família, em especial: Rosemary, Roy, Átila, Lili, Mario, Mario J., Lourdes, Fred, Chantal, Arakem.

Agradeço aos meus amigos, em especial: Joyce, Zulma, Paulo, Ariane, Leonardo, Karla, Ariana e Priscila. Agradeço aos demais colegas e técnicos dos laboratórios.

Aos meus queridos professores que sempre me acompanham Trindade, Maria Helene e Ayala.

À Luciana Vandenberghe, que me orientou com esmero, disposição e paciência. Sempre presente, desde o primeiro momento pude desenvolver tamanha admiração e empatia. Sete anos, até o momento, de parceria, suporte e sincronismo de ideias. Muito obrigada.

À Cristine Rodrigues, muito obrigada por todo o conhecimento transmitido com tamanha facilidade e carisma, sempre esteve disposta em me ensinar, auxiliar, e por vezes me salvar.

Ao professor Carlos Soccol pela oportunidade de ingressar neste programa pioneiro da Biotecnologia no país.

Aos integrantes da banca por gentilmente aceitarem o convite e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

À equipe Purolite pelo suporte.

À CAPES e CNPq pelo fomento à pesquisa.

Ao povo brasileiro pela contribuição tributária. Mesmo em tempos sombrios, sabemos que não há avanço sem a ciência. Respeito à Universidade Pública e de qualidade.

« Je crois que l'avenir de l'humanité est dans le progrès de la raison par la science. »

Émile Zola

RESUMO

A importância comercial do ácido láctico (AL) se deve à sua versatilidade de aplicação, muito apreciada na indústria de alimentos, e atualmente, por ser o precursor do ácido poli-lático (PLA). O PLA é um polímero derivado do AL, que chama a atenção pela sua ocorrência natural e características seguras de aplicabilidade, especialmente em relação ao meio ambiente. É um componente de bioplásticos e embalagens, cotado para substituir os plásticos sintéticos derivados do petróleo, colaborando com o esforço global em reduzir taxas de emissão de CO₂. A demanda pela produção do PLA também decorre da evolução dos procedimentos estéticos e biomédicos, cujas aplicações vem crescendo nas duas últimas décadas. Logo, para se obter um PLA de qualidade, é imperativo um precursor (AL) de alta qualidade. Com isso, o processo de produção de AL e, conseqüentemente, de PLA apresenta alguns gargalos, relacionados ao custo do meio fermentativo, processo de recuperação e purificação do AL. O seu processo de produção é simples, o que possibilita o uso de substratos alternativos como o caldo de cana, e resíduos agro-industriais. Os substratos alternativos diminuem o custo do meio fermentativo e fornecem um ambiente favorável para a multiplicação celular das bactérias produtoras do AL (LAB). As LABs se adaptam bem aos substratos contendo açúcares simples ou dímeros, a exemplo da sacarose. Destaca-se a bactéria *Lactobacillus pentosus*, que apresenta grande potencial de produção de AL, porém, ainda é pouco explorada. Portanto, não se tem o conhecimento da produção de AL pela *L. pentosus* utilizando caldo de cana como substrato. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção do AL a partir de caldo de cana-de-açúcar, a qual é largamente produzida no país com altas concentrações em sacarose, e a proposição de método de purificação utilizando diferentes resinas de troca iônica em sistema de colunas e sistema agitado (frascos de Erlenmeyer em banho-maria com agitação orbital e tanque agitado). Realizou-se a cinética de produção de AL durante 168 horas com a cepa de *L. pentosus*, onde a produção de 113,74 g/L foi alcançada em 96 horas, com uma produtividade de 1,18 g AL/L.h. Dentre as técnicas e resinas utilizadas, a melhor técnica foi com o uso combinado das resinas Amberlite IR120 e IRA-67 em tanque com agitação, que promoveu a obtenção de uma concentração final de AL de 189,11 g/L após 120 minutos de contato com a amostra, com recuperação da massa de AL de 95%. Tal resultado demonstra uma maneira simplificada de utilizar as resinas de troca iônica, de modo seguro em ambiente controlado e com a possibilidade de uso em maiores escalas de produção. As resinas empregadas para a purificação de AL foram anteriormente pesquisadas. Por outro lado, não existem relatos que descrevem a sua utilização em tanque agitado. Este trabalho atingiu o objetivo de apresentar uma solução tecnológica para a produção e purificação de AL, para posterior polimerização em PLA, em processos escalonáveis.

Palavras-chave: Caldo de cana. *Lactobacillus pentosus*. Ácido láctico. Recuperação. Purificação. Resinas de troca iônica.

ABSTRACT

The commercial importance of lactic acid (LA) is due to its application versatility, much appreciated in the food industry, and currently, for being the precursor of poly-lactic acid (PLA). PLA is a polymer derived from LA, which draws attention for its natural occurrence and safe applicability characteristics, especially in relation to the environment. It is a component of bioplastics and packaging, tipped to replace synthetic plastics derived from petroleum, contributing to the global effort to reduce CO₂ emission rates. The demand for PLA production also stems from the evolution of aesthetic and biomedical procedures, whose applications have been growing in the last two decades. Therefore, to obtain a quality PLA, a high-quality precursor (LA) is imperative. Thus, the production process of LA and, consequently, of PLA presents some bottlenecks, related to the cost of the fermentation medium, recovery process and purification of LA. Its production process is simple, which allows the use of alternative substrates such as the natural sugary drink from sugarcane juice, and agro-industrial biomass waste. Alternative substrates reduce the cost of the fermentation medium and provide a favorable environment for the cellular multiplication of LA-producing bacteria (LAB). LABs adapt well to substrates containing simple sugars or dimers, such as sucrose. The bacteria *Lactobacillus pentosus* stands out, which has great potential for LA production, however, it is still slightly explored. Therefore, the LA production by *L. pentosus* using sugarcane juice as substrate is not known. In this context, the present work aimed to produce LA from sugarcane juice, which is widely produced in the country with high concentrations of sucrose. Also, to propose a purification method using different ion exchange resins in a column system and agitated system (Erlenmeyer flasks in a water bath with orbital agitation and stirred tank). The kinetics of LA production was performed during 168 hours with the *L. pentosus* strain, where the production of 113.74 g/L was reached in 96 hours, with a productivity of 1.18 g LA/L.h. Among the techniques and resins used, the best technique was the combined use of Amberlite IR120 and IRA-67 resins in a stirred tank, which resulted in a final LA concentration of 189.11 g/L after 120 minutes in contact with the sample, with 95% LA mass recovery. This result demonstrates a simplified way to use ion exchange resins, safely in a controlled environment and with the feasibility of use in larger production scales. The resins used for the LA purification were previously investigated. On the other hand, there are no reports describing its use in stirred tanks. This work reached the objective of presenting a technological solution for the LA production and purification, for later polymerization in PLA, in scalable processes.

Key-words: Sugarcane juice. *Lactobacillus pentosus*. Lactic acid. Recovery. Purification. Ion Exchange resins.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
	Objetivo geral.....	15
	Objetivos específicos.....	15
3	CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
	A concise update on major poly-lactic acid bioprocessing barriers.....	17
1.	INTRODUCTION.....	17
2.	LACTIC ACID: OVERVIEW.....	18
3.	POLY-LACTIC ACID.....	20
3.1.	<i>General and economic aspects.....</i>	20
3.2.	<i>Properties and production process.....</i>	22
3.3.	<i>Degradation mechanisms.....</i>	24
4.	BARRIERS IN PLA PRODUCTION AND RECOVERY.....	25
5.	SUMMARY OF KEY-POINTS.....	29
6.	CONCLUSIONS.....	30
4	CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO CALDO DE CANA COMO SUBSTRATO.....	31
2.1	INTRODUÇÃO.....	31
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.2.1	Microrganismo.....	33
2.2.2	Substrato.....	33
2.2.3	Produção de ácido láctico utilizando caldo de cana como substrato.....	33
2.2.3.1	<i>Preparo do inóculo.....</i>	33
2.2.3.2	<i>Cinética de produção.....</i>	34
2.2.4	Recuperação do ácido láctico.....	34
2.2.5	Métodos analíticos.....	35
2.2.6	Análise estatística.....	36
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.3.1	Substrato.....	36
2.3.2	Cinética de produção de ácido láctico utilizando caldo de cana como substrato.....	37
2.4	CONCLUSÕES.....	41

CAPÍTULO III – PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO COM O USO DE RESINAS DE TROCA IÔNICA.....	43
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1 Material.....	44
3.2.2 Produção de ácido lático.....	44
3.2.3 Purificação do ácido lático utilizando resinas de troca iônica.....	45
3.2.3.1 Ativação das resinas.....	46
3.2.3.2 Purificação do ácido lático com o uso de resinas catiônicas e aniônicas em banho-maria com agitação orbital.....	46
3.2.3.3 Purificação do ácido lático em colunas de forma sequencial de resinas catiônicas e aniônicas.....	47
3.2.3.4 Purificação do ácido lático em tanque agitado com o uso simultâneo de resinas catiônicas e aniônicas.....	49
3.2.4 Métodos Analíticos.....	50
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.3.1. Purificação do ácido lático com o uso de resinas catiônicas e aniônicas em banho-maria com agitação orbital.....	51
3.3.2 Purificação do ácido lático em colunas de forma sequencial de resinas catiônicas e aniônicas.....	52
3.3.3. Purificação do ácido lático com o uso simultâneo de resinas catiônicas e aniônicas em tanque agitado.....	56
3.4 CONCLUSÕES.....	58
CAPÍTULO IV – ÁCIDO POLI-LÁTICO (PLA) E SEUS POLÍMEROS DE BASE BIOLÓGICA – CRIAÇÃO DE BANCO DE DADOS DE PATENTES DESENVOLVIDAS NOS ÚLTIMOS 20 ANOS PARA APLICAÇÕES ESSENCIAIS.....	59
4.1 INTRODUÇÃO.....	59
4.2 BANCO DE DADOS DE PATENTES DE APLICAÇÃO DE PLA COMO BIOMATERIAL.....	59
4.2.1 Cosméticos.....	62
4.2.2 Farmacêutica.....	63
4.2.3 Médica e biomédica.....	65
4.3 CONCLUSÕES.....	70

5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o ácido láctico (AL) é um dos mais importantes ácidos orgânicos. Tal importância é justificada pelas suas propriedades físico-químicas, tais como sua biocompatibilidade e biossegurança, que lhe conferem uma diversidade de aplicações industriais; – sendo estas características próprias para o desenvolvimento de biopolímeros com aplicações em procedimentos estéticos e de área biomédica (SHAH e VASAVA, 2019).

Quimicamente, apresenta a fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$ com o nome ácido 2-hidroxiopropanóico, definido pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC. É um exemplo de composto quiral, o qual apresenta um grupo hidroxila ligado ao carbono quiral, onde um dos átomos de carbono terminal faz parte do grupo carboxílico e o outro átomo de carbono terminal faz parte do grupo metila. Devido à essa estrutura, existem duas formas isoméricas de AL: forma L(+)-lático, e forma D(-)-lático, conforme ilustrado na Figura 1.1 (LASPRILLA et al., 2012).

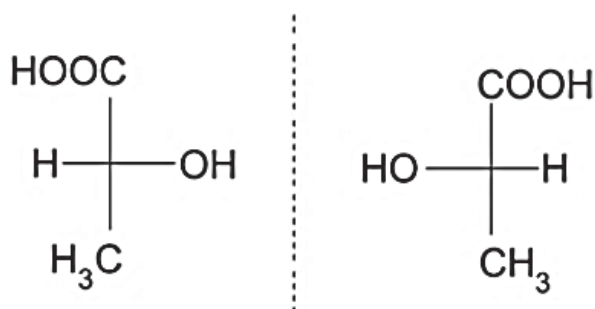


Figura 1.1 – Formas isoméricas ativas do AL
Legenda: à esquerda, encontra-se o isômero em sua forma D(-),
à direita, encontra-se o isômero L(+).

O AL possui diversas aplicações com alta demanda de mercado. Em 2016, a produção alcançou 1220 quilo toneladas, sendo que a produção esperada para 2025 é de 1960 quilo toneladas. Financeiramente, essa produção pode ser equivalente a 9,8 bilhões de dólares, sendo que, dentre as principais empresas produtoras, encontram-se a Corbion, Henan Jindan, Cargill, Dupont, Vigon, Purac e Adicel (BENEVENUTI e PEREIRA, 2016; MORDOR INTELLIGENCE, 2020). O crescimento da produção de AL acompanha o crescimento do mercado de cosméticos, a exemplo da América Latina (19,2%) tendo o Brasil como principal produtor. A alta demanda ocorre devido à biocompatibilidade com a pele humana, além da sua aplicação na indústria de alimentos (MARTINEZ et al., 2012; MORDOR INTELLIGENCE, 2020).

A produção do AL pode ser realizada por vias químicas ou fermentativas. A via química resulta em um produto de baixo rendimento e baixa porcentagem de um isômero puro, ácido L(+)-lático ou ácido D(-)-lático, geralmente, o resultado é de uma mistura racêmica de isômeros ácido L,D-lático (50/50). A produção em escala industrial de AL por fermentação tornou-se amplamente utilizada após a descoberta das bactérias produtoras de ácido lático (LAB). Essas bactérias são capazes de produzir AL a partir de carboidratos simples, como glicose e frutose, ou de dímeros como a sacarose. A fermentação depende do substrato escolhido, e pode ser dividida em fermentação homolática (o produto predominante é o AL) e fermentação heterolática (o produto final é uma mistura contendo principalmente AL, ácido acético e etanol). Devido à seletividade do microrganismo, o AL produzido via fermentação apresenta porcentagens superiores do isômero pretendido (MARTINEZ et al., 2013).

Geralmente, as LAB são homofermentativas, que seguem a rota bioquímica Embden-Meyerhof-Parnas, na qual a glicose é convertida em ácido pirúvico e este é convertido em AL. O rendimento teórico é de 2 mol de AL para 1 mol de glicose. As LAB heterofermentativas podem gerar subprodutos durante o processo, e possuem um rendimento teórico de 1 mol de AL por mol de glicose. A bactéria *Lactobacillus pentosus* apresenta característica homofermentativa facultativa, ou seja, é possível a geração de subprodutos durante a fermentação, mas não obrigatoriamente (PRÜCKLER et al., 2015).

Em termos de recuperação do AL, diversos métodos são descritos na literatura e todos apresentam vantagens e desvantagens. A evaporação apresenta gastos econômicos elevados, pois a vaporização de água consome muita energia. A destilação apresenta dificuldades em relação ao ponto de ebulição do AL e outros ácidos orgânicos. A extração líquido-líquido que apresenta bom rendimento utilizando líquidos convencionais ou iônicos. Os processos industriais utilizam a precipitação de lactato de cálcio, filtração, adição de ácido sulfúrico, purificação usando carvão ativado, evaporação e cristalização. Processos alternativos estão sendo explorados, tais como biorreator de membrana, eletrodialise, osmose reversa, e resinas de troca iônica. Os estágios de separação e purificação final são etapas importantes e em constante adaptação, devido à geração de resíduos e impacto econômico, o qual pode corresponder em até 50% do custo total de produção (AHMAD et al. 2020).

Quando polimerizado, o AL dá origem ao ácido poli-lático (PLA), o qual também possui um carbono assimétrico e possui diferentes formas isoméricas: PLLA (obtido a partir do L-ácido lático), PDLA (a partir do D-ácido lático) e PDLLA (obtido a partir da mistura racêmica). A presença de diferentes formas do AL no PLA tem influência nas propriedades do polímero, tais como cristalinidade e degradabilidade, considerados os principais pontos de

pesquisas por estarem relacionados à estabilidade do polímero e ao comportamento final após aplicações ou descarte no meio ambiente.

A presente tese foi dividida em capítulos. O Capítulo de Revisão apresenta dados e informações gerais sobre o AL como composição química, aplicações, valor de mercado, microrganismos produtores e substratos alternativos. Também apresenta a tendência de exploração e produção do biopolímero PLA, exemplos de aplicações diversas, valor de mercado, desafios industriais e possíveis soluções. O Capítulo II se concentra na produção de AL utilizando um substrato alternativo. O caldo de cana foi utilizado como principal fonte de carbono disponível para a LAB *Lactobacillus pentosus*, que por sua vez, é uma bactéria que reúne boas características para uma fermentação láctica, pois ela é capaz de se adaptar em meios fermentativos contendo pentoses ou hexoses. Assim, a LAB pode seguir uma rota bioquímica homofermentativa, ou heterofermentativa. Ainda neste capítulo, é descrito o processo de recuperação do AL produzido, utilizando técnicas como clarificação e precipitação. O Capítulo III apresenta a alternativa de purificação do AL após a precipitação, com o uso de resinas de troca iônica. Três técnicas são apresentadas: uso das duas resinas em banho-maria com agitação orbital utilizando béquer, uso separado das resinas de modo sequencial em colunas de vidro empacotadas, e, uso simultâneo das duas resinas em tanque com agitação mecânica. O sistema em colunas é conhecido na literatura, porém, o uso de resinas trocadoras de íons em sistema de agitação apresenta pouca, ou nenhuma, exploração. O Capítulo IV reúne um banco de patentes de inovação geradas nas últimas duas décadas. São aplicações importantes que relacionam o AL e seu biopolímero.

Esta pesquisa foi motivada pelo fato de o AL apresentar grande importância comercial e tecnológica. Obtido principalmente por via biotecnológica, utilizou-se a bactéria produtora de AL *Lactobacillus pentosus* devido ao potencial de produção observado em trabalhos do grupo de pesquisa. O caldo de cana provém de uma matéria-prima importante para a indústria sucroalcooleira do Brasil, e neste trabalho, foi utilizado como principal substrato do meio fermentativo por apresentar elevada concentração de açúcares, com plena disponibilidade ao longo do ano e de fácil aquisição. A exploração do AL como molécula de polimerização foi intensificada ao longo dos últimos 20 anos, por se tratar de um polímero natural e seguro à saúde humana e ambiental. Porém, o processo de produção ainda encontra dificuldades em suas etapas, resultando em um procedimento de elevado custo. Visando a melhoria da etapa de recuperação e purificação do AL, este trabalho apresenta um método de purificação exequível com o uso de resinas de troca iônica, assim como de melhor sustentabilidade, pois uma vez utilizada, as resinas podem ser regeneradas. Dessa forma, o presente trabalho visa à produção,

recuperação e purificação de AL a partir de um substrato simples, para uma posterior polimerização.

2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Desenvolver um método escalonável e sustentável para a recuperação e purificação do ácido láctico produzido a partir de caldo de cana como substrato utilizando o microrganismo *Lactobacillus pentosus*.

- Objetivos Específicos

- Produzir ácido láctico a partir de caldo de cana por fermentação submersa pela bactéria *Lactobacillus pentosus*;
- Acompanhar a evolução dos parâmetros cinéticos de produção de ácido láctico;
- Realizar a etapa de recuperação do ácido láctico;
- Realizar a etapa de purificação de ácido láctico utilizando resinas de troca iônica;
- Testar a metodologia de purificação de ácido láctico proposta pela fabricante de resinas de troca iônica;
- Comparar dois métodos (em colunas e sistema agitado) de purificação do ácido láctico utilizando resinas de troca iônica;
- Comparar a(s) taxa(s) de recuperação de ácido láctico utilizando resinas de troca iônica de dois fabricantes diferentes nos diferentes sistemas.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo com publicação em curso pela Revista Bioresource Technology

A concise update on major poly-lactic acid bioprocessing barriers

Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira¹, Luciana Porto de Souza Vandenberghe^{1*}, Ariane Fátima Murawski de Mello¹, Carlos Ricardo Soccol¹

¹ Department Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, CP 19011. Curitiba-PR, Brazil. 81531-980. Phone number: 005541 33613271

* Corresponding author: lvandenberghe@ufpr.br

Abstract

Nowadays, there is a huge interest in first necessity products derived from biomaterials due to environmental concerns. A wide spectrum of biomaterials has been researched in several scientific areas. That is the case of the biopolymer poly-lactic acid (PLA). PLA's success has not started today; its studies have been launched since the 1980s. PLA is a natural polymer formed by lactic acid (LA) monomers. During the organic acid to biopolymer conversion, some difficulties are still present, which may slow the development of LA bioproducts. This fact needs to be solved in order to make PLA even more competitive with conventional plastics. On the other hand, PLA biopolymers' demand increased due to its versatility, where the market is expected to reach US\$ 9.5 billion by 2027. Thus, this paper aims at presenting recent information about PLA production, market and demand, as well as the PLA barriers related to industrial production.

Keywords: Lactic Acid; Biopolymers; Poly-Lactic Acid; PLA, Bioplastics

1.1 INTRODUCTION

Currently, the world has a massive appeal for bioproducts and also for circular bioprocesses, mainly to replace petroleum extraction and its derivatives (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2020). The biopolymer poly-lactic acid (PLA) can act as the main agent in this context, where, PLA is synthesized from lactic acid (LA), which in turn, is industrially obtained from renewable resources *via* biotechnological fermentation processes (ALEXANDRI et al., 2019). PLA has an important role as a biomaterial in cosmetics, pharmaceutical and medical areas, due to its properties and safety (ABDEL-RAHMAN et al., 2013). For this reason, PLA has been the object of research and innovations related to its applications. Also, PLA has its own economic impact on global trades, with a projected market value of US\$ 2.3 billion by 2027 (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2020). This review aims at presenting a fresh point of view concerning the PLA barriers to production, bringing relevant pieces of information.

1.2 LACTIC ACID: OVERVIEW

Lactic acid (2-hydroxypropanoic acid), a naturally occurring acid, was first discovered by the Swedish chemist Scheele in 1780. Since then, it has been studied, even by Louis Pasteur through fermentative findings in 1857 (DATTA and HENRY, 2006). Actually, there are two methods for LA's production: chemical and biotechnological synthesis.

Hydrolysis by a strong acid: a traditional method focused on exposing the LA's lactonitrile group. This method requires chemical solvents of high purity, which represents an expensive procedure. Moreover, it is a long process with low yields. After lactonitrile exposure, acrylonitrile is formed as a by-product. LA needs to be purified by esterification with methanol, then, methyl lactate is produced to, finally, be hydrolyzed in acidified aqueous solution forming LA. Typically, this process gets LA in a racemic mixture (50/50), L (+) lactic acid and D (-) lactic acid. It is a disadvantage, where a monomer with high optical purity is required to produce a PLA with quality properties – high crystallinity and high melting point (OLIVEIRA et al., 2018; JANTASEE et al., 2017; WANG et al., 2015).

Fermentation process: this method is the best alternative to LA production with high purity optical enantiomers. It is based on utilizing Lactic Acid Bacteria (LAB), such as *Lactobacillus* strains that generally produce high LA titers, especially, L-lactic acid enantiomer (> 95%), due to their selective metabolism (WANG et al., 2015; ZHOU et al., 2003). The bacteria use substrates with a high concentration of sugars, including agro-industrial wastes,

which are extensively studied as demonstrated in the recent literature (**Table 1**). Even if it is a viable technique, some details must be observed. One is the cell inhibition process by the LA itself, due to low pHs, which can be minimized with the use of neutralizing agents (calcium carbonate, sodium hydroxide or calcium hydroxide) that must be added to fermentative medium. Final LA is found as a lactate molecule, which makes LA isolation process difficult, due to some physical-chemical properties, with the increase in downstream process costs (MANANDHAR and SHAH, 2020; KWAN et al., 2018).

Table 1
Substrates for LA production

Substrate	Micro-organism	Production LA (g/L.h)	Reference
Potato-processing wastes	<i>L. pentosus</i>	1.6	Oliveira et al. (2021)
Microalgal hydrolysate	<i>L. plantarum</i>	12.6	Nagarajan et al. (2020)
Cheese whey		11.3	
Feather Hydrolysate	<i>L. casei</i>	4.0	Paulova et al. (2020)
Glucose	<i>L. rhamnosus</i>	0.8	Radosavljević et al. (2020)
Glucose	<i>L. pentosus</i>	2.2	Wang et al. (2020)
Carob pod waste	<i>L. rhamnosus</i>	1.2	Bahry et al. (2019)
Orange peel wastes hydrolysate	<i>L. delbrueckii</i>	6.7	de la Torre et al. (2019)
Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate	<i>B. coagulans</i>	1.7	de Oliveira et al. (2019)
Dairy industry waste	<i>L. rhamnosus</i>	1.2	Bernardo et al. (2016)
Soybean vinasse	<i>L. agilis</i>	0.9	Karp et al. (2011)

Despite some technical and economic barriers, it is estimated that more than 90% of global LA production occurs *via* biotechnological conversion. In fact, LA industrial production has started in 1881, by some renowned companies (CORBION, GALACTIC and NATUREWORKS LLC) with the use of renewable sources and lower environmental impacts (ALEXANDRI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; JANTASEE et al., 2017). In 2020, LA had a market perspective of US\$ 3.82 billion (WAINAINA et al., 2020), and its success is due to its industrial versatility, it can be applied in food, cosmetics, pharmaceutical drugs and chemical industry (ABDEL-RAHMAN et al., 2013).

Amid the COVID-19 pandemic crisis since 2020, the whole economical market was revised. LA's market perspective is to reach a size of US\$ 9.5 billion by 2027, growing by 17.7%. In 2020, the U.S. market was estimated at US\$ 821.6 million. From 2020 to 2027, the

LA market will grow 22.4% in China, 15.4% in Canada; 13.9% in Germany and 13% in Japan (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2020).

1.3 POLY-LACTIC ACID

1.3.1 General and economic aspects

PLA is a biodegradable polymer that is being increasingly explored by different industrial sectors, which is obtained from LA monomers. European Bioplastics (2020) defined bioplastics and biopolymers with some differences between them. Bioplastics are biological bases, or biodegradable products, or both. Biopolymers are usually obtained from biological base sources, but also from fossil fuel sources. PLA is a typical example of biopolymer (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2020). Biopolymers have versatile properties; thus, they have several commercial applications. In 2019, more than 50% of biopolymers' applications were still turned to the packaging industry. Moreover, there is also an unavoidable commercial usage of the terms before mentioned, in which, their classification depends on specific degradation conditions, and for that, international certifications are truly necessary, as clearly explained by Niaounakis (2019).

Biopolymer's demand grows as consumers become aware of petroleum products' impact on the environment. Also, the high price of oil is a key factor in the search for alternatives to the conventional market (INKWOOD RESEARCH, 2020). In 2017, 2.05 million tons of bioplastics were produced, with PLA representing a fraction of 10.3% (PLASTICS INSIGHT, 2020). In the global biopolymer market projection up to 2025, the main producers are North America and Asia-Pacific. Even though biopolymers have some advantages, probably PLA is the only biopolymer that reached 100% of industrial production (WAINAINA et al., 2020), and global PLA production volume has increased over the past decade, reaching 293 kilotons in 2019 (TONG et al., 2021).

Rasal et al. (2010) commented on the beginning of PLA exploitation, which is illustrated in a brief chronology (Fig. 1). First, in 1893, lactide formulas were developed by Bischoff & Walden, then PLAs of low molecular weight were produced by Carothers & Coworkers (1932). The first PLA application as a biomaterial occurred in 1954, it was used in medical procedures as sutures, implants and drug-delivery systems (DUPONT DE NEMOURS and ETHICON INC.). Evolution started when PLA fibers were produced (1992) in laboratory using properties of melting point, and commercialized under the name Lactron (1994), by

Japanese companies, Shimadzu Corporation & Kanebo Gohsen Ltd. and Kanebo Gohsen Ltd., respectively. In 1997, France started the commercial production of PLA fibers, named Deposa, by Fiberweb France S.A. Cargill Dow LLC, USA, started a PLA production from a natural component (starch) with a capacity of 140,000 tonnes/year (2002) with NatureWorks trademark. In 2003, PLA Ingeo™ fibers were produced from the NatureWorks™ polymer product (Cargill Dow LLC). Finally, in 2005, there was an important commercial movement when Dow sold its part from the company to Cargill, which in turn, renamed the polymer NatureWorks LLC.

In 2018, Corbion announced the launch of an industrial plant in Thailand, with a production capacity of 75 thousand tonnes of PLA, placing it as a competing market agent. Recently, Total Corbion announced its intention to build a second PLA plant by 2024, this time in France, expanding the PLA capacity up to 100,000 tonnes/year, confirming its place as PLA global leader with a “Zero petrol platform” concept (TOTAL CORBION, 2020). Currently, the main companies involved in PLA production are BASF, Danimer Scientific, Henan Jindan, Synbra Technology, Dow Chemical, Corbion, Natureworks (with a production capacity of 150 thousand tonnes/year, in 2017), Teijin and Wei Mon Industry (INKWOOD RESEARCH, 2020; PLASTICS INSIGHT, 2020).

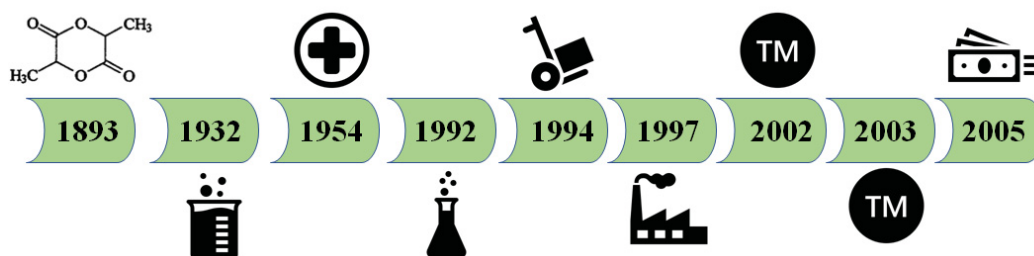


Fig. 1. Timeline summary of PLA exploitation

The main PLA producing regions are North America and Asia-Pacific as can be seen in Fig. 2, where the United States is the largest PLA exporter in the world, reaching the mark of US\$ 116.47 million in 2016. The largest PLA importers are Taiwan, Netherlands and Germany (PLASTICS INSIGHT, 2020). Also, PLA market was valued at US\$ 673.88 million in 2018 and has a forecast of US\$ 2277.57 million for 2027, representing an increase of 14.5% (PLASTICS INSIGHT, 2020).

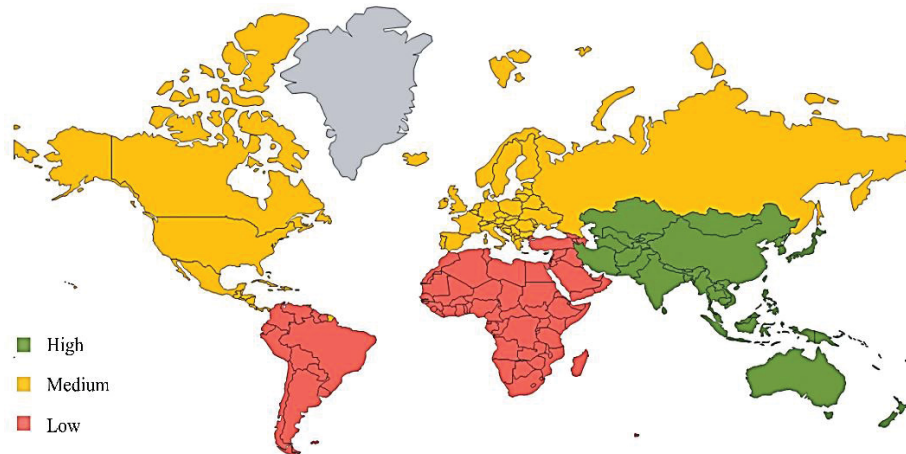


Fig. 2. PLA market growth by region (2019–2024)
Source: Mordor Intelligence (2020).

However, PLA market increase can be undermined by some factors such as the production cost and the material itself – higher when compared to other biopolymers – and the price volatility of PLA original materials (PLASTICS INSIGHT, 2020). On the other hand, with more research and process development derived from cheap substrates and greater environmental awareness, PLA use can be increasingly widespread. In the last years, PLA applications areas are expanding, with great competitiveness in package, automotive, medical and electronic industries (Fig. 3).

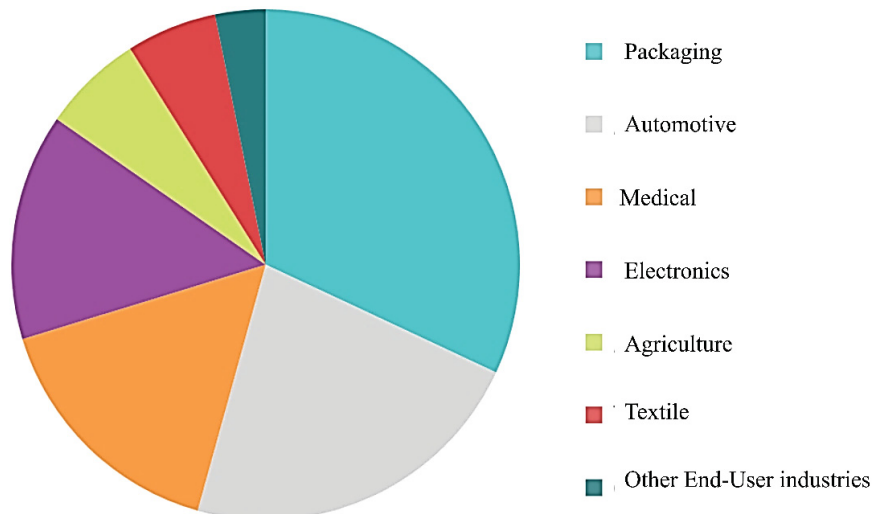


Fig. 3. PLA market volume (%) by global end-user industry (2018)
Source: Adapted from Mordor Intelligence (2020).

1.3.2 Properties and production process

PLA popularity has increased after an intense period of research and scientific publications, and also due to industry interest, between 1980 and 1990. Chemically, PLA is an

aliphatic polyester, where, its structure is based on the unification of LA monomers by ester bonds. This structure allows PLA natural degradation by hydrolysis mechanism, in which, water can break the structured esters bonds, making an *in situ* system degradation (CASALINI et al., 2019). Besides its numerous applications (Fig. 3), and biodegradability, it has considerable biocompatibility with human tissues and organs, which makes PLA an approved material by the American Federal Agency; FDA (Food and Drug Administration), a worldwide reference agency when the focus is on the safety of human health, drugs and biological products (SHAH and VASAVA, 2019; PEREZ-MADRIGAL et al., 2016; SHAMELI et al., 2010).

There are some characteristics and production techniques to be considered when the objective is to achieve a PLA of high quality. What makes PLA a safe product is its degradation kinetics and mechanical properties, which, can be accompanied and adjusted aiming at an optimized and specific device. Also, PLA's by-products, such as LA and short oligomers, are safely detected by the human body and its absorption occurs as a natural component, which results in its claimed biocompatibility (CASALINI et al., 2019).

PLA is a hydrophobic polymer; its synthesis depends on LA monomers, mainly L-lactic acid in its highest purity isomer form when it is named poly-L-lactic acid (PLLA). It is possible to obtain other polymers from LA monomers such as poly-D-lactic acid (PDLA) an homopolymer, and from racemic mixtures (D and L monomers) the copolymer poly-D,L-lactic acid (PDLLA) is generated. These biopolymers have different physical-chemical properties (Table 2) that may interfere in a specific final product application (CASALINI et al., 2019).

Table 2
Biopolymers and its physical-chemical properties

Biopolymer Properties	Poly-lactide	Poly(L-lactide)	Poly(D-lactide)	Poly(D,L-lactide)
Crystallinity	Semi	Semi	Crystalline	Amorphous
Density (g cm ⁻³)	1.21-1.25	1.24-1.30	1.248	1.25-1.27
Solubility	C ₄ H ₈ O ₂ , C ₂ H ₃ N, CHCl ₃ , and C ₂ H ₂ Cl ₂ O ₂ .	CHCl ₃ , C ₄ H ₈ O ₂ , C ₃ H ₆ O ₂ , furan.	THF, DMSO, DMF, N, N-xylene, C ₅ H ₁₀ O ₃ and C ₄ H ₈ O ₂ .	C ₃ H ₆ O and PLLA solvents.
Elongation at break (%)	10-100	12-26	20-30	30-35
Glass transition temperature [T _g (°C)]	60-65	50-65	50-65	50-60
Melting temperature [T _m (°C)]	150-162	170-200	120-150	—
Tensile modulus (GPa)	2.7-16	7-10	7-10	1.5-1.9
Tensile strength (MPa)	21-60	15.5-150	15.5-150	27.6-50

Source: Adapted from Munim and Raza (2019); Haleem et al. (2017); Farah et al. (2016); Lasprilla et al. (2012).

These properties can change and can be molded according to process application. The main difficulty is related to its purity which can be reached through different techniques such

as electrodialysis, ion exchange, membrane separation, reactive distillation and liquid extraction. However, these techniques are usually expensive. Regardless of the polymer or copolymer that will be synthesized, they are obtained through the most usual polymerization technique, which is the ring-opening polymerization of lactide monomer, due to the high molecular weights that are obtained. In addition, there are also advantages such as short residence time and low by-products formation during the process. At the industrial scale, PLA also can be processed by knowing technologies including injection molding, blow molding, thermoforming and sheet extrusion (ALBUQUERQUE et al., 2021; CASALINI et al., 2019). PLA's final application must consider the involved degradation mechanisms of these polymers, where, which depend on their properties and conditions such as humidity, oxygen availability, pH, temperature and isomer proportion (CHUENSANGJUN et al., 2013).

1.3.3 Degradation mechanisms

Bioplastic degradation can occur in aerobic and anaerobic atmospheres. Currently, anaerobic digestors are gaining importance due to green energy production, and, bioplastic have the biochemical potential to liberate methane gas during its conversion. Various substrates degradation processes were attended, depending on its composition, PLA can reach 60% of degradability during 30 days under thermophilic conditions (ABRAHAM et al., 2021). Moreover, the soil biodiversity is not affected, thus, PLA presents itself as a viable option to replace fossil-based plastics (RAI et al., 2021). A detailed study was recently published by Cucina et al. (2021), where, it is possible to survey PLA's degradability under different circumstances, such as in soil or aquatic environments.

Despite its promising characteristics, PLA has some limitations related to high brittleness, low thermal stability and low crystallization rate. Recent studies demonstrate that the improvement of these characteristics can be achieved by blends. Such blends may consist of biomass, for example, natural fibers with lignocellulosic structure, blends with other biopolymers, such as Poly-3-hydroxybutyrate (PHB), or even a mixture with other synthetic polymers. The latter is the target of detailed studies, as they are petroleum-based materials, and, therefore, involve an environmental concern (ROSLI et al., 2021).

Important data about PLA degradation mechanisms were reported by Zaaba and Jaafar (2020) in a review concerning the literature interest on this particular theme, from a total of 8008 studies, where, 45% is related to enzymatic degradation (Fig. 4). This fact is related to

biopolymers' synthesis from diverse components and biomasses, which contribute to enzymatic performance and, consequently, to the environmental aspect.

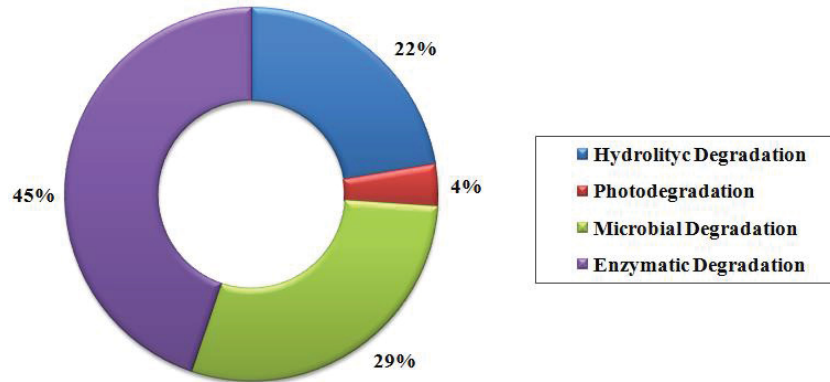


Fig. 4. PLA's processes degradation according to literature

Source: Adapted from Zaaba and Jaafar (2020).

Enzymatic hydrolysis conversion has a key role but at higher costs. It is justified by high enzyme dosage, in order to obtain hydrolysis at better levels (AKKOYUNLU, et al., 2021, USMANI et al. 2021). Regarding this, the microbe consortium could be an alternative as they are known to improve fermentation processes, and consequently, improves the yield of biomass-degrading enzymes. For example, some bacterial proteases and lipases, that have the capacity to completely consume a PLA film (ELSAWY et al., 2017; BUBPACHAT et al., 2018).

1.4 BARRIERS IN PLA PRODUCTION AND RECOVERY

LA production has been investigated since 1780, at industrial scale since 1881 (ALBUQUERQUE et al., 2021) and nowadays is a well-established technology. Besides, the growing interest in reducing dependency on fossil fuels and petroleum-based materials boosted the LA market due to the possibility of manufacturing its biopolymer, PLA (ABDEL-RAHMAN et al., 2013). However, there are still bottlenecks in the biological production of LA and PLA (Fig. 5) that may slow the development of these bioproducts and need to be solved in order to make PLA even more competitive with conventional plastics. The first gap in LA production is identified in the substrate choice processing and consist of the expensive media cost involved when pure sugars are applied. In addition, the usage of some renewable sources for LA production is not encouraged since it can compete with food supply. Therefore, integrated production of LA and other products (such as ethanol) in a biorefinery concept and

the use of alternative substrates, mainly lignocellulosic biomass, should be explored and largely encouraged.

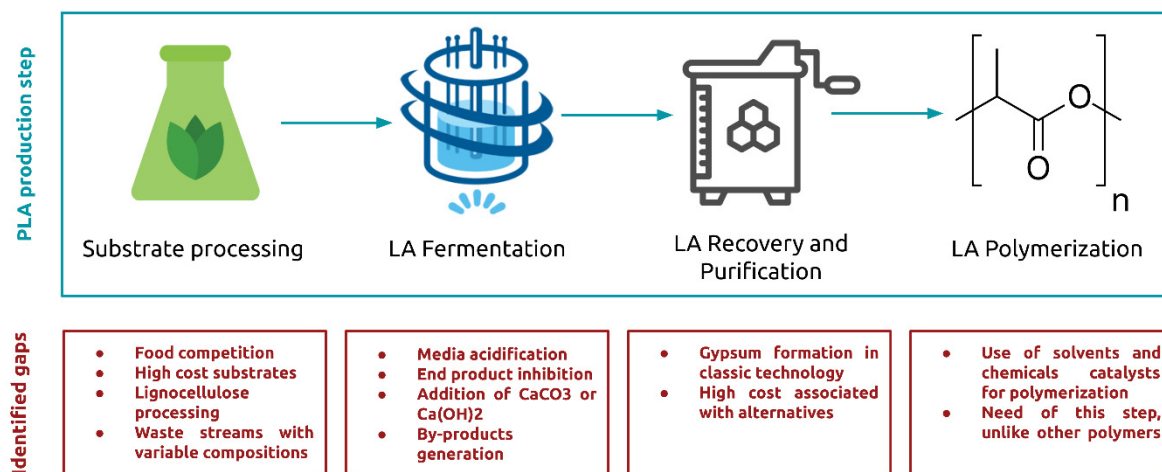


Fig. 5. Identified gaps in PLA production and recovery processes

The usage of waste streams and by-products of agricultural processing is being highly investigated, not only for sustainable LA production but also for other bioproducts. The main challenges involving these substrates are the difficulty in processing since lignocellulose is a complex and intricate matrix, the formation of fermentation inhibitors (such as acetic acid and hydroxymethylfurfural) during pretreatment and hydrolysis (KUMAR et al., 2020) and the variable composition from batches of some waste streams, such as wastewater and oil. Regarding lignocellulosic processing, several pretreatment strategies are constantly being developed for better hydrolysis and release of sugars (SINGHVI and GOKHALE, 2013). When choosing a certain biomass as substrate for LA production, the composition of polysaccharides and lignin needs to be well known for better pretreatment choice. Chemical pretreatments are the most applied, but are the ones that generate the larger concentrations of inhibitors in the final hydrolysate (HAGHIGHI MOOD et al., 2013). Thus, the use of chemicals for biomass pretreatment is a highly discussed topic since the reagents used in processing can be harmful to the environment and need to be well managed for proper discard, generating extra costs for bioprocesses (AHMAD et al., 2020).

Recently, the use of new solvents has been explored, mainly ionic and deep eutectic solvents. They still have a higher employment cost (AHMAD et al., 2020; CHEN and MU, 2021) when compared to conventional chemicals, but these costs can be reduced by choosing appropriate strategies for solvent synthesis. Besides, the characteristics of biocompatibility of these solvents can reduce environmental impact and, therefore, further costs of waste treatment

(CHEN and MU, 2021). Finally, a strategy for further production of LA with lignocellulosic hydrolysates is to genetically improve the microorganisms involved in the bioprocess, making them more robust and tolerant to the presence of fermentation inhibitors, also making them able to process C5 sugars present in the hemicellulosic fraction of biomass (ZHANG et al., 2018). The inhibitors can also be removed from the hydrolysate by applying adsorption, extraction or salting-out technologies. However, the application of an additional step for hydrolysate attainment can make the process costlier and, therefore, less competitive (KUMAR et al., 2020).

In the LA production step, the main bottlenecks are the media acidification due to formation of the product that can slow down microbial growth, the inhibition of microorganisms development by end-product formation, the addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or CaCO_3 in traditional processes to media neutralization and by-products generation. The main strategy to solve the gap of limited growth of microorganisms due to acidic media or end-product inhibition is the development of new genetically engineered strains, mainly bacteria and yeasts. Baek et al. (2017) developed an acid-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae* through genetic engineering and adaptive evolution, reaching a production of 82.6 g.L^{-1} of LA in a fed-batch operation mode and at a pH of 3.8. *Lactobacillus rhamnosus* has also been submitted to mutation by NTG and UV as agents, and protoplast fusion was also performed. The best-selected strain was able to grow at pH of 3.25 and produce up to 84 g.L^{-1} of LA (WANG et al., 2007). With the application of these organisms, the problem of the addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is also solved, since the acidic media does not need to be neutralized during fermentation.

Other alkaline agents can be added as alternatives to calcium hydroxide such as NH_4OH and $\text{Mg}(\text{OH})_2$ that prevent gypsum formation but can cause growth inhibition (SINGHVI et al., 2018). End-product inhibition can also be solved by applying other fermentation strategies, mainly the continuous operation, in which new media is fed in the bioreactor at the same rate that fermentation broth is removed, maintaining a constant volume and high productivity (ABDEL-RAHMAN et al., 2013). The by-products formation in fermentation of LA happens mainly due to the applied micro-organism. Heterofermentative LAB generates not only LA in the fermentation, but also acetic acid, ethanol and CO_2 (PRÜCKLER et al., 2015). This gap can be unraveled by the certain choice of microorganism and substrate at the beginning of the process.

In the downstream step, the main inconveniences found are the application of hazardous solvents and consequent gypsum formation in classic LA recovery technology, where high costs are associated with new technologies developed for LA recovery when compared to the classic method. The most applied LA recovery methodology from the

fermentation broth involves the use of H_2SO_4 for the conversion of calcium lactate to LA, generating CaSO_4 (gypsum) in a proportion of 1:1 (1 ton of LA:1 ton of gypsum) (SINGHVI et al., 2018). The management of this waste is costly for industries and the generation of this kind of waste can threaten the concept of green technology (de CASTRO et al., 2022).

The main new technologies developed for LA recovery are electrodialysis, ion-exchange chromatography and adsorption. Although being techniques with great selectivity that present great recovery yields in laboratory scales, which do not apply hazardous solvents and generate fewer solid wastes, they are still not applied industrially due to the high costs involved in the implementation of these processes and the difficulty of scaling up (RAWOOF et al., 2021; de OLIVEIRA et al., 2020). Besides, in adsorption systems, liquid wastes are still generated due to the need for washing and regenerating columns (de OLIVEIRA et al., 2020). Therefore, research and development need to be made in the systems for recovery and purification of LA in order to reduce the costs for the new technologies and properly implement industrial viable and sustainable processes.

The last step of bio-based PLA production is the polymerization of LA for bioplastic formation. The main bottlenecks of this process are the application of solvents and chemical catalysts for polymerization that can generate unwanted residues or residual concentrations of catalysts in the bioplastic (ALBUQUERQUE et al., 2021) and the need for this step when compared to other bioplastic like polyhydroxyalkanoates (PHAs), which are directly polymerized by different microorganisms as energetic reservoirs in conditions of metabolic stress, such as excess of carbon sources and/or limitation of nitrogen and other nutrients (STORZ and VORLOP, 2013). A new trend in modifying microorganisms has as its objective the development of new strains that can produce PLA, in a unique reactor like in PHA processes, enhancing all steps and improving the whole biopolymer production process. These microorganisms are usually engineered to express LA-polymerizing enzyme (LPE), a type of engineered PHA synthase (enzyme responsible for the polymerization of PHA, but able to polymerize other monomers) (SINGHVI and GOKHALE, 2013; SINGHVI et al., 2018). To date, *Escherichia coli* strains have been developed to produce homo and copolymers of PLA and PHAs (JUNG et al., 2010; SINGHVI et al., 2019) and *Corynebacterium glutamicum* to produce a copolymer (SONG et al., 2012; SINGHVI et al., 2019). However, this technology is still incipient and several steps of development still need to be conducted in order to achieve an industrial scale of application. If well-developed and applied, these strains and processes can radically change the way PLA is produced.

Other biological strategies of polymerization are also applied, using lipases derived from microbial sources as catalysts in the ring-opening polymerization (ROP) or polycondensation reactions (GKOUNTELA and VOUYIOUKA, 2022). The main advantage of applying enzymes for PLA polymerization is the absence of residual chemicals in the final product, which is ideal for medical and pharmaceutical applications. However, this method of polymerization still presents higher costs when compared to conventional ones.

It is clear that there is still a need of developing new technologies that could enhance and promote more sustainable and economical production processes of LA and PLA. The presented alternatives to overcome the main bottlenecks in LA production need to be well explored and developed in order to make them viable for application at industrial scale. The production of PLA in a single reactor using an engineered strain capable of directly synthesizing the polymer from hydrolysates derived from alternative substrates would be the ideal scenario and main goal for future research and development in this area.

1.5 SUMMARY OF KEY-POINTS

The main important aspects that could improve PLA bioproduction are now summarized. The biggest barrier concerns the financial terms. Costs may be optimized to turn the process economically profitable and, mainly, increase this optimization at industrial scales. Life cycle analysis of biomass waste must be considered, then, the industrial costs and environmental impacts are balanced (ORTIZ-SANCHEZ and ALZATE, 2022, AKKOYUNLU, et al., 2021, USMANI et al., 2021).

New enzymes sources and bioengineering tools to obtain strains more efficiently in carbon consumption, would improve PLA quality, lowering the downstream process costs (USMANI et al., 2022).

To guarantee a better PLA degradation, studies are focusing on aerobic and anaerobic ambient, where, a microbe consortium can be used to obtain key-enzymes consumers, such as proteinase-K, pronase and bromelain, then, degradation efficiency is increased in fewer days (ROSLI et al., 2021).

Also, PLA recycling is an interesting alternative that needs more studies, due to the chemicals used during the process, it would be another route to obtain LA monomers or its lactate esters (CUCINA et al., 2021).

1.6 CONCLUSIONS

PLA technology and applications have been intensively developed. In fact, there is a huge demand for green technologies or products, and, biopolymers are being considered to replace petroleum-based products. Due to its properties and safety, PLA is not only employed in packages' manufacturing, but it also appears in biomaterials, bio-implants, biomolecular markers, nano-encapsulation, cosmetic processes, drug delivery systems and much more. The increasing interest in PLA led to the appearance of different challenges at the industrial scale, and viable solutions were presented to solve them. Strategical studies are demanded in technological improvement as well as the tests of new potential applications.

Acknowledgements

Authors want to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

Author's contributions

Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira: Methodology, investigation, formal analysis, data curation, visualization, writing - original draft, writing - review & editing; Luciana Porto de Souza Vandenberghe: Supervision, resources, visualization, writing - review & editing, funding acquisition; Ariane Fátima Murawski de Mello: Methodology, investigation, formal analysis, data curation, visualization, writing - review & editing; Carlos Ricardo Soccol: Resources, funding acquisition; review.

CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO CALDO DE CANA COMO SUBSTRATO

2.1 INTRODUÇÃO

O ácido lático (AL) é o nome popular do ácido 2-hidroxiopropanóico ($C_3H_6O_3$), cuja molécula apresenta um carbono quiral, o que significa existir dois isômeros opticamente ativos: o ácido L(+)-lático e o ácido D(-)-lático. Possui uma vasta aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos e mais recentemente, a sua aplicação na forma polimerizada de ácido poli-lático (PLA) se tornou indispensável na indústria de cosméticos, fármacos e biomédica (KLOTZ; KUENZA; PRÜBE, 2017).

A produção de AL nas formas ativas de L, D ou em mistura D-L (racêmica), depende da cepa microbiana produtora, resultando em propriedades significativamente diferentes quando polimerizado. As bactérias produtoras do ácido lático (LAB) consiste em um grupo de bactérias, que produz AL como principal produto metabólico, a exemplo a cepa de *Lactobacillus pentosus*, que segue a rota homofermentativa apresentada na Figura 2.1 (MARTINEZ et al., 2013). Outras LABs conhecidas pela bioconversão de AL com alta produção entre 99 g/L – 222 g/L são: *Sporolactobacillus inulinus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus rhamnosus* (KLOTZ; KUENZA; PRÜBE, 2017; AWASTHI et al. 2018; ALEXANDRI et al. 2019).

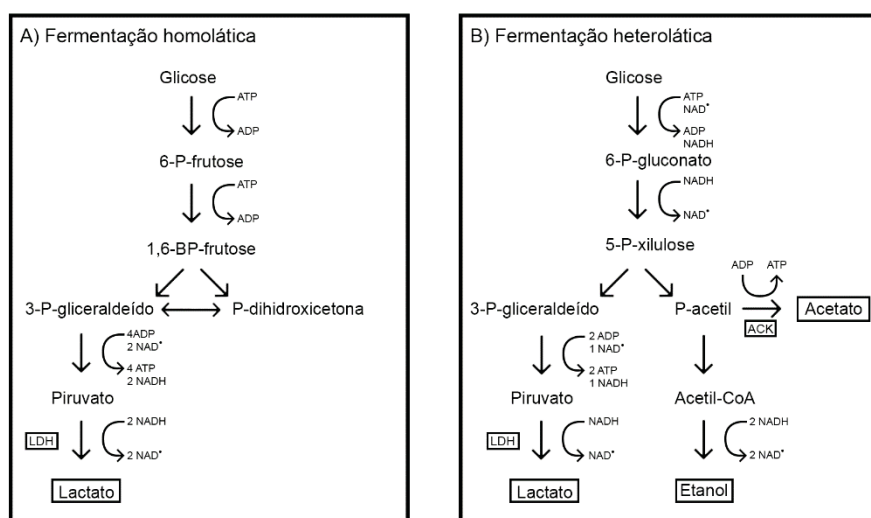


Figura 2.1 – Rotas do metabolismo da glicose em fermentações homolática (A) e heterolática (B)

As fontes de carbono utilizadas para a produção de AL podem ser açúcares simples como a glicose, frutose ou dissacarídeos como a sacarose. Diversos subprodutos podem ser utilizados como substrato para a produção de AL, tais como soro de queijo (CHANDRAPALA et al. 2017), mucilagem de café (ORREGO; ZAPATA-ZAPATA; KIM, 2018), hidrolisados de lignocelulose, resíduos urbanos e resíduos de alimentos (ALEXANDRI et al. 2019). O caldo de cana é uma bebida obtida de um importante substrato para a indústria sucroalcooleira nacional, sendo que o país é um grande produtor de cana-de-açúcar, cuja a safra de 2021/2022 tem a expectativa de atingir 568,4 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Este caldo é extraído diretamente da cana-de-açúcar através do processo de moagem mecânica. É característico pela sua coloração, que varia do marrom ao verde escuro – em função da presença de compostos fenólicos, e também, clorofila –, grande quantidade de água (80%), e principalmente pelos açúcares presentes, dos quais incluem sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%). Da fração sólida, pode-se obter substâncias nitrogenadas, gorduras, pectinas, ácidos orgânicos e cinzas. A composição varia de acordo com a cultivar, época de colheita, solo clima (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

O lactato de cálcio é o produto principal durante a fermentação submersa, devido à forte inibição que o microrganismo pode sofrer pela diminuição do pH do meio durante o processo. Faz-se necessário o uso de agentes neutralizantes adicionados ao meio fermentativo, como carbonato de cálcio ou hidróxido de cálcio e de sódio. Tais agentes conferem estabilização do pH durante o processo fermentativo, propiciando um ambiente favorável para o desenvolvimento celular e consequente produção de AL. Para se obter o AL, uma das técnicas mais utilizadas, inclusive em escala industrial, é o método de precipitação utilizando ácido sulfúrico. Aliada ao uso de carvão ativado, esta técnica apresenta rendimento superior (em torno de 60-70%) às demais, mas que ainda apresenta perdas e produção de resíduos, tais como o sulfato de cálcio (PAPADIMITRIOU et al., 2016; XU et al. 2020; LI et al. 2021).

Considerando a alta concentração de açúcares naturais do caldo de cana, a alta disponibilidade durante o ano, e o baixo custo de aquisição, apresenta-se como um bom substrato para a produção de AL por fermentação submersa. Com isso, este trabalho teve como objetivo realizar a produção de AL, utilizando o caldo de cana como substrato pela bactéria *Lactobacillus pentosus*, com posterior etapa de recuperação envolvendo o uso de carvão ativado e precipitação com solução de ácido sulfúrico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o procedimento experimental foi realizado nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da UFPR em Curitiba/PR, Brasil.

2.2.1 Microrganismo

A bactéria produtora do ácido láctico (LAB) *Lactobacillus pentosus* foi cultivada em caldo MRS (Man–Rogosa–Sharpe) a 35°C durante 24 horas. Após incubação, adicionou-se glicerol à cultura para armazenamento em temperatura de -20°C, com renovação periódica do cultivo.

2.2.2 Substrato

O caldo de cana foi obtido do comércio local no município de Curitiba-Paraná, extraído mecanicamente direto da cana-de-açúcar. Para ser utilizado como substrato, o caldo foi submetido à filtração convencional para a remoção de sólidos suspensos. Características do substrato em relação à quantificação de açúcares totais e íons solúveis foram analisadas, os métodos são descritos em 2.2.5.

2.2.3 Produção de ácido láctico utilizando caldo de cana como substrato

2.2.3.1 Preparo do inóculo

A cultura de *Lactobacillus pentosus* previamente armazenada em glicerol (-20 °C) foi reativada em caldo MRS a 35°C durante 24 horas. Após o crescimento, a cultura foi utilizada para inocular o meio de crescimento de composição otimizada por Oliveira (2016): caldo de cana em concentração de 20 g/L de açúcares redutores totais e 25 g/L de extrato de levedura. A propagação do inóculo ocorreu em frasco de Erlenmeyer de 125 mL com 75 mL de meio de cultura e 10% (v/v) de taxa de inoculação, mantido em condições de 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas.

2.2.3.2 Cinética de produção

A produção de AL utilizando caldo de cana como substrato foi realizada. O meio foi composto por condições previamente otimizadas por Oliveira (2016): caldo de cana em concentração de 230 g/L de açúcares redutores, 15 g/L de extrato de levedura e 90 g/L de CaCO_3 e taxa de inoculação de 10% (v/v). A cinética de produção do AL foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de meio de cultura, incubados a 30°C, sob agitação de 120 rpm durante 168 horas. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para acompanhar concentração de AL produzido (g/L), o perfil de pH e consumo de açúcares.

2.2.4 Recuperação do ácido lático

O processo de recuperação do AL a partir do caldo fermentado contendo a forma de lactato de cálcio, compreende diversas etapas apresentadas na Figura 2.2.



Figura 2.2 – Etapas para a recuperação de AL

O caldo fermentado contendo lactato de cálcio foi aquecido em banho-maria em temperatura a 50°C, posteriormente foi centrifugado 1800 x g (vezes gravidade) durante 20 minutos (Centribio, modelo 80-2B). Em seguida, o caldo centrifugado foi filtrado utilizando funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº1, com o auxílio de bomba de vácuo.

Visando utilizar a técnica de precipitação, faz-se necessário o uso de carvão ativado conforme descrito por Oliveira (2021). Consiste no uso de uma proporção de 15% (m/v) de carvão ativado para 30 mL de caldo fermentado, mantido em banho-maria 50°C sob agitação de 100 rpm, durante 25 minutos. Decorrido o tempo, o carvão ativado é removido por centrifugação ($1800 \times g/20$ minutos), obtendo-se um caldo clarificado. Este caldo clarificado passa por precipitação ácida com solução de ácido sulfúrico (4 mol/L) sob agitação magnética até completa homogeneização, para a conversão do então lactato de cálcio em AL. A solução é novamente centrifugada ($1800 \times g/20$ minutos) para a separação do AL convertido (fase líquida translúcida) do sulfato de cálcio (precipitado branco), observado na Figura 2.3.

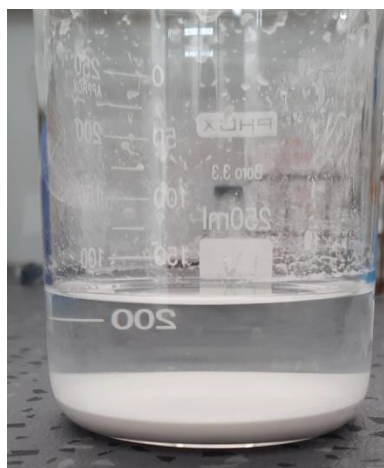


Figura 2.3 – Conversão ácida do lactato de cálcio em AL, com precipitação do CaSO_4

2.2.5 Métodos analíticos

A solução de AL obtida após conversão ácida foi diluída e micro filtrada através de membrana de acetato celulose Millipore de 0,22 μm , e analisada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna Hi-Plex (300 x 7,7 mm) a 60 °C, regime isocrático de fase móvel H_2SO_4 0,005 M, vazão de 0,6 mL/min.

A *L. pentosus* é uma bactéria homofermentativa, que prioriza a produção de 2 mols de AL por mol de glicose. Portanto, o rendimento do processo fermentativo para a produção de AL foi calculado a partir da relação de conversão do substrato (açúcares totais) em produto (AL), considerando o rendimento teórico máximo, em massa molecular, da conversão de glicose em AL, equivalente a 1,0.

A medição do pH foi realizada diretamente nas amostras com o uso do potenciômetro MS Tecnozon mPA 210. Os teores de açúcares redutores totais foram determinados pela reação

com ácido dinitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), com adaptação para a determinação dos teores de açúcares totais, que sofreram hidrólise ácida por HCl concentrado. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de microplaca BioTek PowerWave HT em comprimento de onda de 540 nm. Os cátions e ânions foram determinados por meio do cromatógrafo de troca iônica Ion Analysis Metrohm CH-9101, a partir do caldo de cana. Os cátions foram determinados em coluna Metrosep C3 mantida a 40°C com fluxo de 0,9 mL/min de fase móvel 3,5 mM HNO₃. Os ânions foram determinados em coluna Metrosep A supp 5 mantida em temperatura ambiente com fluxo de 0,7 mL/min de fase móvel 1 mol/L bicarbonato de sódio e 3,2 mol/L carbonato de sódio.

2.2.6 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (em triplicata). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância dos resultados, onde $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Substrato

Através da análise de cromatografia de íons, foram detectados os principais íons, respectivamente: sódio (0,055 mg/mL), potássio (0,349 mg/mL), magnésio (0,152 mg/mL) e cálcio (0,166 mg/mL). A literatura indica que a concentração dos principais íons pode variar entre: 9,0 – 216 mg/mL de magnésio, 17 – 200 mg/mL de potássio, e 79 – 140 mg/mL (COSTA et al., 2015; FERREIRA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2009). Em análise de açúcares redutores totais, o caldo de cana apresentou alta concentração de açúcares, 308 g/L. Geralmente o caldo de cana apresenta elevado teor de açúcares totais, em torno de 210 g/L a 350 g/L (ALENCAR et al., 2010; BARREIRO et al., 2011). Essas são características que variam de acordo com diversos aspectos, tais como: o tipo de cultivar, sanidade da cana-de-açúcar, condições do solo de plantio, região de plantio e época de colheita (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A determinação dos cátions, ânions e açúcares totais são parâmetros importantes, pois estes podem auxiliar ou inibir o desenvolvimento do microrganismo em um processo fermentativo, bem como a interferência em processos de *downstream*.

2.3.2 Cinética de produção de ácido láctico utilizando caldo de cana como substrato

A cepa de *Lactobacillus pentosus* apresentou boa adaptação ao meio contendo caldo de cana, conforme ao crescimento celular e acúmulo do produto. Uma cinética de produção de AL foi acompanhada durante 168 horas, porém, a partir de 120 horas foi observado a formação de lactato de cálcio sólido, dificultando as etapas de recuperação e análises (Figura 2.4).



Figura 2.4 – Parâmetros acompanhados durante 120 horas de fermentação: concentração de AL, açúcares redutores totais e pH

Legenda: As barras de erro correspondem aos valores de desvio padrão.

Amostras foram retiradas a cada 24 horas. Apresentando diferenças significativas entre as médias de produção ao longo de 120 horas de fermentação (Tabela 2.1), a melhor produtividade foi alcançada em 96 horas, de 1,18 g/L.h, acumulando 113,74 g/L de AL (Figura 2.4).

Tabela 2.1 – ANOVA para a produção de AL durante 168 horas

CAUSA DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	TRATAMENTO
Tratamentos	5	22271,4	4454,28	11,92	4,38	120h <i>a</i>
Resíduo	6	2242,29	373,71			96h <i>ab</i>
Total	11	24513,7				72h <i>abc</i>
C.V.	27,25%					48h <i>abc</i>
						24h <i>bc</i>
						0h <i>c</i>

Legenda: G.L. graus de liberdade; S.Q. soma dos quadrados; Q.M. quadrado médio; F: valor calculado; F (5%): valor tabelado; C.V. coeficiente de variação; *a*, *ab*, *abc*, *bc* e *c*: Teste de Tukey.

Os dados foram gerados em *software* SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Os resultados dos parâmetros avaliados durante a produção de AL em cinética fermentativa de 120 horas, pela cepa de *L. pentosus*, estão dispostos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Dados para a cinética de produção de AL durante 120 horas

Tempo (h)	pH	ART (g/L)	AL (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Y _{P/S}	Recuperação em massa de AL
0	6,53	230,67 ± 0,00	–	–	–	–
24	6,52	146,62 ± 0,00	73,49 ± 50,78	3,06	0,28	41%
48	6,41	136,37 ± 0,00	71,73 ± 5,89	1,49	0,18	40%
72	6,33	161,15 ± 0,00	79,16 ± 7,42	1,10	0,29	44%
96	6,00	156,02 ± 0,00	113,74 ± 29,53	1,18	0,34	63%
120	5,94	150,90 ± 0,00	153,26 ± 12,93	1,28	0,53	85%

Legenda: **ART** – açúcares redutores totais (g/L); **AL** – concentração de ácido lático após a precipitação (g/L); **Y_{P/S}** – fator de conversão de substrato em produto.

Concentrações de AL produzidos a partir de diferentes substratos são encontrados na literatura. Karp et al. (2011) alcançaram a produtividade de 1,13g/L.h em fermentação da LAB *Lactobacillus agilis*, a concentração de 138 g/L de AL foi produzida após otimização em substrato de vinhaça enriquecido com melaço de soja. Bernardo et al. (2016) utilizaram uma composição de soro de queijo e licor de milho como meio de fermentação para a LAB *Lactobacillus rhamnosus* B103. Em um primeiro momento, alcançaram a produção de 57 g/L de AL e produtividade de 1,18 g/L.h. A produção de AL foi aumentada para 106 g/L, após utilizar a fermentação com pulsos de carbono. A fermentação com pulsos de substrato, ou seja, batelada alimentada, é uma alternativa bem difundida, visando obter melhores produções de AL. Li et al. (2010) testaram a glicose como fonte de carbono em pulsos para a LAB *Lactobacillus rhamnosus*, a produção inicial de AL de 90 g/L passou para 130 g/L. A técnica de imobilização celular também é reconhecida pelo aumento de produtividade. Em meio sintético otimizado, Wang et al. (2020) imobilizaram células de *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em uma mistura otimizada de base de hidrogel. A produção de AL através de células livres era de 90 g/L com produtividade de 1,3 g/L.h, através de células imobilizadas, a produção passou para 106 g/L de AL e produtividade de 2,2 g/L.h. Outra forma utilizada com frequência, é a hidrólise do substrato por diversos tipos de pré-tratamentos. Paulova et al. (2020) alcançaram uma produtividade de AL de 4,0 g/L.h utilizando hidrolisado de penas de frango e a LAB *Lactobacillus casei*. Assim como de la Torre et al. (2019), que alcançaram uma alta produtividade de AL de 6.7 g/L.h utilizando hidrolisado de cascas de laranja e a LAB *Lactobacillus delbrueckii*. Ressalta-se que no presente trabalho, atingiu-se uma alta produção de AL utilizando o caldo de cana diretamente como substrato, sem tratamento prévio.

A relação entre o alto consumo de açúcares (Figura 2.1) e a baixa produção de AL no período inicial da fermentação, indicam a fase de manutenção celular. Li et al. (2021) descrevem um aumento rápido de produção de AL no terceiro dia de fermentação utilizando cepas do

gênero *Lactobacillus*, a partir do quarto dia a produção começa a cair, em meio composto de resíduos de alimentos. Cirlini et al. (2020) também observaram ciclos da fase log durante as 48 horas iniciais de fermentação, em um estudo de *screening* de 12 cepas de bactérias do gênero *Lactobacillus*, utilizando suco de *elderberry* como substrato. Visualmente, há formação do bloco sólido de lactato de cálcio (Figura 2.5) a partir de 120 horas, momento em que ocorre considerável acidificação do meio, apresentando dificuldades analíticas. Por conseguinte, a cinética de 168 horas foi encerrada em 120 horas.



Figura 2.5 – Comparação visual do caldo fermentado contendo lactato de cálcio
Legenda: à esquerda: aspecto de separação em fases do caldo fermentado, durante as 72 horas iniciais de fermentação; à direita: aspecto de bloco sólido do caldo fermentado, a partir de 96 horas de fermentação.

De modo geral, os dados são congruentes com a literatura. Como característica inicial, o meio fermentativo é líquido e com pH neutro devido à adição de CaCO_3 . De fundamental importância, o CaCO_3 é considerado um agente neutralizante do AL produzido durante a fermentação, contribuindo para a formação de lactato de cálcio. As bactérias LAB apresentam certa sensibilidade à mudança de pH do meio fermentativo, quando o AL é secretado, o pH do meio diminui. De acordo com os dados de pH obtidos durante a cinética, observa-se que o CaCO_3 é efetivo no controle de variações de pH, suportando, inclusive, as variações de pH quando ocorre atividades metabólicas no período entre a manutenção celular e a produção de AL. Quando um meio fermentativo é controlado por outro método convencional – por exemplo o uso de solução tampão – o estresse metabólico representa danos celulares mesmo em LABs conhecidas por maior tolerância em meios acidificados, como as cepas de *Lactobacillus plantarum* (FILANNINO et al., 2014).

Em uma fermentação láctica, é imprescindível o acompanhamento dos valores de pH, pois o AL tem a capacidade de dissociar e liberar prótons. Desse modo, o meio acidificado é

difundido na membrana celular, afetando diretamente o metabolismo celular. A bactéria não possui alternativa de defesa, por se encontrar em um momento de alto consumo de energia para a manutenção do pH interno. Este evento resulta na inibição da taxa de crescimento celular e, conseqüentemente, na redução da taxa de produção do AL. Este é um mecanismo de inibição do microrganismo pelo produto. Nesse momento, a importância do agente neutralizante se destaca, através da reação com o AL não dissociado produzindo o lactato de cálcio, que por sua vez, é menos prejudicial ao microrganismo (PAPADIMITRIOU et al., 2016). Os estudos mostraram que o valor ótimo para a multiplicação celular é em torno de 6—6,5. Os valores identificados durante as 24 horas iniciais de fermentação visualizados no presente trabalho, corroboram com esta observação dos autores.

O controle de pH em fermentações lácticas aumenta a produção de AL, rendimento, e a produtividade de diferentes cepas LAB. A temperatura é outro parâmetro importante em relação ao crescimento das LABs, produção de AL e consumo de substrato, sendo a faixa ótima de temperatura entre 30 e 43°C (ABDEL-RAHMAN et al., 2011). Sabe-se que a falta de controle de temperatura pode afetar a fluidez da membrana, comprometer a integridade celular e, principalmente, os processos celulares básicos, como função ribossômica, dobramento de proteínas e atividade enzimática (PAPADIMITRIOU et al., 2016).

Ao final da fermentação o lactato de cálcio presente no caldo fermentado precipitou (Figura 2.4), em seguida, este caldo foi aquecido a 50°C em banho-maria para remover excesso de CaCO_3 e células bacterianas através de uma etapa de centrifugação. O sobrenadante resultante foi submetido a uma clarificação com o uso de carvão ativado em ambiente com temperatura e agitação controladas. Esta etapa de clarificação com carvão ativado consistiu em remover pigmentos e substâncias orgânicas, devido à capacidade de adsorção pela grande superfície de contato presente no carvão ativado em pó. Após a remoção do carvão ativado, o caldo clarificado foi submetido à precipitação, obtendo-se assim o AL.

Geralmente, a recuperação de AL a partir do caldo fermentado em forma de lactato de cálcio envolve diversas etapas, uso de produtos químicos e geração de resíduos. Mesmo que convencional, o método de precipitação do lactato de cálcio com ácido sulfúrico é o procedimento adotado em escala industrial, por apresentar melhor manipulação em grandes volumes (WASEWAR, 2005). Considerando o rendimento da produção de AL ao longo da cinética, os valores aumentam a partir de 96 horas, quando a melhor produtividade é alcançada, levando à recuperação de 63% em massa de AL. Essa porcentagem de recuperação em massa de AL através do procedimento de precipitação utilizando uma solução de 4 mol/L de H_2SO_4 , é compatível com a média encontrada na literatura, a partir de 50% (VIDRA; NÉMETH;

SALGÓ, 2019; CHOI; CHANG; KIM, 2011). No tempo de 120 horas, observa-se 85% de recuperação, porém, com a acidificação do meio de fermentação e o início das dificuldades analíticas impostas pelo bloco solidificado de lactato de cálcio, este não é mais um ambiente adequado para a produção de AL pela *L. pentosus*. Esses valores relacionados ao processo de precipitação demonstram a necessidade de uma etapa posterior para a purificação de AL, visando a obtenção de uma molécula de alto nível de pureza para posterior polimerização.

A qualidade da molécula de AL e o rendimento do processo de recuperação são geralmente muito importantes levando em consideração a viabilidade econômica. O processo de separação e recuperação é um dos gargalos para a produção de AL, que podem representar até 50% dos custos totais de produção (WASEWAR, 2005).

Acerca da produção de lactato e sua conversão em AL, existem mecanismos bioquímicos e moleculares ainda pouco elucidados. Li et al. (2021) e Xu et al. (2020) descrevem observações importantes para futuros estudos com o objetivo de realizar superproduções de lactato e de AL. A primeira observação faz a conjectura de que a produção de lactato é diretamente influenciada pela concentração salina do meio fermentativo, onde, a produção aumenta em concentração de NaCl em torno de 30 g/L. A produção do lactato é também dependente do gene citocromal regulado pela enzima lactato desidrogenase, sob altas concentrações salinas, o gene tradicional da conversão do lactato em AL é alterado (LI et al., 2021). A segunda observação indica que um nível mais alto de piruvato foi correlacionado com uma concentração mais alta de lactato, sabe-se que o piruvato é o aceptor direto de elétrons responsável pela produção de lactato. Entretanto, o piruvato pode seguir a via alternativa para a produção de ácidos graxos, o que pode explicar um alto nível de piruvato associado à uma produção de lactato relativamente baixa. Por fim, as bactérias LAB podem aumentar os níveis do gene citocromal (XU, et al., 2020). Esses são pontos de interesse de estudo para o aumento de produção de lactato através da regulação gênica.

2.4 CONCLUSÕES

Um método simples de produção de AL foi desenvolvido, utilizando um substrato alternativo, que forneceu concentrações de carbono favoráveis à multiplicação celular da LAB *Lactobacillus pentosus*. Observou-se que as condições ótimas de produção de AL estão relacionadas ao pH 6 e 96 horas de fermentação, onde atingiu-se a produção de 113,74 g/L de AL e produtividade de 1,18 g/L.h. Esta produtividade é compatível com àquelas descritas na literatura, sendo que o substrato caldo de cana não passou por tratamento prévio e, com isso,

apresenta boas características para continuar sendo utilizado em outros ensaios visando o aumento de produção e escalonamento. A recuperação em massa do AL a partir do lactato de cálcio seguiu um método convencional, que é aplicado na indústria, com a taxa de 63% compatível com a literatura.

CAPÍTULO III – PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO COM O USO DE RESINAS DE TROCA IÔNICA

3.1 INTRODUÇÃO

O AL é produzido sob a forma de ácido L(+) ou D(-) láctico, ou ainda como mistura racêmica (50/50). Microrganismos podem produzir as formas L(+) ou D(-) com elevada pureza. A exploração de AL para produção de biopolímeros é uma das aplicações recentes. Há um interesse contínuo em processos mais eficientes para a produção de fermentação de AL, sua recuperação e purificação. As etapas de recuperação e purificação são muito importantes porque têm influência significativa na qualidade do AL e seu preço final (ABDEL-RAHMAN et al., 2011).

Os processos convencionais de recuperação de AL a partir do caldo de fermentação demandam várias etapas, pois dependem diretamente do substrato utilizado. O método mais difundido e aplicado industrialmente consiste em etapas de precipitação, filtração, adição de ácido sulfúrico e purificação usando carvão ativado. Desse modo, esse método de recuperação pode ser custoso e danoso ao meio ambiente devido ao uso de produtos químicos e geração de resíduos (MARTINEZ, et al. 2013).

De acordo com estudos realizados (LUONGO et al. 2019), o uso de resinas de troca iônica está em constante desenvolvimento. As resinas de troca iônica são constituídas por uma base polimérica flexível (bases fenólicas, acrílicas ou de poliestireno divinilbenzeno) e um grupo funcional carregado. Tais grupos funcionais determinam o tipo da resina, sendo os principais o ácido sulfônico, grupos carboxílicos e fosfóricos – resinas de troca ácida fortes e fracas, respectivamente –, amônio quaternário e amino grupo – resinas de troca ácida fortes e fracas – (OTHMAN et al. 2018; LUONGO et al. 2019). Quando as resinas ácidas são utilizadas em um meio em que o pH seja maior do que o seu valor de pKa, estas carregam uma carga negativa e atraem compostos positivos, sendo assim, resinas catiônicas. Seguindo o mesmo raciocínio, resinas básicas são aniônicas. As resinas ácida e básica fortes apresentam pKas aproximados de 1 e 14, respectivamente, enquanto as fracas apresentam 4 e 10. Dessa maneira, as resinas fortes são aplicadas na maioria dos casos, uma vez que se apresentam na forma ionizada na maior parte do tempo (INGLEZAKIS e POULOPOULOS, 2006). Alguns contaminantes biológicos podem se ligar de maneira irreversível a tais resinas, sendo necessário uma regeneração destas com soluções de pH extremo. As principais vantagens desse tipo de resina são a sua versatilidade e capacidade de adsorção que elas apresentam, além do menor

custo quando comparado com outros tipos de resina. Entretanto, elas apresentam sensibilidade a temperaturas extremas (HARRISON et al, 2003).

Em um processo alternativo, visando à redução de resíduos gerados e um grau de pureza elevado de AL, é proposto neste Capítulo o uso de resinas de troca iônica para a sua purificação, onde foram comparadas as performances de resinas fabricadas pela Amberlite e Purolite. Foram também comparados os sistemas de purificação sob agitação, realizados em banho-maria com agitação orbital e tanque com agitação mecânica, bem como o sistema de colunas empacotadas. O objetivo deste estudo foi desenvolver o processo de purificação do AL a partir do caldo fermentado e recuperado, para apresentar uma opção exequível a ser transferido para escala industrial.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o procedimento experimental foi realizado nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da UFPR em Curitiba/PR, Brasil.

3.2.1 Material

O caldo de cana utilizado como substrato na produção de AL foi obtido do comércio local no município de Curitiba-Paraná, extraído mecanicamente direto da cana-de-açúcar, em seguida foi filtrado para a remoção de sólidos suspensos.

Foram utilizadas resinas de troca iônica de duas marcas, Amberlite e Purolite. As resinas Amberlite IR-120 e IRA-67 foram adquiridas do grupo Merck. As resinas Purolite C150SH e A847S foram fornecidas pela empresa.

3.2.2 Produção de ácido láctico

A cepa de *Lactobacillus pentosus* foi reativada em caldo MRS a 35°C durante 24 horas. Após o crescimento, a cultura foi transferida para o meio de propagação de inóculo composto por caldo de cana em concentração de 20 g/L de açúcares redutores totais e 25 g/L de extrato de levedura e 10% (v/v) de taxa de inoculação. O inóculo foi mantido em condições de 30 °C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas.

Para a produção de AL, utilizou-se o meio fermentativo composto por caldo de cana em concentração de 230 g/L de açúcares redutores, 15 g/L de extrato de levedura e 90 g/L de

CaCO₃ e taxa de inoculação de 10% (v/v). A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 30 °C, sob agitação de 120 rpm durante 96 horas.

A recuperação de AL foi realizada conforme o Fluxograma 1, o procedimento é descrito no Capítulo II.

3.2.3 Purificação do ácido láctico utilizando resinas de troca iônica

As resinas utilizadas neste estudo apresentam características (Tabela 3.1) que atendem às mais variadas necessidades de processo, de acordo com a molécula de interesse.

Tabela 3.1 – Características das resinas Amberlite e Purolite

Propriedades	Amberlite IR 120	Amberlite IRA 67	Purolite C10SH	Purolite A847S
Descrição	Catiônica forte	Aniônica fraca	Catiônica Fortemente Ácida	Aniônica fracamente básica
T máx	121 °C	≤ 60 °C	120 °C	40 °C
Matriz	Estireno divinilbenzeno (gel)	Acrílica (gel)	Poliestireno com divinilbenzeno	Poliacrílico gel com divinilbenzeno
Grupo ativo	Ácido sulfônico	Poliamina	Ácido sulfônico	Amina Terciária
Partícula	620-830 µm	500-750 µm	425-1200 µm	425-1200 µm
Umidade	53-58%	~60%	54 - 59%	56-62%

Três sistemas de purificação do AL com o uso de resinas de troca iônica foram testados. As resinas passaram inicialmente por procedimento de ativação quando necessário. Os procedimentos estão ilustrados na Figura 3.1 e são descritos a seguir.

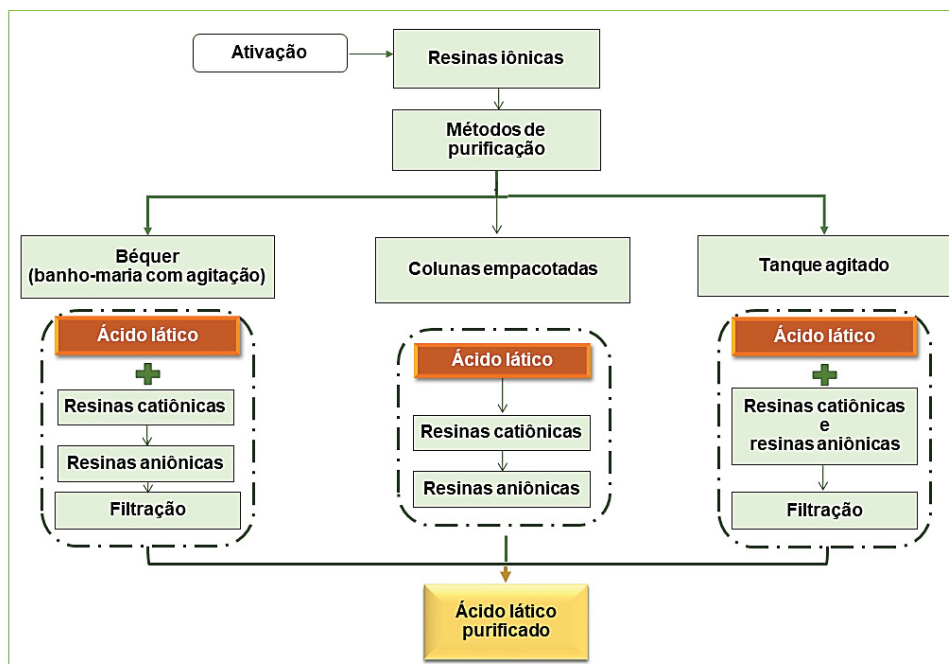


Figura 3.1 – Fluxograma para a etapa de purificação do AL

3.2.3.1 Ativação das resinas

O procedimento de ativação das resinas é diferente a depender do fabricante:

Resinas Amberlite: necessitam da ativação na forma desejada, ou seja, para a obtenção das resinas aniônicas na forma Cl^- : a sequência de lavagens com HCl 1N – água deionizada – NaOH 1N – água deionizada é realizada até alcançar o pH 7. Para a obtenção das resinas catiônicas na forma H^+ : é realizada a sequência de lavagens com HCl 1N – água deionizada até alcançar o pH 7.

Resinas Purolite: são disponibilizadas em suas formas ativas, necessitando apenas lavagens sucessivas com água deionizada até a solução ficar límpida, com posterior remoção do excesso de água através de filtração.

3.2.3.2 Purificação do ácido láctico com o uso de resinas catiônicas e aniônicas em banho-maria com agitação orbital

Para o tratamento das amostras, seguiu-se o protocolo fornecido pela empresa Purolite. Foi considerado que a massa de resina corresponde a 20% da massa da solução contendo AL, na proporção 1,8:2,2 de resina catiônica e resina aniônica, respectivamente. A amostra contendo AL (100 g) foi acondicionada em béquer, o qual, foi mantido em um banho-maria com agitação orbital (Ethiktecnologia 501-D), durante 120 minutos a 30°C e 100 rpm. Decorrido o tempo, a

resina foi separada através de filtração convencional e analisada a concentração de AL. Considerando os ensaios em banho-maria com agitação orbital, a eficiência do processo de adsorção foi calculada (Eq. 3.1) para as quatro resinas utilizadas.

$$E = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Considera-se:

E: eficiência do processo de adsorção;

C_0 : concentração inicial de adsorbato;

C_e : concentração final de adsorbato.

3.2.3.3 *Purificação do ácido láctico em colunas de forma sequencial de resinas catiônicas e aniônicas*

As colunas foram montadas conforme ilustra a Figura 3.2, a qual contém uma placa retentora de resina com porosidade de 100 a 160 microns. Cada coluna foi empacotada utilizando-se a massa de resina (100 g) sugerida pela fabricante Purolite, utilizando-se água deionizada. A transferência da mistura ocorreu vagarosamente, evitando-se a formação de bolhas no leito. A primeira coluna foi preparada com a resina catiônica, e a segunda coluna com a resina aniônica. O procedimento foi realizado em triplicata e em temperatura ambiente.

Para a percolação da amostra de AL convertido pelo procedimento de precipitação com o uso de ácido sulfúrico (150 mL), foi utilizada uma vazão de 0,2 BV/h (Eq. 3.2) para cada coluna. Alíquotas foram retiradas antes da percolação e ao final do procedimento, para a conferência do pH e concentração de AL. Após cada percolação de amostra, foi percolada água destilada para a lavagem das resinas.

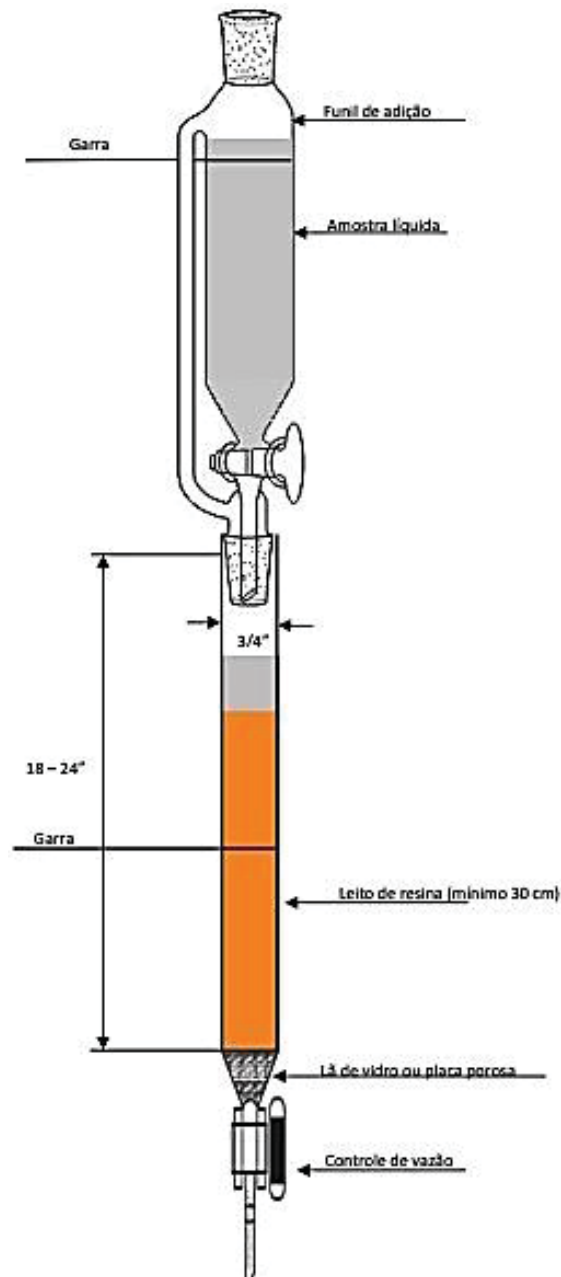


Figura 3.2 – Ilustração do sistema de colunas em vidro
Fonte: Purolite

$$\frac{xBV}{h} = \frac{Vr \times xBV}{h} \times \frac{1h}{60\text{min}} \quad \text{Cálculo de vazão de percolação (Eq. 3.2)}$$

Considera-se:

x – número de BV desejado;

h – hora (minutos);

Vr – volume de resina (mL)

A Figura 3.3. ilustra o sistema de colunas montado.



Figura 3.3 – Sistema de resinas empacotadas em colunas de vidro

3.2.3.4 Purificação do ácido láctico em tanque agitado com o uso simultâneo de resinas catiônicas e aniônicas

Os ensaios de purificação do AL foram realizados em tanque agitado (Tecnal TE-054MAG, com agitador mecânico Tecnal TE-139) e o uso simultâneo das duas resinas catiônica e aniônica. As amostras foram mantidas em contato com as resinas durante 120 minutos, temperatura a 30°C e agitação de 100 rpm. Decorrido o tempo, procedeu-se a filtração convencional para separação das resinas e análise da concentração do AL. A Figura 3.4 – ilustra o sistema de tanque de agitação mecânica com ambiente controlado.



Figura 3.4 – Equipamento de tanque com agitação mecânica

3.2.4 Métodos Analíticos

A medição do pH foi realizada diretamente nas amostras com o uso do potenciômetro MS Tecnopon mPA 210. A solução de AL obtida após a etapa de precipitação foi eluída em uma coluna (10 mL) de extração em fase sólida empacotada com 5 g de resina C18, como uma etapa de *clean-up* antes da análise em cromatografia. O procedimento consistiu na ativação da coluna com metanol (8 mL), lavagem com água MilliQ (8 mL), eluição de amostra (6 mL), finalizando com a lavagem com água MilliQ (20 mL). As amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna Hi-Plex (300 x 7,7 mm) a 60°C, regime isocrático de fase móvel H₂SO₄ 0,005 M, vazão de 0,6 mL/min.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à sua operação simples, de baixo consumo de energia e alta seletividade, as resinas de troca iônica motivam os estudos de sua utilização em técnicas de purificação. Inicialmente, com o objetivo de prosseguir em um tempo mais curto daquele que ocorre no processo de recuperação convencional, pensou-se na possibilidade de contato das resinas diretamente com a forma de lactato de cálcio. Caso os resultados fossem promissores, seria possível a substituição da etapa de recuperação do AL (através da precipitação) pelo uso de resinas.

3.3.1. Purificação do ácido lático com o uso de resinas catiônicas e aniônicas em banho-maria com agitação orbital

Inicialmente, as resinas foram testadas separadamente: primeiro, a amostra fermentada contendo lactato de cálcio foi misturada à resina catiônica. Decorridos 120 minutos, procedeu-se a filtração convencional para, na sequência, seguir com a mistura da amostra com a resina aniônica, a qual permaneceu em contato por mais 120 minutos. A amostra inicial na forma de lactato de cálcio, continha uma concentração dosada em AL de 85,04 g/L, com pH 5,68. Os resultados gerados encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Resultados do ensaio realizado em banho-maria com agitação orbital

Resina	Amostra i e f	pH i e f	H ₂ O lavagem	pH f H ₂ O lavagem	AL (g/L)	H ₂ O lavagem (AL residual g/L)	Recuperação
Purolite							
C10SH	100 g (87 mL)	5,68	87 mL	4,19	71,96	4,36	40%
	96 g (84 mL)	– 3,82					
A847S	96 g (84 mL)	3,82	87 mL	7,53	46,35	2,96	26%
	86 g (75 mL)	– 4,34					
Amberlite							
IR 120	100 g (87 mL)	5,68	87 mL	6,49	55,04	11,40	31%
	94 g (82 mL)	– 5,87					
IRA 67	94 g (82 mL)	5,87	87 mL	8,78	48,35	11,40	27%
	87 g (76 mL)	– 8,00					

Legenda: **C10SH** – resina catiônica Purolite; **A847S** – resina aniônica Purolite; **IR 120** – resina catiônica Amberlite; **IRA 67** – resina aniônica Amberlite; **i** – inicial; **f** – final.

Este primeiro ensaio teve como objetivo avaliar o comportamento das resinas em contato com a amostra contendo alta concentração de lactato de cálcio, a qual foi mantida em contato com as resinas buscando a otimização no processo de purificação da molécula, reduzindo o tempo de processamento da amostra e o uso de ácido sulfúrico. Porém, a baixa recuperação de massa de AL observada, valores médios de apenas 33% usando as resinas Purolite e de 29% para as resinas Amberlite, inviabiliza a aplicação em larga escala. Diante do observado, os próximos experimentos seguiram o protocolo fornecido pela empresa Purolite, que descreve um processo iniciando-se com a resina catiônica para a recuperação de AL. Tal sequência pode ser justificada quando observado o comportamento iônico da produção de AL, onde, inicialmente há o predomínio da forma de lactato de cálcio, com isso, a necessidade de se iniciar a purificação com uma resina catiônica. Assumindo-se teoricamente que, 1 mol de glicose pode

ser convertido em 2 mols de AL, teremos predominantemente lactato de cálcio (Eq. 2.1), onde, primeiro, há a necessidade de remover o cátion (cálcio) para a formação de AL (recuperado).

Os cálculos de eficiência do processo de purificação utilizando resinas (Tabela 3.2) foram realizados considerando que a amostra primeiramente esteve em contato com a resina catiônica, desse modo, recebeu um tratamento prévio, conforme descrito anteriormente. As eficiências são próximas entre as duas fabricantes (Amberlite e Purolite), porém, ainda baixas com valores entre 12,15% e 35,59%. Este fato pode ser influenciado pela pouca homogeneização da amostra acondicionada em béquer, e com isso, resultando em menor transferência de massa e de calor. Prosseguiu-se, então, para o experimento em colunas utilizando a amostra de AL obtida do procedimento de precipitação com ácido sulfúrico.

Tabela 3.2 – Eficiência das resinas em contato com lactato de cálcio

Resina	Eficiência
Amberlite IR 120	35,28%
Amberlite IRA 67	12,15%
Purolite C10SH	15,38%
Purolite A847S	35,59%

3.3.2 Purificação do ácido lático em colunas de forma sequencial de resinas catiônicas e aniônicas

A amostra tratada inicialmente continha 144,91 g/L de AL convertido com o uso de ácido sulfúrico, com pH 1. Os resultados dos procedimentos de purificação com resinas catiônicas e aniônicas empacotadas em colunas estão reunidos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Dados obtidos para as amostras purificadas em colunas de resinas de troca iônica

Resina	Amostra i e f	pH i e f	H ₂ O lavagem	pH H ₂ O lavagem	Tempo médio	AL (g/L) final	H ₂ O lavagem (AL residual g/L)
Purolite							
C10SH (100 mL)	150 mL 120 mL	1 – 1	150 mL	2	2h40min	53,92 ± 5,10	15,78 ± 1,12
A847S (100 mL)	120 mL 90 mL	1 – 6	120 mL	2	1h30min	36,35 ± 2,85	18,42 ± 2,44
Amberlite							
IR 120 (100 mL)	150 mL 150 mL	1 – 1	120 mL	2	1h50min	34,98 ± 3,40	20,83 ± 3,10
IRA 67 (100 mL)	120 mL 90 mL	1 – 8	120 mL	2	1h20min	62,24 ± 5,40	14,97 ± 1,88

Legenda: **C10SH** – resina catiônica Purolite; **A847S** – resina aniônica Purolite; **IR 120** – resina catiônica Amberlite; **IRA 67** – resina aniônica Amberlite; **i** – inicial; **f** – final.

Utilizou-se o protocolo fornecido pela empresa Purolite, que trata de uma sequência elaborada para a amostra contendo AL convertido através do uso de soluções ácidas. As resinas Amberlite apresentaram resultados superiores às resinas Purolite, para a amostra final de AL purificado, 62,24 g/L e 36,35 g/L, respectivamente. Possivelmente, esse fato é devido às resinas Amberlite serem fornecidas na forma inativa. Desse modo, existe a garantia de que as resinas estão puras sem contaminações, e há um maior controle de sua ativação através das lavagens sequenciais e acompanhamento do pH. As resinas Purolite são fornecidas em sua forma ativa, sendo parte do protocolo uma pré-etapa de lavagem para retirar resquícios químicos e sujidades. É um ponto positivo levando-se em conta a facilidade e redução do tempo de preparo dos experimentos, porém, o controle da qualidade é reduzido.

Tabela 3.4 – Taxas de recuperação em massa de AL, eficiência e capacidade de adsorção das resinas, obtidas em ensaio em colunas

Resina	Recuperação	Eficiência	Capacidade adsorção (mg/mL)
Amberlite IR 120	19%	75,86%	165
Amberlite IRA 67	35%	57,50%	32,7
Purolite C10SH	30%	62,79%	136
Purolite A847S	20%	74,91%	21

Em relação à eficiência (Tabela 3.4), considerando que a amostra esteve em contato subsequente com resinas catiônica e resinas aniônicas, em média, as taxas obtidas ficaram bem próximas entre as fabricantes Amberlite (66,68%) e Purolite (68,85%). A recuperação em massa de AL também ficou próxima entre as fabricantes Purolite (25%) e Amberlite (27%), porém são taxas muito baixas. O uso adequado das resinas requer estudos de diferentes parâmetros e diversas possibilidades de adaptação. Sabe-se que as resinas de troca iônica apresentam alta seletividade, podendo atingir alto rendimento de AL e geram uma quantidade mínima de desperdício. As resinas catiônicas apresentaram boa capacidade de adsorção, para ambas as fabricantes, Amberlite (165 mg/mL) e Purolite (136 mg/mL), respectivamente. O cálculo foi realizado a partir da Eq. 3.3. Para as resinas aniônicas, os resultados mostraram-se baixos devido ao tratamento prévio em resinas catiônicas.

$$q = \frac{C_0 - C_e \cdot V}{W} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Considera-se:

q: capacidade de adsorção da resina;

C₀: concentração inicial de adsorbato;

C_e: concentração final de adsorbato;

V: volume da solução;

W: massa de resina.

Vários tipos de trocadores de íons têm sido utilizados para a recuperação do AL, e as investigações sobre as técnicas de separação em duas etapas compreendendo de uso de resinas aniônicas e catiônicas são constantes na literatura (LUONGO et al. 2019; MANANDHAR; SHAH, 2020).

Bishai et al. (2015) observaram que o pH influencia diretamente a troca iônica. A partir do pH 2-3 não ocorreu ligação do AL com resinas aniônicas. Nenhuma ligação com as resinas foi observada quando o AL atinge o seu pKa (3,85). Os autores também observaram que a diminuição de pureza pode ser atribuída à liberação de outros grupos aniônicos contaminantes no meio, que podem ser competitivos pela troca iônica.

Boonmee et al. (2016) realizaram a técnica de fermentação extrativa usando a resina aniônica IRA-67 para remover o lactato produzido durante a fermentação. Os resultados das fermentações extrativas indicaram que a adição de resina ajudou a melhorar a produtividade do procedimento. A recuperação geral de lactato, sem tratamento com resina, foi de 70%, enquanto a recuperação com o uso de resina *in situ* resultou em 61%. O uso das resinas *in situ* demanda lavagens constantes para a remoção de células e compostos residuais. Tais etapas que envolvem a lavagem da resina requerem grandes quantidades de água e geram um fluxo de resíduos líquidos.

Ataei e Vasheghani-Farahani (2008) também optaram por utilizar a resina aniônica para a remoção seletiva dos íons lactato. Na fermentação extrativa, após a adição de resinas à solução fermentativa contendo lactato, foi produzido 46 g/L de AL (inicialmente 6 g/L) em fermentação convencional. Ao final de todos os experimentos, os autores concluíram que o rendimento da produção de AL aumentou em 60% na fermentação extrativa, em comparação com a fermentação convencional, reduzindo o tempo de processo global.

John, Nampoothiri e Pandey (2008) indicaram que a resina Amberlite IRA 67 tem mais capacidade de adsorção (aproximadamente 126 mg/g de resina úmida com mais de 95% de adsorção de AL). Em teste de eluição, compararam água e metanol. Concluindo que o íon lactato pode ser adsorvido na resina IRA-67 por troca iônica, e a concentração de AL no eluato diminui com a solução de metanol. Isso mostra que o metanol também pode promover a adsorção de AL na resina. Porém, a eluição do AL é afetada pela constante dielétrica do solvente. Do ponto de vista industrial, a água pode ser selecionada como um solvente para lavagem ou a etapa de lavagem pode ser evitada para reduzir o custo. Esta observação corrobora com o presente estudo, onde, apenas água foi utilizada para a lavagem da coluna, a fim de evitar solventes que possam interferir no procedimento, e também a fim de evitar geração de efluentes danosos ao meio ambiente.

Msuya et al. (2018) montaram um sistema de resina de troca iônica semelhante ao sistema proposto neste trabalho (item 3.2.3.1), consistindo em uma coluna de resina de troca catiônica conectada à coluna de resina de troca aniônica. Os autores utilizaram a resina aniônica fraca Indion FFIP (Ion Exchange India Ltd) e a resina catiônica fortemente ácida Indion 225H (Ion Exchange India Ltd), também utilizando água para as lavagens. Como resultados, obtiveram uma concentração mais alta de AL de 108 g/L a uma temperatura do sistema de 47°C, representando uma concentração de 4,5 vezes a concentração inicial (24 g/L) antes do processo. Como o interesse do estudo era obter uma fração mais rica de AL, observaram ser vantajoso concentrar o AL previamente.

Arcanjo et al. (2015) utilizaram uma solução inicial de AL (120 g/L) para recuperação em resina Amberlite IRA-67 e IRA-96, onde, a recuperação total de AL foi de 25,8% (31 g/L). Também testaram uma solução binária contendo AL (345 g/L) e glicerol (230 g/L). A recuperação do AL dessa solução foi inferior ao valor obtido para a solução pura de AL. Ainda, os autores concluíram que as moléculas de AL e glicerol são semelhantes, o que pode causar interferência na seletividade das resinas de troca iônica. Em trabalho de Luongo et al. (2019), a resina IRA-67 exibiu eficiência de remoção de AL superior a 99% para uma concentração inicial de lactato variando de 1,4 a 13,5 g/L.

Zaini et al. (2019) também iniciaram a purificação de AL com a resina catiônica extremamente ácida (IRA 120) para converter o sal de lactato em AL. Por apresentar grupos funcionais de ácido sulfônico, teoricamente os íons de hidrogênio (H^+) que estão ligados ao grupo funcional da resina irão se ligar ao lactato de sódio obtido ao final da fermentação, e convertê-lo em AL. Posteriormente, a forma não dissociada do AL obtida pela IRA 120 foi submetida ao contato com a resina IRA-67 (Cl^-) para a remoção de ânions. O pH do efluente estava em torno de 5,5—6,0, indicando que os ácidos orgânicos presentes no caldo de fermentação (AL e ácido acético) foram adsorvidos pela resina. Após lavagem da coluna com água, o AL foi dessorvido com HCl 0,5M. O primeiro ácido a ser eluído foi o ácido acético, seguido pelo AL, dessa forma, observou-se a competição entre ácidos orgânicos pela ligação aos grupos funcionais das resinas.

De acordo com o levantamento de dados da literatura, as resinas de base fracas são mais eficientes do que as resinas de base fortes para adsorção de AL. Isso se deve principalmente ao fato de as resinas de base fracas terem maior resistência à oxidação e incrustações orgânicas. Ainda, a seletividade da resina para a maioria dos ácidos orgânicos é maior devido ao alto número de anéis aromáticos nas resinas estirênicas, tornando-a hidrofóbica. As resinas de troca aniônica geralmente têm diferentes níveis de afinidade em

relação aos nutrientes e compostos disponíveis no meio, o que poderia ser a principal razão para os efeitos inibitórios em relação à cada tipo diferente de resina de troca aniônica. A presença desse tipo de adsorção competitiva pode, portanto, reduzir a capacidade de adsorção da resina bloqueando os locais disponíveis para adsorção de AL (OTHMAN et al., 2018).

A Figura 3.5 ilustra a diferença de coloração entre as amostras antes da passagem pela coluna iônica, e amostras após a passagem pela coluna iônica.



Figura 3.5 – Amostras para os ensaios em colunas
Legenda: à esquerda: amostras antes do processo de purificação com resinas; à direita: amostras translúcidas após o processo de purificação com as resinas

3.3.3. Purificação do ácido lático com o uso simultâneo de resinas catiônicas e aniônicas em tanque agitado

Desta vez, as duas resinas (catiônica e aniônica) foram mantidas em contato com a amostra de AL obtida após a conversão com ácido sulfúrico sob agitação em tanque agitado, os dados estão listados na Tabela 3.5. Decorridos 120 minutos, procedeu-se a filtração convencional. A amostra inicial (450 mL) continha 144,91 g/L de AL convertido com o uso de ácido sulfúrico, com pH 1.

Tabela 3.5 – Purificação de AL com uso de resinas catiônicas e aniônicas em tanque agitado

Resina	AL (g/L) _i	AL (g/L) _f	pH _{i e f}	AL (g/L) _{H₂O l}	pH _f _{H₂O l}	Recuperação
Purolite						
C10SH e A847S	144,91	42,38	1 – 4	32,15	4	23%
Amberlite						
IR 120 e IRA 67	144,91	189,11	1 – 3	24,05	4	95%

Legenda: **C10SH** – resina catiônica Purolite; **A847S** – resina aniônica Purolite; **IR 120** – resina catiônica Amberlite; **IRA 67** – resina aniônica Amberlite, **i** – k inicial; **f** – final; **l** – lavagem.

O ensaio em tanque agitado apresentou um ótimo resultado (189,11 g/L) utilizando as resinas Amberlite IR 120 e IRA 67, simultaneamente, em ambiente controlado, enquanto as resinas Purolite apresentaram um menor desempenho (42,38 g/L). Usualmente as resinas de troca iônica apresentam altas taxas de purificação do AL, devido aos grupos ativos de modo seletivo. Resinas catiônicas e aniônicas empacotadas em colunas alcançam entre 91 e 98% de purificação (AHMAD et al. 2021). Em condições otimizadas de experimentos em batelada, resinas aniônicas apresentam entre 85 e 90% de purificação (VECINO et al. 2021; PLEISSNER et al. 2016). O uso simultâneo de resinas catiônicas e aniônicas não é relatado. A purificação de amostras por meio de resinas iônicas em tanque agitado apresenta boas perspectivas. O sistema possui temperatura, agitação e tempo controlados, sem demais preocupações com oscilação de fluxo de vazão, por exemplo, bem como o preparo de empacotamento de colunas de vidro com cada resina. Ainda, com a agitação por um impelidor do tipo hélice, a amostra não fica compactada como observado utilizando béquer em banho-maria com agitação orbital. O líquido direciona-se para a base do tanque, com o modo de circulação axial, melhor homogeneização e melhor transferência de massa, o que demonstra adequação aos processos mais sensíveis ao mesmo tempo que fornece uma boa distribuição de calor. Dessa forma percebe-se que o fluxo de resíduos de lavagem é reduzido, a separação entre as resinas pode ser realizada por diferença de densidade (Figura 3.6) para posterior regeneração, além do uso de menor volume de solução.



Figura 3.6 – Diferença aparente de densidade entre as resinas
Legenda: Resinas catiônicas (fundo) e resinas aniônicas (superfície)
separadas por diferença de densidade, quando do uso simultâneo das resinas.

Seguindo o protocolo fornecido pela Purolite, trata-se de um procedimento muito mais simples, visa à remoção do ácido sulfúrico residual, e também do cátion residual para a purificação do AL, o aumento de escala, e o uso em conjunto de ambas resinas (catiônicas e aniônicas).

3.4 CONCLUSÕES

Concluindo, este trabalho apresentou três técnicas de purificação de AL viáveis utilizando resinas de troca iônica. A técnica em escala em tanque agitado apresentou sucesso com o uso simultâneo de resinas Amberlite catiônica e aniônica, com concentração final de AL de 189,11 g/L e recuperação em massa de AL de 95%. Portanto, é uma técnica promissora, de fácil manipulação e com redução de efluentes, contudo, estudos complementares são necessários para melhorar as condições específicas de uso nesta escala. Características desse AL purificado devem ser analisadas, para uma posterior polimerização em PLA.

CAPÍTULO IV – ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA) E SEUS POLÍMEROS DE BASE BIOLÓGICA – CRIAÇÃO DE BANCO DE DADOS DE PATENTES DESENVOLVIDAS NOS ÚLTIMOS 20 ANOS PARA APLICAÇÕES ESSENCIAIS

4.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o mundo tem um grande apelo por bioprodutos e também por bioprocessos circulares, principalmente para substituir a extração de petróleo e seus derivados. O biopolímero polilactídeo (PLA) pode atuar como o principal agente nesse contexto, onde o PLA é sintetizado a partir do ácido láctico (AL), que por sua vez, é obtido industrialmente a partir de recursos renováveis via processos biotecnológicos de fermentação. Diante da importância do PLA como biomaterial nas áreas cosmética, farmacêutica e médica, o PLA tem sido objeto de pesquisas e inovações relacionadas às suas aplicações. Considerando os aspectos-chave como biomaterial para as necessidades humanas, meio ambiente, economia e inovações, surge a parceria Academia-Empresa. O desenvolvimento científico e tecnológico de novos processos e produtos leva a inovações que devem ser protegidas por depósitos de patentes. O foco deste capítulo é sequenciar o conhecimento compartilhado em patentes, durante o período dos últimos 20 anos, onde foi criada uma base de dados de patentes envolvendo o maior interesse, tanto da Academia quanto da Empresa, para produção e aplicações de PLA.

4.2 BANCO DE DADOS DE PATENTES DE APLICAÇÃO DE PLA COMO BIOMATERIAL

Um banco de patentes de PLA foi construído com base em sua aplicação como biomaterial na área de necessidade humana utilizando o site *Lens.org* como referência para pesquisa. A pesquisa foi baseada em descrições de inovações envolvendo a parceria Academia-Empresa, na qual a maioria dos produtos foi registrada nos últimos 20 anos.

Para enfatizar a tecnologia e os produtos obtidos a partir desta parceria, a pesquisa foi feita em duas etapas: **(1) Pesquisa booleana das palavras-chave na base de dados utilizando a sintaxe da sequência:** (Título: (poly-lactic acid)) OU (Resumo: (poly-lactic acid)) OU (Reivindicações: (poly-lactic acid)) OU (Título: (poly (lactic acid)) OU (Resumo: (poly (lactic acid)) OU (Reivindicações: (poly (lactic acid))) OU (Título: (2-hidroxypropanoic acid) OU

(Resumo: (2-hidroxypropanoic acid) OU (Reivindicações: (2-hidroxypropanoic acid) OU as Classificações Cooperativas de Patentes (CPC) código **A61L17**)))))))).

Além disso, foi utilizado o filtro “Grupo por Famílias Simples” com essa sintaxe, onde, o objetivo foi cobrir todas as lacunas referentes ao PLA por meio da classificação **A61L17**, que se refere a: **A** “Necessidades Humanas”; **A61** “Higiene em Ciências Médicas ou Veterinárias”; **A61L** “Métodos ou aparelhos para esterilização de materiais ou objetos em geral desinfecção, esterilização ou desodorização do ar aspectos químicos de bandagens, curativos, compressas absorventes ou artigos cirúrgicos materiais para bandagens, curativos, compressas absorventes ou artigos cirúrgicos preservação de corpos ou desinfecção caracterizado pelo agente empregado; preservando, por exemplo esterilização, alimentos ou gêneros alimentícios; preparações para uso médico, odontológico ou higiênico”; e **A61L17** “Materiais para sutura cirúrgica ou para ligadura de vasos sanguíneos adesivos cirúrgicos; instrumentos cirúrgicos, dispositivos ou métodos para sutura ou ligadura; suportes ou embalagens para materiais de sutura; materiais para próteses ou cateteres cimentos ósseos ou adesivos cirúrgicos para tecidos moles do corpo; forma ou estrutura das próteses; forma ou estrutura dos cateteres” (LENS.ORG, 2020).

Por meio dessa estratégia de busca, realizada em 12/04/2020, foi encontrado um universo de cerca de 10.928 famílias de patentes; **(2)** foi realizada uma **triagem** por meio de banco de dados científicos removendo todos os documentos que não descrevem essa abordagem da literatura comercial, tabulados para identificar repetições, e, reduzindo o conjunto para 4.643 famílias de patentes. Então, os dados para esses documentos de patentes foram analisados conforme os critérios-alvo de patentes depositadas pela parceria entre empresas e universidades/institutos de pesquisa, e aplicações na área farmacêutica, biomédica e de cosméticos.

Considerando o início do PLA como produto na década de 1930, é possível observar como o interesse pela proteção do produto PLA começou a aumentar (Figura 4.1). Relatos iniciais foram observados na década de 1940, referentes a misturas primárias de componentes – incluindo AL, em que polimerizam sob condições específicas, visando aplicações como resinas ou como material fibroso de composição de revestimento (GB 547525 A; GB 590490 A; GB 599837 A; GB 600706 A). Ao longo dos anos, muitos conceitos e estruturas foram descobertos. Desde os anos 2000, observou-se um aumento significativo de documentos depositados com pico de pedidos de patentes nos últimos 10 anos (2010-2020).

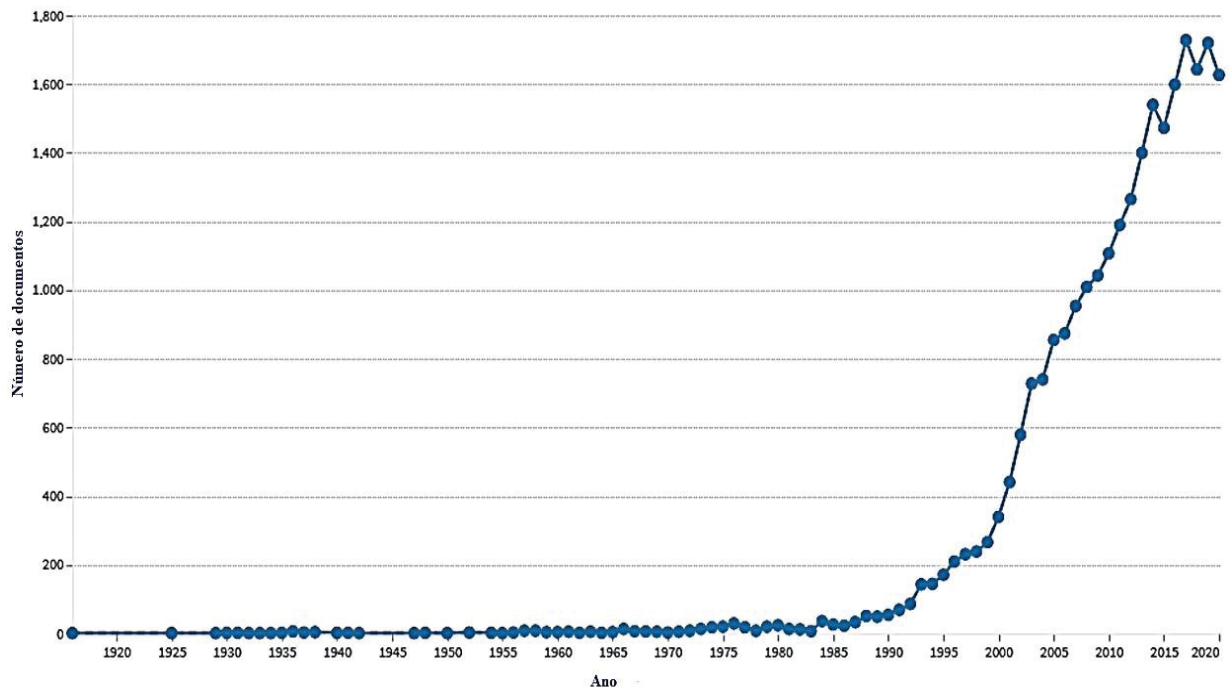


Figura 4.1 – Publicações por ano
Fonte: Lens.org (2020).

Como primeiro resultado desta pesquisa baseada no site Lens.org, é possível observar os 10 principais candidatos nos últimos 20 anos listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Os 10 maiores aplicantes de patentes durante os últimos 20 anos

Nome do aplicante	Número de documentos	Tipo	País
Ethicon Inc	283	Empresa	EUA
Instituto de Tecnologia de Massachusetts	269	Universidade	EUA
Du Pont	203	Empresa	EUA
Alkermes Inc	191	Empresa	IE
Indústrias Toray	184	Empresa	JP
Halliburton Energy Serv Inc	183	Empresa	EUA
Procter & Gamble	182	Empresa	EUA
Universidade da California	163	Universidade	EUA
Teijin Ltd	162	Empresa	JP
Universidade Johns Hopkins	156	Universidade	EUA

Atualmente, a parceria entre a Indústria e a Universidade está aumentando discretamente, como se pode verificar na Figura 4.2, de acordo com o perfil dos candidatos, ainda existe uma distância considerável envolvendo-os. É razoável dizer que essa união é mais do que importante, é essencial para manter em andamento a demanda mundial. O principal país que envia documentos é o Reino Unido, seguido pelo Japão. A principal demanda por região é a América do Norte, com destaque para os EUA, alcançando mais de 2.500 documentos aplicados. Através desta análise, os principais documentos descrevem aplicações específicas nas áreas médica, farmacêutica e cosmética.

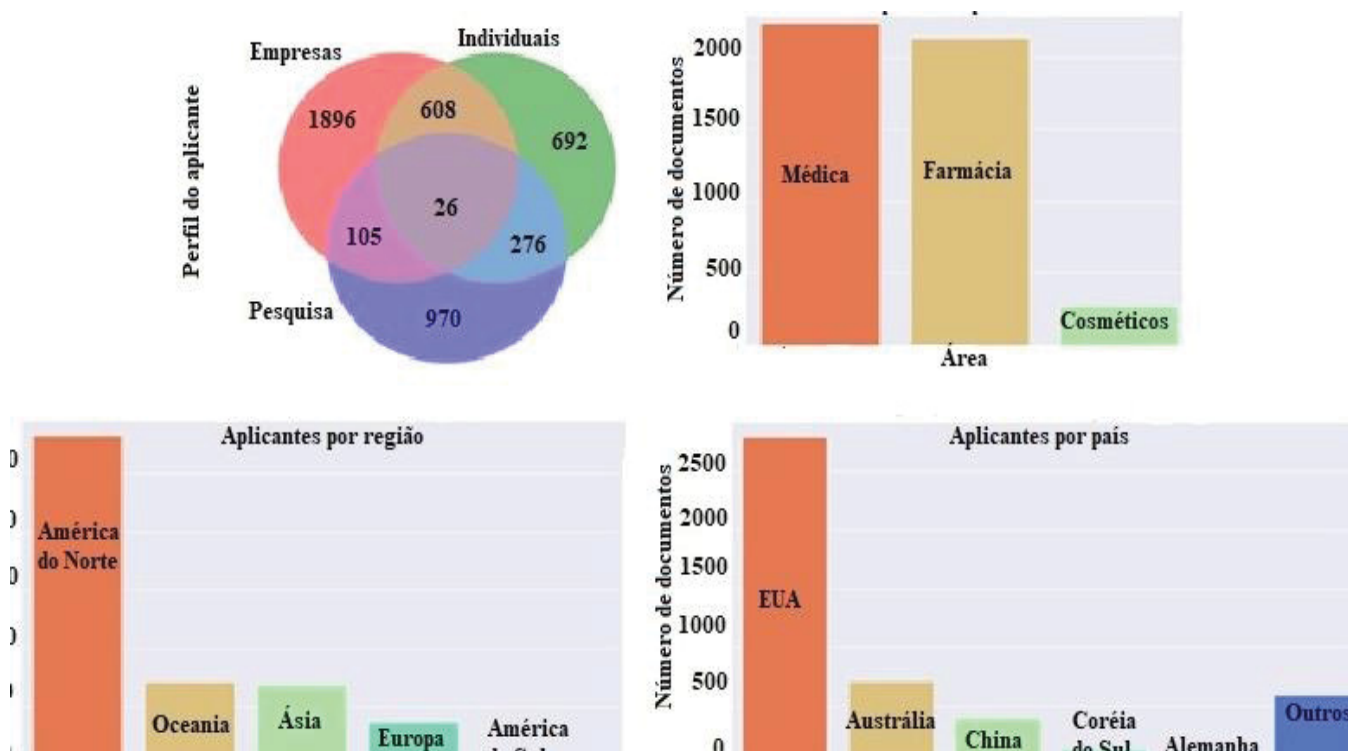


Figura 4.2 – Panorama sobre os documentos dos aplicantes, relativos ao perfil, área de aplicação, região e país

4.2.1 Cosméticos

Atualmente, os lactídeos ou polímeros de AL não são usados como um único componente, como descrito pelas patentes anteriores. Eles são usados principalmente em combinações com componentes orgânicos, bem como uma mistura de material sintético com o componente orgânico derivado do AL. Na área cosmética, essa afirmação é verdadeira, pois a maioria das patentes apresenta a descrição de uma solução misturada com PLA e solventes químicos. Nos últimos 20 anos, neste domínio, a parceria Academia-Empresa ainda não é expressiva.

A base europeia concedeu a patente EP 2766298 B1 “Processo de Tratamento Capilar Proporcionando Cores Dispersas por Difração de Luz”, onde desenvolveu um fluido com polímeros dispersos para tratamento capilar, criando um nanopadrão. O nanopadrão funciona difundindo a luz policromática incidente em luz colorida dispersa. Nesta inovação, o PLA foi misturado com uma solução de polímeros sintéticos, atuando como um filme protetor aos fios de cabelo sob uma temperatura de transição vítrea específica (55–90°C). Também como filme protetor, o PLA foi misturado com quitosana e ácido algínico formando um adesivo permanente biocompatível à pele sob espessura específica (10–1000 nm), conforme descrito na patente concedida BR 112014024011 B1.

Algumas patentes de cosméticos explicam que o PLA é geralmente misturado com outros polímeros sintéticos para garantir, no mínimo, 50% da biodegradabilidade do produto, também devido à formação de tipos reticulados, não reticulados e extrudados. Através desta estratégia, é possível controlar a densidade e a espessura molecular final. Essas descrições são encontradas nas seguintes invenções cosméticas: espuma polimérica – WO 2013/148841 A2; composição de limpeza – EP 2821469 B1; almofada de limpeza – US 2015/0040940 A1.

4.2.2 Farmacêutica

Na área farmacêutica, as inovações são bastante semelhantes às das áreas biomédica e médica. Os produtos PLA para aplicações farmacêuticas são focados principalmente em componentes bioativos e sistemas de distribuição de medicamentos. Isso pode ser explicado por duas características importantes do PLA; biocompatibilidade e biodegradabilidade. Biocompatibilidade refere-se à compatibilidade do PLA com tecidos e também com algumas moléculas biologicamente ativas. A biodegradabilidade está estritamente relacionada a como a degradação do PLA pode ocorrer *in vivo*, sem posterior remoção, em que, sua versatilidade é determinada por alguns fatores como pKa, estrutura hidrofóbica, temperatura, porcentagem de mistura e também solubilidade em água conforme descrito na patente australiana AU 769658 B2. Detalhes mais específicos do PLA também foram dados na mesma patente, sobre o desenvolvimento de um conjugado molecular iônico para liberação sustentada de polipeptídeos bioativos. A matriz polimérica tem um papel na regulação da taxa de extensão das liberações de agentes terapêuticos *in vivo*. Nesse caso, a formulação precisa ter grupos iônicos COOH livres correspondentes a 50% do peso total, apresentar viscosidade entre 0,05 e 0,7 dl g⁻¹ em clorofórmio, peso molecular em torno de 1.200-40.000 e taxa de polimerização entre 10-300. Qualquer peptídeo estável ao ácido pode ser usado para ligar os grupos terminais do polímero-

COOH. Assim, o mecanismo conjugado pode ser empregado para liberação do fármaco, devido à sua transformação da forma conjugada insolúvel em componentes hidrossolúveis. Nesse contexto, a liberação de polipeptídeos bioativos aumenta, pelo menos, durante um período de 20 dias. A matriz polimérica pode ser sintetizada a partir de técnicas conhecidas como a reação de abertura do anel e a reação cíclica do dímero seguido de sua condensação de estrutura aberta.

O PLA tem sido empregado no desenvolvimento de *stents* devido às características mencionadas anteriormente. Também, o PLA tem sido usado na fabricação de microtúbulos (WO 2000/044443 A2), que são empregados como um *stent* para prevenir uma variedade de doenças do pericárdio, coração ou vasculatura coronária (US 6527801 B1). A degradação da superfície do *stent* é adaptada ao fluxo sanguíneo e sua erosão em massa é efetivamente evitada. O *stent* tem a forma de micropartículas, 10 µm no máximo, obtidas por processo térmico, 100 °C no máximo, e 70% p/p do fármaco terapêutico pode ser carregado pelo dispositivo (AU 738034 B2).

Com o conhecimento gerado em estudos recentes, foram alcançadas patentes e inovações desenvolvidas pela Academia, com descrição de detalhes avançados sobre técnicas mais sofisticadas e direcionadas. Em seguida, alguns elementos e mecanismos complexos, envolvendo o uso de PLA em sistemas de liberação de drogas com o uso de compostos bioativos, foram elucidados. A patente russa RU 2545734 C1 apresenta um PLA 75-79% aplicado em uma preparação medicamentosa contendo L-DOPA (3-hidroxi-L-tirosina) micronizada como ingrediente ativo para o tratamento da doença de Parkinson. O PLA também é usado como uma matriz polimérica biodegradável para permitir a liberação sustentada de um ou mais antígenos ou alérgenos, durante a modulação das respostas de células T e células B contendo um inibidor de funções mediadas por TNFR1, onde, 90% do peso do polímero deve ser degradado no ambiente corporal (US 2014/0178474). A patente WO 2014/077781 A1 propõe o uso de PLA como carreador polimérico imunomodulador. Desta vez, o imunógeno é uma proteína associada à membrana ou antígeno lipídico que é integrado ao polímero.

Atualmente, o PLA tem sido utilizado com segurança em órgãos humanos sensíveis, como o sistema ocular. Nesta patente inovadora US 2014/0105956 A1, o PLA atua como um micro-implante biodegradável para administração ocular de drogas. A composição possui um polímero de núcleo hidrofílico (10%, 25% ou 40% p/p), que consiste em um agente terapêutico hidrofílico (40 mg mL⁻¹), com tempo de liberação entre 8-10 semanas na região intraocular. O polímero é usado na forma de fibras hidrofílicas para tratar várias condições de linfomas intraoculares.

Ainda, com a função de liberação de drogas, o PLA é amplamente utilizado para sistemas de liberação controlada de diferentes componentes bioativos, tais como: drogas lipossomais (WO 2014/054026 A1), microesferas para tratamento de êmbolos (EP 2891485 B1), terapia da obesidade por um dispositivo de entrega de drogas que recruta células-tronco adiposas (WO 2014/025974 A1), e também para promover a cicatrização ou regeneração óssea (WO 2013/082295 A1).

4.2.3 Médica e biomédica

O PLA tem sido utilizado como substrato para engenharia de tecidos e bio-implantes, devido às suas propriedades mecânicas e de segurança aprovadas pela FDA (EP 1165749 B1). As aplicações médicas começaram com algumas finalidades intravasculares, como descrito em uma patente desenvolvida pela Universidade do Texas (EP 1582178 B1), compreendendo um dispositivo que se caracteriza por filamentos biodegradáveis para formar um corpo auto-expansível adequado para implantação em uma estrutura anatômica. Esses filamentos contêm 0,05%-0,25% de fosfato de cálcio inorgânico, 15-30% em mol de glicolídeo e possuem um fio de memória ligado ao corpo auto-expansível. No que diz respeito à engenharia de tecidos, a patente EP 1165749 B1 tem uma descrição de método para preparar armações porosas biodegradáveis em 3D para cultura de tecidos, forjadas em moldes e tamanhos de poros desejáveis. O polímero tem peso molecular de 5.000-500.000, obtido através de uma fase gel-sais com porosidade variando de 100 a 500 μm . Pode ser usado em tecidos a serem regenerados artificialmente *in vitro*, como cartilagem, osso, fígado, válvula cardíaca, ducto gastrointestinal e canal uretral.

O PLA também foi estudado como uma composição polimérica em microesferas (com tamanho médio de 200 μm) que contribuem para o fortalecimento dos tecidos do corpo após cirurgias ou lesões, que são restabelecidas com agentes terapêuticos e estabilizadores de microtúbulos, indutores de fibrose, fatores angiogênicos, citocinas e outros fatores envolvidos na cicatrização de feridas (AU 768527 B2). Outra inovação importante foi encontrada na oftalmologia, WO 2000/059420 A1 a melhor inserção de medicação tópica ou administração de lubrificação nos espaços conjuntivais e na superfície ocular do olho humano. Este *stent* é construído com polímeros biocompatíveis e não erodíveis, como o PLA, e é projetado para caber no fundo do globo ocular, sendo o tamanho compatível com aproximadamente 75% da população humana adulta, contendo 110 μl como capacidade de volume para drogas e liberação controlada de lubrificantes. O PLA também pode ser encontrado na área odontológica, onde,

uma composição de administração de medicamentos é caracterizada por conter um material complexo de polímero (entre 20-30 kDa) e um agente bioativo (aproximadamente 20% p/p). Em formato de chip, é adaptado para colocação abaixo da linha da gengiva em uma cavidade periodontal (US 6582717 B1).

Uma válvula cardíaca artificial também foi objeto de uma patente EP 1230901 B1. A válvula artificial é composta por um material polimérico bio-absorvível poroso, que contém uma estrutura fibrosa, e a combinação das peças é feita por adesão ou sutura. Além disso, foi desenvolvido um método de tratamento de isquemia, que compreende a deposição de uma camada de polímero na superfície luminal de um vaso alvo. Micro-esferas, que contêm um vasoconstritor adaptado para se fixar à camada de polímero, são injetadas, liberando o vasoconstritor *in situ* adjacente à camada de polímero. O vasoconstritor é administrado no vaso alvo por 30s-2min, quatro vezes ao dia, por pelo menos 5 dias, a partir de uma fonte externa de energia (ultrassom) que quebra as micro-esferas, liberando assim o vasoconstritor (US 6544543 B1).

As inovações recentes das aplicações do PLA estão de acordo com as necessidades reais do mercado, incluindo bio-implantes, biomateriais; nanotecnologia e exames de imagem. A patente WO 2014/124006 A1 desenvolveu uma nanopartícula biocompatível composta por um núcleo hidrofóbico, agente de revestimento que altera a superfície e uma pluralidade de agentes de transferência de saturação por troca química (diaCEST) acoplados covalentemente a um ou mais agentes de revestimento. Isso significa uma importante alternativa segura aos agentes convencionais de contraste de ressonância magnética à base de metal, que muitas vezes são tóxicos para os pacientes e o meio ambiente. A patente AU 2014/200405 B2 da Universidade de Harvard e da Universidade de Michigan, desenvolveu um dispositivo de vacina contra o câncer, usando uma composição estrutural de matriz polimérica aberta e interconectada. O objetivo foi utilizar o granulócito-macrófago, que por sua vez é um estimulador de colônias (GM-CSF), para o recrutamento de células imunes selecionadas (T, B, NK e células dendríticas), um antígeno tumoral e um fator bio-ativo. Este macrófago promove a resposta imune através da molécula de RNA, na qual, a resposta imune é incorporada ou revestida na composição da armação.

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são combinadas com um biomaterial para entregar células ao local do reparo, para induzir a ossificação e melhorar o reparo da cartilagem óssea. Pelo menos, uma proteína regeneradora óssea, como a proteína morfogenética óssea, pode ser combinada com fatores de crescimento celular adicionais (WO 2014/093836 A1). Filmes de biopolímeros (~ 3 milhões Da) compostos por um único fio de unidades repetitivas

(~ 5.000 grupos fotorreativos) ligados covalentemente, também podem ser aplicados como enxertos de superfície, contendo poli-diazirina (0,01 a 100 mM), durante cirurgias minimamente invasivas. Por exemplo, em cirurgias gastro-intestinais e punções, o tecido-filme pode ser fixado por luz UV (320-390 nm/20 min) (WO 2014/081391 A1). WO 2014/076147 A2 também utilizou PLA como fio flexível, para simular a conexão do tendão ao osso, desta vez, o elemento flexível é fixado ao osso por inserção.

Mais aplicações importantes do PLA podem ser descritas como dispositivo de drenagem de glaucoma (EP 2603185 B1, pela Universidade Nanyang Tech e Singapore Health); regeneração da cartilagem óssea (US 2014/0012393 A1, Fundação de Cooperação Acadêmica da Indústria da Universidade de Inje); biomateriais fotocatalíticos não tóxicos para a limpeza ambiental de água contaminada (WO 2012/177535 A2, Fundação de Pesquisa Uab et al.); cimento polimérico injetável biomimético e biodegradável (WO 2012/176224 A1, Torino Politecnico et al.); polímero biocompatível para contraste de raios X (US 2013/0202535 A1, Fundação Snu R&db); e esteróides nano-encapsulados insolúveis em água com o uso de biopolímeros (WO 2013/063279 A1, Universidade de Princeton). Outras aplicações interessantes de PLA podem ser encontradas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Aplicações diversas do PLA nos últimos 20 anos

Patente	Ano	Título	Objetivo	Criadores
<i>Início</i>				
WO 2001/010421 A1	2001	Implante de Fibra Biodegradável Liberadora de Medicamentos	Fibras poliméricas biodegradáveis capazes de liberação controlada de agentes terapêuticos	Universidade do Texas
WO 2001/012158 A1	2001	Sistema de Cateter de Liberação de Medicamentos Implantável com Interface Capilar	Estrutura funcional da interface capilar facilitando o crescimento vascular	Universidade de Jefferson e Joseph Jeffrey
WO 2001/081552 A1	2001	Substratos Padronizados e Métodos para Regeneração Nervosa	Fabricação de condutos de regeneração nervosa artificial	Universidade de Iowa State Res Found Inc
WO 2002/030481 A1	2002	Células Usando Construções de Malha-Gel Controlavelmente Degradáveis	Dispositivo de entrega de células com fase de gel, dentro de um substrato de polímero para uso em engenharia de tecidos	Instituto de Tecnologia de Massachusetts
US 6562374 B1	2003	Scaffolds de polímeros porosos biodegradáveis para engenharia de tecidos preparados a partir de uma mistura efervescente e sua preparação	Método para preparar scaffolds de polímeros porosos biodegradáveis para engenharia de tecidos	Korea Inst Sci & Tech e Biomedlab Corp
US 6638520 B1	2003	Estruturas e Métodos para Promover a Vascularização	Implante biocompatível com vasos sanguíneos	Universidade de Washington

Patente	Ano	Título	Objetivo	Criadores
<i>Continua...</i>				
AU 775905 B2	2004	Formulação Farmacêutica Composta por uma Mistura de Polímero e um Composto Ativo para Liberação Controlada por Tempo	Misturas de polímeros para liberação de drogas	Universidade de Rutgers
US 6887488 B2	2005	Materiais substitutos ósseos à base de fosfatos de nanocálcio/colágeno	Moléculas de colágeno e nano-fosfato de cálcio aglomeradas para substituição óssea	Universidade Tsinghua
US 7070590 B1	2006	Dispositivos de entrega de medicamentos com microchip	Dispositivo médico implantável para liberação controlada, incluindo cinética de drogas	Instituto de Tecnologia de Massachusetts
US 7060296 B2	2006	Hidrogéis hidrolisáveis para liberação controlada	Hidrogel biodegradável compreendendo cadeias poliméricas	Universidade de Utrecht
CN 103232691 A	2013	Filme de PLA antiestático biodegradável e método de preparação do mesmo	Um filme de PLA antiestático biodegradável	Universidade de Shaanxi Science & Tech
WO 2013/119650 A1	2013	Entrega de Bioterapêuticos ao Cérebro	Inibir/tratar a obesidade com administração intranasal (conjugado proteína-polímero)	Universidade de Nebraska e Universidade de Washington-Ct Commercial
CN 103566418 A	2014	Método de Preparação de Stent Intravascular de Eluição de Fármaco de Revestimento Múltiplo	Stent intravascular para inibir a reestenose e reduzir a formação de trombos	Universidade Chongqing
US 2014/0364959 A1	2014	Prótese de stent destinada a ser implantada no trato digestivo de um paciente	Uma prótese compressível e expansível na direção radial, para o trato digestivo	Assistência Pública – Hospitais de Paris
WO 2014/113773 A1	2014	Marcadores detectáveis por ultrassom, sistema de ultrassom e métodos para monitorar fluxo e permeabilidade vascular	Um marcador detectável por ultrassom de polímero absorvível	Universidade Johns Hopkins
WO 2014/019083 A1	2014	Dispositivo de estabilização óssea e método de produção	Dispositivo biocompatível de estabilização óssea	Sunnybrook Health Sciences Ct e Universidade de Toronto
US 9138411 B2	2015	Nanocurcumina de liberação sustentada lipossômica-plga para minimizar o prolongamento QT para terapia do câncer	Nanopartículas de polímeros lipídicos para minimizar o prolongamento do intervalo QT associado à curcumina no tratamento do câncer	Universidade do Norte do Texas Health Science Center At Fort Worth e Signpath Pharma Inc
US 8974516 B2	2015	Stents Tecidos Simples	Um stent intravascular de tecido biodegradável	Universidade do Texas
AU 2013/329077 A1	2015	Composições e métodos para entrega sustentada de peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1) terapêutico agonista do receptor	Encapsulamento de biopolímero para sistema de entrega de drogas de agonistas do receptor de peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1)	Universidade de Tufts
US 2015/0056282 A1	2015	Revestimentos de nanopartículas/polímeros de fluoreto de estrôncio para implantes médicos	Um método para formar um revestimento de nanopartículas/polímero de SrF ₂ ou filme autossustentável em um substrato metálico	Instituto de Pesquisa Southwest

Patente	Ano	Título	Objetivo	Criadores
<i>Continua...</i>				
US 2015/0313707 A1	2015	Prótese de mama permitindo liberação controlada de medicamento e método de produção para o mesmo	Uma prótese de mama e uma camada de droga ligada	Snu R&db Foundation
US 9402710 B2	2016	Estruturas 3-D macroporosas para engenharia de tecidos	Estrutura de engenharia de tecidos 3-D macroporosa compreendendo unidades de polímeros reticulados elastoméricos	The Board Of Trustees For The Leland Stanford Junior University
CN 110522533 A	2019	Suspensão Net Pulling Lifting Método de Embelezamento	Um efeito de método de embelezamento lifting mais durável	Zhu Nannan
CN 110538350 A	2019	Ácido poli-L-lático (PLLA)/zif-8 Estrutura óssea composta e método de preparação Do mesmo	Estrutura óssea composta de ácido poli-L-lático (PLLA)/ZIF-8 que pode melhorar a proliferação de células	Universidade de Jiangxi Sci & Technology e Jiangxi Huahu High Tech Co Ltd
CN 110616507 A	2019	Membrana de Nanofibra de Carga de Drogas para Prevenir Infecção Nasal e Adesão e Método de Preparação do mesmo	Um carregamento de droga de membrana de nanofibra para prevenir infecção e adesão de cavidades nasais e seios	Changhai Hospital Shanghai
EP 2925376 B1	2019	Artigos adesivos contendo uma combinação de micropadrões de superfície e química reativa e métodos de fabricação e uso dos mesmos	Adesivo biodegradável	Instituto de Tecnologia de Massachusetts e Brigham & Womens Hospital Inc
WO 2019/202519 A1	2019	Síntese de Dentimol, um medicamento antiglaucoma	Tratamento para hipertensão ocular ou glaucoma, administrando um β -bloqueador seletivo através de um espaçador flexível	Universidade de Virginia Commonwealth
WO 2019/175288 A1	2019	Remendo de reparo vascular	Um adesivo polimérico incluindo agentes trombogênicos e/ou extracelulares para promover a regeneração do tecido vascular	Instituto Químico De Sària
WO 2019/150377 A1	2019	Métodos e composições para tratar e prevenir diabetes	Estrutura porosa compreendendo um polímero biocompatível e células recombinantes com atividade aumentada de transportador de glicose tipo 4 (GLUT4)	Technion Res & Dev Foundation, et al.
US 2019/0127726 A1	2019	Entregando Enzima Usando um Depósito de Hidrogel Injetável	Sistema de entrega de hidrogel enzimático, caracterizado pelo fato de que compreende: uma enzima, um polímero e uma solução tampão	Universidade de Saint Louis
KR 20190107369 A	2019	Fita de levantamento para remoção de rugas	Patch polimérico para melhorar uma efeito lifting	Ko, Se Hoon

Patente	Ano	Título	Objetivo	Criadores
<i>Fim</i>				
ES 2810850 T3	2021	Nanopartículas Poliméricas que Encapsulam uma Combinação de Bioativos Naturais Trans-resveratrol (rsv) e Celastrol (cl), um Procedimento para a Preparação e Uso dos Mesmos no Tratamento do Câncer de Próstata.	Nanopartículas de mistura polimérica para o tratamento do câncer de próstata	Universidade Degli Studi Di Sassari
WO 2021/050568 A1	2021	Nanopartículas para Captação Seletiva de Tecidos ou Celulares	A composição de nanopartículas pode ser usada para tratar distúrbios genéticos relacionados ao pulmão e/ou sangue in vivo	Universidade de Yale

4.3 CONCLUSÕES

A tecnologia e as aplicações do PLA foram intensamente desenvolvidas e patenteadas. De fato, há uma enorme demanda por tecnologias ou produtos verdes, e o PLA está sendo considerado para substituir os produtos à base de petróleo. Devido às suas propriedades e segurança, o biopolímero não é apenas empregado na fabricação de embalagens, mas aparece em biomateriais, bio-implantes, marcadores biomoleculares, nano-encapsulação, processo cosmético, sistemas de liberação de fármacos e muito mais. Devido ao crescente interesse pelo PLA, a parceria entre Universidade-Indústria é exigida para o desenvolvimento tecnológico e teste de novas potenciais aplicações e inovações. Por meio desse banco de dados de patentes sobre PLA, foi possível expor como são direcionadas as necessidades da pesquisa da Academia e as necessidades da Empresa. Concluindo, esta parceria é imprescindível para atender a atual mudança de mercado.

5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho apresentou um método simples de produção de AL, utilizando um subproduto da agroindústria da cana-de-açúcar, o caldo de cana, produzido em abundância no Brasil. O caldo de cana apresenta elevadas concentrações de carbono favoráveis à multiplicação celular da LAB *Lactobacillus pentosus*. Condições ótimas de produção de AL foram definidas em pH 6, e 96 horas de fermentação, onde a produção alcançada foi de 113,74 g/L de AL com uma produtividade de 1,18 g/L.h. Esta produtividade é compatível com àquelas descritas na literatura, considerando que o substrato caldo de cana não passou por tratamento prévio e apresenta características promissoras. Não foram encontrados estudos precisamente utilizando caldo de cana e *L. pentosus*, sendo, portanto, um processo inédito para a produção de AL. A recuperação do AL a partir do lactato de cálcio seguiu um método convencional e comercial. Melhorias do processo podem ser trabalhadas desde as etapas de produção ao método de recuperação.

Sugestões:

- Fermentação por pulsos de carbono;
- Imobilização celular;
- Aumento da produtividade da cepa através de regulação gênica;
- Utilizar uma fonte alternativa de agente neutralizante, algum componente contendo sódio por ser de melhor manipulação;
- Aumento de escala;
- Destinação do gesso residual para a produção de cimento.

Este trabalho também apresentou três técnicas de purificação de AL utilizando resinas de troca iônica. O uso em conjunto das resinas catiônicas e aniônicas em tanque com agitação mecânica obteve sucesso, atingindo uma concentração final de AL de 189,11 g/L. Esta técnica proporciona a redução no volume de efluentes de lavagem e de regeneração, bem como a fácil manipulação. De acordo com a literatura, as resinas de troca iônica podem ser reutilizadas em, no mínimo, 20 ciclos, gerando economia no custo de produção de AL de alta pureza. Estudos são necessários para melhorar as condições específicas de uso nesta escala. Características do AL purificado devem ser analisadas, para uma posterior polimerização em PLA. Não existem relatos na literatura de uso em conjunto das resinas de troca iônica em tanque com agitação

mecânica para a purificação de AL, também não foram encontrados estudos de PLA produzido a partir de caldo de cana como substrato.

Sugestões:

- Observar a presença de grupos iônicos contaminantes no meio fermentativo, para evitar a competição pela troca iônica;
- Considerar a técnica de extração em fase sólida como etapa de limpeza da amostra;
- Lavagens das resinas utilizando a água como único solvente;
- Caracterização do AL purificado;
- Polimerização do AL obtido.

A tecnologia e as aplicações do PLA foram intensamente desenvolvidas e patenteadas. Devido ao crescente interesse pelo PLA, a parceria entre Universidade-Indústria é exigida para o desenvolvimento tecnológico e teste de novas potenciais aplicações e inovações. Por meio desse banco de dados de patentes sobre PLA, foi possível diferenciar as necessidades de desenvolvimento de pesquisa da Academia e melhorias das aplicações pela Indústria.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. **Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes.** *Biotechnology Advances*. V.31(6), p.877–902, 2013.
- ABRAHAM, A. et al. **Anaerobic co-digestion of bioplastics as a sustainable mode of waste management with improved energy production – A review.** *Bioresource Technology*, v.322, 124537, p.1-15, 2021.
- AHMAD, A.; BANAT, F.; TAHER, H. **A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges.** *Environmental Technology Innovations*, v.20, 101138, 2020.
- AHMAD, A. et al. **Lactic acid recovery from date pulp waste fermentation broth by ions exchange resins.** *Environmental Technology & Innovation*, v.22, 101438, 2021.
- AKKOYUNLU, B.; DALY, S.; CASEY, E. **Membrane bioreactors for the production of value-added products: Recent developments, challenges and perspectives.** *Bioresource Technology* 341, 125793, p.1-12, 2021.
- ALBUQUERQUE, T. L. et al. **Polylactic acid production from biotechnological routes: A review.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v.186, p.933–951, 2021.
- ALENCAR, T. et al. **Determinação de açúcar total em caldo de cana-de-açúcar pela atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em função do efeito do pH e temperatura.** 50º Congresso Brasileiro de Química, 2010.
- ALEXANDRI, M. et al. **Recent Advances on D-Lactic Acid Production from Renewable Resources: Case Studies on Agro-industrial Waste Streams.** *Food Technology and Biotechnology*, v.57(3), p.293–304, 2019.
- ARCANJO, M. R. A.; FERNANDES, F. A. N.; SILVA JR, I. J. **Separation of Lactic Acid Produced by Hydrothermal Conversion of Glycerol Using Ion-Exchange Chromatography.** *Adsorption Science & Technology*, v.33, n.2, 2015.
- ATAEI, S. A.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. **In situ separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.1229–1233, 2008.
- AU 2013/329077 A1. University of Tufts. **Compositions And Methods For Sustained Delivery Of Glucagon-like Peptide (glp-1) Receptor Agonist Therapeutics Biopolymer encapsulation for drug delivery system of glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/026-164-934-321-68X>

- AU 2014/200405 B2. Harvard College and University of Michigan. **Scaffolds For Cell Transplantation.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/100-666-550-724-940>
- AU 738034 B2. Advanced Cardiovascular System. **Method Of Incorporating Drugs Into A Polymer Component Of Stents.** (2001). <https://www.lens.org/lens/patent/180-188-091-802-898>
- AU 768527 B2. Angiotech Pharm Inc and University British Columbia. **Compositions And Methods For Improving Integrity Of Compromised Body Passageways And Cavities.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/001-884-342-734-518>
- AU 769658 B2. Sod Conseils Rech Appl Sci and Poly-Med Inc. **Ionic molecular conjugates of biodegradable polyesters and bioactive polypeptides.** (2004). <https://www.lens.org/lens/patent/118-318-641-155-088>
- AU 775905 B2. University of Rutgers. **Pharmaceutical Formulation Composed Of A Polymer Blend And An Active Compound For Time-controlled Release.** (2004). <https://www.lens.org/lens/patent/063-934-165-889-114>
- AWASTHI, D. et al. **Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for production of D-lactic acid.** *Biotechnol and Bioengineering*, v.115(2), p.453-463, 2018.
- BAEK, S. H. et al. **Improvement of D-Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* Under Acidic Conditions by Evolutionary and Rational Metabolic Engineering.** *Biotechnology Journal*, v.12, 2017.
- BAHRY, H. et al. **Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry.** *Journal of Biotechnology*, v. 306, 81–88, 2019.
- BARREIRO, et al. **Meio de cultura alternativo (caldo de cana-de-açúcar) para cultivo de *Lactobacillus plantarum* AJ2.** *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 3, n. 2, 2013.
- BERNARDO, M. P. et al. **L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v.47(3), p.640-646, 2016.
- BISHAI, M. et al. **A platform technology of recovery of lactic acid from a fermentation broth of novel substrate *Zizyphus oenophlia*.** *3 Biotech*, v.5, p.455–463, 2015.
- BOONMEE, M. et al. **Improved Lactic Acid Production by In Situ Removal of Lactic Acid During Fermentation and a Proposed Scheme for Its Recovery.** *Arabic Journal of Science Engineering*, v.41, p.2067–2075, 2016.
- BR 112014024011 B1. L'Oreal., **Processos cosméticos para pele e folha cosmética para pele.** (2018). <https://www.lens.org/lens/patent/178-348-220-063-285>.

- BUBPACHAT, T.; SOMBATSOMPOP, N.; PRAPAGDEE, B. **Isolation and role of polylactic acid-degrading bacteria on degrading enzymes productions and PLA biodegradability at mesophilic conditions.** Polymer Degradation Stabilization, v.152, p.75–85, 2018.
- CANTERI, M. G. et al. **SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft – Knott, Tukey e Duncan.** Revista Brasileira de Agrocomputação, v.1, n.2, p.18-24. 2001.
- CASALINI, T. et al. **A perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications.** Frontiers of Bioengineering and Biotechnology, v.7, p.259, 2019.
- CHANDRAPALA, et al. **Strategies for maximizing removal of lactic acid from acid whey – Addressing the un-processability issue.** Separation and Purification Technology, v.172, p.489-497, 2017.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. **Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil.** Tropical Plant Biology, v. 4, p.62–89, 2011.
- CHEN, Y.; MU, T. **Revisiting greenness of ionic liquids and deep eutectic solvents.** Green Chemical Engineering., v.2, p.174–186, 2021.
- CHOI, K. H.; CHANG, Y. K.; KIM, J. H. **Optimization of precipitation process for the recovery of lactic acid.** Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal, v.26, p.13-18, 2013.
- CHUENSANGJUN, C.; PECHYEN, C.; SIRISANSANEEYAKUL, S. **Degradation behaviors of different blends of polylactic acid buried in soil.** Energy Procedia, v.34, p.73–82, 2013.
- CIRLINI, M. et al. **Application of lactic acid fermentation to elderberry juice: Changes in acidic and glucidic fractions.** LWT - Food Science and Technology, v.118, 108779, 2020.
- CN 103232691 A. University of Shaanxi Science & Tech. **Biodegradable Antistatic Poly Lactic Acid Film And Preparation Method Thereof.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/168-868-665-910-252>
- CN 103566418 A. Chongqing University. **Preparation Method Of Multi-coating Drug Eluting Intravascular Stent.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/085-081-410-988-236>
- CN 110522533 A. Zhu Nannan. **Suspension Net Pulling Lifting Beautifying Method.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/197-500-728-192-769>

- CN 110538350 A. University of Jiangxi Sci & Technology and Jiangxi Huahu High Tech Co Ltd. **Poly-l-lactic Acid (plla)/zif-8 Composite Bone Scaffold And Preparation Method Thereof.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/129-311-098-194-663>
- CN 110616507 A. Changhai Hospital Shanghai. **Drug-loading Nanofiber Membrane For Preventing Nasal Infection And Adhesion And Preparation Method Thereof.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/100-130-201-544-444>
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Histórico Mensal da Cana-de-açúcar.** Disponível em: <[Conab - Histórico mensal cana-de-açúcar](#)>. Acesso em 14 de Abril de 2022.
- COSTA, et al. **Reflects of clarification of sugarcane juice with moringa on inorganic compounds of sugar VHP.** Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental, v.19(2), 2015.
- CUCINA, M. et al. **The role of waste management in reducing bioplastics' leakage into the environment: A review.** Bioresource Technology, v.337, 125459, 2021.
- DATTA, R.; HENRY, M. **Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.81, p.1119–1129, 2006.
- de CASTRO, T. R. et al. **The Potential of Cleaner Fermentation Processes for Bioplastic Production: A Narrative Review of Polyhydroxyalkanoates (PHA) and Polylactic Acid (PLA).** Journal of Polymer Environmental, v.30, p.810–832, 2022.
- de la TORRE, I. et al. **On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates.** Biochemical Engineering Journal, v.145(15), p.162-169, 2019.
- DE OLIVEIRA, J. **POLY(LACTIC ACID) PRODUCTION BY CONVENTIONAL AND MICROWAVE POLYMERIZATION OF LACTIC ACID PRODUCED IN SUBMERGED FERMENTATION.** 2016. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.
- de OLIVEIRA, R. A. et al. **Current Advances in Separation and Purification of Second-Generation Lactic Acid.** Separation and Purification Reviews, v.49, p.159–175, 2020.
- de OLIVEIRA, R. A. et al. **Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*.** Bioresource Technology, v.6, p.26-31, 2019.
- ELSAWY, M. A. et al. **Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites.** Renewable Sustainability Energy Reviews, v.79, p.1346–1352, 2017.

EP 1165749 B1. Korea Advanced Inst Sci & Tech and Regen Biotech Inc. **Method For Preparing Porous, Biodegradable And Biocompatible, Polymeric Scaffolds For Tissue Engineering.** (2007). <https://www.lens.org/lens/patent/088-795-712-672-388>

EP 1230901 B1. Gunze Kk and Tokyo Women S Medical University. **Mechanical Heart Valve And Production Method Thereof.** (2005). <https://www.lens.org/lens/patent/056-108-822-818-853>

EP 1582178 B1. University of Texas. **Woven Intravascular Devices And Methods For Making The Same And Apparatus For Delivery Of The Same.** (2012). <https://www.lens.org/lens/patent/162-908-758-041-776>

EP 2603185 B1. University Nanyang Tech and Singapore Health. **A Glaucoma Valve Comprising A Degradable Polymer With A Steroid.** (2016). <https://www.lens.org/lens/patent/069-387-001-479-31X>

EP 2766298 B1. Los Alamos Nat Security Llc and Noxel Corp., **Hair treatment process providing dispersed colors by light diffraction.** (2011). <https://www.lens.org/lens/patent/037-604-900-767-945>

EP 2821469 B1. Procter & Gamble. **Liquid cleaning and/or cleansing composition.** (2018). <https://www.lens.org/lens/patent/172-189-907-810-271>

EP 2891485 B1. Chung-Ang University. **Method For Preparing Microspheres For Emboli, And Method For Preparing Microspheres To Which Drug-containing Carrier Is Bound.** (2018). <https://www.lens.org/lens/patent/088-947-561-848-71X>

EP 2925376 B1. Massachusetts Institute Technology and Brigham & Womens Hospital Inc. **Adhesive Articles Containing A Combination Of Surface Micropatterning And Reactive Chemistry And Methods Of Making And Using Thereof.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/081-298-756-773-509>

ES 2810850 T3. University Degli Studi Di Sassari. **Nanopartículas Poliméricas Que Encapsulan Una Combinación De Bioactivos Naturales Trans-resveratrol (rsv) Y Celastrol (cl), Un Procedimiento Para La Preparación Y Uso De Las Mismas En El Tratamiento Del Cáncer De Próstata.** (2021). <https://www.lens.org/lens/patent/015-648-781-394-838>

European Bioplastics. Disponível em: <<https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>>. Acesso em 30 de Março de 2020.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. **Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review.** Advances Drug Delivery Reviews, v.107, p.367-392, 2016.

- FERREIRA, R. D. S. et al. **Determinação de minerais em caldos de cana comercializados em feiras livres**. 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014.
- FILANNINO, P. et al. **Metabolic Responses of *Lactobacillus plantarum* Strains during Fermentation and Storage of Vegetable and Fruit Juices**. Applied and Environmental Microbiology, v.80, n.7, 2014.
- GB 547525 A. British Thomson Houston Co Ltd. **Improvements in synthetic resinous compositions**, (1942). <https://www.lens.org/lens/patent/178-387-576-160-811>
- GB 590490 A. Shell Dev., **Production of alkyd resins**, (1947). <https://www.lens.org/lens/patent/179-393-570-181-280>
- GB 599837 A. Frederic John Haines Mackereth and Ici Ltd., **The preparation of new polymerisable organic materials and polymers and copolymers thereof**, (1948). <https://www.lens.org/lens/patent/161-045-362-827-468>
- GB 600706 A. Chem Ind Basel., **Manufacture of water-soluble amide derivatives**, (1948). <https://www.lens.org/lens/patent/077-430-303-328-147>
- GKOUNTELA, C. I.; VOUYIOUKA, S. N. **Enzymatic Polymerization as a Green Approach to Synthesizing Bio-Based Polyesters**. Macromolecules, v.2, p.30–57, 2022.
- Global Industry Analysts, Inc. Disponível em: <<https://www.strategyr.com/market-report-lactic-acid-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- HAGHIGHI MOOD, S. et al. **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment**. Renewable Sustainability Energy Reviews, v. 27, p.77–93, 2013.
- HALEEM, A.; KUMAR, V.; KUMAR, L. **Mathematical modelling & pressure drop analysis of fused deposition modelling feed wire**. International Journal of Engineering and Technology, v.9(4), p.2885-2894, 2017.
- HARRISON, R. G. (ORG.). **Bioseparations science and engineering**. New York: Oxford University Press, 2003.
- INGLEZAKIS, V. J.; POULOPOULOS, S. G. **Adsorption and ion exchange**. Adsorption, Ion Exchange and Catalysis. p.243–353, 2006. Elsevier.
- Inkwood Research. Disponível em: <<https://www.inkwoodresearch.com/reports/polylactic-acid-market>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- JANTASEE, S. et al. **Potential and assessment of lactic acid production and isolation – a review**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.92, p.2885–2893, 2017.

- JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. **L(+)-Lactic Acid Recovery from Cassava Bagasse Based Fermented Medium Using Anion Exchange Resins**. Food Science and Technology, v.51, n.6, 2008.
- JUNG, Y. K. et al. **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers**. Biotechnology and Bioengineering, v.105, p.161–171, 2010.
- KARP, S. G. et al. **Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale**. Bioresource Technology, v.102(2), p.1765–1772, 2011.
- KLOTZ., S.; KUENZA, A.; PRÜBEA, U. **Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus***. Green Chemistry, n. 19, p.4633–4641, 2017.
- KR 20190107369 A. Ko, Se Hoon. **Lifting Tape For Wrinkle Removal**. (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/055-122-884-755-784>
- KUMAR, V. et al. **A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment**. Bioresource Technology, v.299, 122633, 2020.
- KWAN, T. H.; HU, Y.; LIN, C. S. K. **Techno-economic analysis of a food waste valorisation process for lactic acid, lactide and poly (lactic acid) production**. Journal of Clean Production, v.181, p.72–87, 2018.
- LASPRILLA, A. J. et al. **Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – a review**. Biotechnology Advances, v.30(1), p.321–328, 2012.
- Lens Patent—search and analysis**. Lens.org. 2020 Disponível em: <<https://www.lens.org/>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- LI, X. et al. **Salinity enhances high optically active L-lactate production from co-fermentation of food waste and waste activated sludge: Unveiling the response of microbial community shift and functional profiling**. Bioresource Technology, v.319, 124124, 2021.
- LI, Z. et al. **Improvement of l-lactic acid production under glucose feedback controlled culture by *Lactobacillus rhamnosus***. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.162,p.1762–1767, 2010.
- LUONGO, V. et al. **Lactic acid recovery from a model of *Thermotoga neapolitana* fermentation broth using ion exchange resins in batch and fixed-bed reactors**. Separation Science and Technology, v.54, n.6, p.1008–1025, 2019.

- MANANDHAR, A.; SHAH, A. **Techno-economic analysis of bio-based lactic acid production utilizing corn grain as feedstock**. Processes, v.8, p.199, 2020.
- MARTINEZ, F., A., C. et al. **Lactic acid properties, applications and production: A review**. Trends in Food Science & Technology, v. 30, p. 70-83, 2013.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- Mordor Intelligence**. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lactic-acid-market>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- MSUYA, N. et al. **Separation and Purification of Lactic Acid from Sisal Wastes**. American Journal of Chemistry, v.8, n.1, p.13-18, 2018.
- MUNIM, S. A.; RAZA, Z. A. **Poly(lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications**. Journal of Porous Materials, v.26(3), p.881–901, 2019.
- NAGARAJAN, D. et al. **Lactic acid production from renewable feedstocks using poly-vinyl alcohol immobilized *Lactobacillus plantarum* 23**. Industrial Engineering and Chemical Research, v.59, n.39, p.17156–17164, 2020.
- NIAOUNAKIS, M. **Recycling of biopolymers – The patent perspective**. European Polymer Journal, v.114, p.464–475, 2019.
- NOGUEIRA, F. S. et al. **Minerals in sugar cane syrup and cane juice**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29(4), p.727-731, 2009.
- OLIVEIRA, J. et al. **Bioconversion of potato-processing wastes into an industrially-important chemical lactic acid**. Bioresource Technology Reports, v.15, 100698, 2021.
- OLIVEIRA, R. A. et al. **Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design – From economic to production aspects**. Biochemical Engineering Journal, v.133, p.219–39, 2018.
- ORREGO, D.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; KIM, D. **Optimization and Scale-Up of Coffee Mucilage Fermentation for Ethanol Production**. Molecules, v.11(4), p.786, 2018.
- ORTIZ-SANCHEZ, M.; ALZATE, C. A. C. **Analysis of the routes for biomass processing towards sustainable development in the conceptual design step: Strategy based on the compendium of bioprocesses portfolio**. Bioresource Technology, v.350, 126852, p.1-12, 2022.
- OTHMAN, M. et al. **Growth Enhancement of Probiotic *Pediococcus acidilactici* by Extractive Fermentation of Lactic Acid Exploiting Anion-Exchange Resin**. Frontiers in Microbiology, v.9, n.2554, 2018.

- PAPADIMITRIOU, K. et al. **Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.80, n.3, 2016.
- PAULOVA, L. et al. **Comparison of lactic acid production by *L. casei* in batch, fed-batch and continuous cultivation, testing the use of feather hydrolysate as a complex nitrogen source**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.63(e20190151), 2020.
- PEREZ-MADRIGAL, M. M. et al. **Semiconducting, biodegradable and bioactive fibers for drug delivery**. Express Polymers Letters, v.10(8), p.628-646, 2016.
- Plastics Insight**. Disponível em: <<https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/polylactic-acid>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- PLEISSNER, D. et al. **Separation of lactic acid and recovery of salt-ions from fermentation broth**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.92, n.3, p. 504-511, 2017.
- PRÜCKLER, M. et al. **Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread**. Food Microbiology, v.49, p.211–219, 2015.
- RADOSAVLJEVIĆ, M. et al. **Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid**. Bioprocess Biosystem Engineering, v.43, p.315–322, 2020.
- RAI, P. et al. **Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers**. Bioresource Technology, v.325, 124739, 2021.
- RASAL, R. M.; JANORKAR, A.V.; HIRT, D. E. **Poly(lactic acid) modifications**. Progress of Polymer Science, v.35(3), p.338–356, 2010.
- RAWOOF, S. A. A. et al. **Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review**. Environmental Chemical Letters, v.19, p.539–556, 2021.
- ROSLI, N. A. et al. **Comprehensive exploration of natural degradation of poly(lactic acid) blends in various degradation media: A review**. International Journal of Biology and Macromolecules, v.187, p.732–741, 2021.
- RU 2545734 C1. Sechenov University. **Drug Preparation For Parkinson Disease**. (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/087-134-199-395-433>
- SAUER, M.; MATTANOVICH, D.; MARX, H. Microbial production of organic acids for use in food. In: **Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, n 246, p. 288-320. 2013.
- SHAH, T. V.; VASAVA, D.V. **A glimpse of biodegradable polymers and their biomedical applications**. e-Polymers, v.19(1), p.385-410, 2019.

- SHAMELI, K. et al. **Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity.** International Journal of Nanomedicine, v.5, p.573-579, 2010.
- SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S.; GOKHALE, D. V. **Polylactic acid: synthesis and biomedical applications.** Journal of Applied Microbiology, v.127, p.1612–1626, 2019.
- SINGHVI, M.; GOKHALE, D. **Biomass to biodegradable polymer (PLA).** RSC Advances, v.3, p.13558–13568, 2013.
- SINGHVI, M.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. **Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.102, p.5911–5924, 2018.
- SONG, Y. et al. **Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.93, p.1917–1925, 2012.
- STORZ, H., VORLOP, K. D. **Bio-based plastics: Status, challenges and trends.** Landbauforsch Volkenrode, v.63, p.321–332, 2013.
- TONG, K. T. X. et al. **Third-generation L-Lactic acid production by the microwave-assisted hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* extract.** Bioresource Technology, v.342, 125880, p.1-12, 2021.
- Total Corbion.** Disponível em: <<https://www.total-corbion.com/news/total-corbion-pla-announces-the-first-world-scale-pla-plant-in-europe/>>. Acesso em 30 de Março de 2020.
- USMANI, Z. et al. **Bioprocessing of waste biomass for sustainable product development and minimizing environmental impact.** Bioresource Technology, v.322, 124548, p.1-12, 2021.
- USMANI, Z. et al. **Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses.** Bioresource Technology, v.346, 126444, p.1-10, 2022.
- US 2013/0202535 A1. Snu R&db Foundation. **X-ray Visible Medical Device And Preparation Method Thereof.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/117-357-921-558-178>.
- US 2014/0012393 A1. Inje University Industry-academic Cooperation Foundation. **Complex Support Body For Regenerating Bone-cartilage, Method For Manufacturing Thereof, And Composition For Treating Bone And Cartilage Related Diseases Comprising Same As Active Ingredient.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/096-950-218-683-521>

- US 2014/0105956 A1. University of Cincinnati. **Biodegradable Polymer Based Microimplant For Ocular Drug Delivery.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/176-013-253-719-626>
- US 2014/0178474 A1. Pls Design Gmbh, Helmholtz Zentrum Muenchen, Klinikum Rechts Der Isar Der Tech Uni Muenchen. **Selective Local Inhibition Of Tnfr1-mediated Functions At The Site Of Antigen/allergen Presentation.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/140-506-636-946-796>
- US 2014/0364959 A1. Assistance Publique - Hopitaux De Paris. **Stent Prosthesis Intended To Be Implanted In The Digestive Tract Of A Patient.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/090-974-758-917-884>
- US 2015/0040940 A1. Krasniansky Noam. **Cleaning pad.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/009-474-835-400-101>
- US 2015/0056282 A1. Southwest Research Institute. **Electrophoretically Deposited Strontium Fluoride Nanoparticle/polymer Coatings For Medical Implants.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/171-639-250-532-156>
- US 2015/0313707 A1. Snu R&db Foundation. **Breast Prosthesis Allowing Controlled Release Of Drug And Production Method For Same.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/166-130-221-027-027>
- US 2019/0127726 A1. Saint Louis University. **Delivering Enzyme Using An Injectable Hydrogel Depot.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/135-358-721-934-885>
- US 6527801 B1. Advanced Cardiovascular Systems Inc. **Biodegradable Drug Delivery Material For Stent.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/169-117-907-789-31X>
- US 6544543 B1. Advanced Cardiovascular System Inc. **Periodic Constriction Of Vessels To Treat Ischemic Tissue.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/091-442-823-015-289>
- US 6562374 B1. Korea Inst Sci & Tech and Biomedlab Corp. **Biodegradable Porous Polymer Scaffolds For Tissue Engineering Prepared From An Effervescent Mixture And Its Preparation.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/153-628-063-674-005>
- US 6582717 B1. Massachusetts Institute of Technology. **Drug Delivery Composition And Device.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/154-717-588-241-57X>
- US 6638520 B1. University of Washington. **Structures And Methods For Promoting Vascularization.** (2003). <https://www.lens.org/lens/patent/168-058-552-963-724>
- US 6887488 B2. Tsinghua University. **Nano-calcium Phosphates/collagen Based Bone Substitute Materials.** (2005). <https://www.lens.org/lens/patent/128-526-765-724-042>

- US 7060296 B2. University of Utrecht. **Hydrolysable Hydrogels For Controlled Release.** (2006). <https://www.lens.org/lens/patent/071-375-390-543-04X>
- US 7070590 B1. Massachusetts Institute of Technology. **Microchip Drug Delivery Devices.** (2006). <https://www.lens.org/lens/patent/163-881-694-892-369>
- US 8974516 B2. University of Texas. **Plain Woven Stents.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/195-066-717-580-924>
- US 9138411 B2. University Of North Texas Health Science Center At Fort Worth and Signpath Pharma Inc. **Curcumin-er, A Liposomal-plga Sustained Release Nanocurcumin For Minimizing Qt Prolongation For Cancer Therapy.** (2015). <https://www.lens.org/lens/patent/090-480-972-996-683>
- US 9402710 B2. The Board Of Trustees For The Leland Stanford Junior University. **Macroporous 3-d Scaffolds For Tissue Engineering.** (2016). <https://www.lens.org/lens/patent/113-268-907-617-696>
- VECINO, X. et al. **Ion-Exchange Technology for Lactic Acid Recovery in Downstream Processing: Equilibrium and Kinetic Parameters.** Water, 13, 1572, 2021.
- VIDRA, A.; NÉMETH, A.; SALGÓ, A. **Factors Affecting Precipitation of Calcium Lactate from Fermentation Broths and from Aqueous Solution.** Periodica Polytechnica Chemical Engineering, v.63(4), p. 533–540, 2019.
- WAINAINA, S. et al. **Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion technologies.** Bioresource Technology, v.301, 122778, p.1-14, 2020.
- WANG, J. et al. **Optimization of immobilized *Lactobacillus pentosus* cell fermentation for lactic acid production.** Bioresource Bioprocessing, v.7(15), p.2-14, 2020.
- WANG, Y. et al. **Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*.** Journal of Biotechnology, v.129, p.510–515, 2007.
- WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. **Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v.119, p.10–18, 2015.
- WASEWAR, K. L. **Separation of Lactic Acid: Recent Advances.** Chemistry and Biochemistry Engineering, v. 19, n. 2, p. 159–172, 2005.
- WO 2000/044443 A2. Angiotech Pharm Inc, Advanced Res & Tech Inst, Hunter, W. L. and March, K. L. **Intra-pericardial Delivery Of Anti-microtubule Agents.** (2000). <https://www.lens.org/lens/patent/185-991-382-656-311>

- WO 2000/059420 A1. Uab Research Foundation. **Improved Conjunctival Inserts For Topical Delivery Of Medication Or Lubrication.** (2000). <https://www.lens.org/lens/patent/023-425-843-883-621>
- WO 2001/010421 A1. University of Texas. **Drug Releasing Biodegradable Fiber Implant.** (2001). <https://www.lens.org/lens/patent/007-638-693-964-475>
- WO 2001/012158 A1. University of Jefferson and Jeffrey, J. **Implantable Drug Delivery Catheter System With Capillary Interface.** (2001). <https://www.lens.org/lens/patent/125-257-777-988-625>
- WO 2001/081552 A1. University of Iowa State Res Found Inc. **Patterned Substrates And Methods For Nerve Regeneration.** (2001). <https://www.lens.org/lens/patent/019-510-369-122-236>
- WO 2002/030481 A1. Massachusetts Institute of Technology. **Cell Delivery Using Controllably Degradable Mesh-gel Constructs.** (2002). <https://www.lens.org/lens/patent/173-185-091-056-795>
- WO 2012/176224 A1. Torino Politecnico, Ciardelli, G., Gentile, P., Tonda-Turro, C., Chiono, V., Mattu, C. and Ferreira-Duarte, A. M. **Bio-mimetic And Biodegradable Polymeric Cement.** (2012). <https://www.lens.org/lens/patent/151-929-322-994-713>
- WO 2012/177535 A2. Uab Research Foundation, Kharlampieva, E. P. and Yancey, B. **Biodegradable Photocatalytic Nanocomposite Microsponges Of Polylactic Acid.** (2012). <https://www.lens.org/lens/patent/081-664-920-897-544>
- WO 2013/063279 A1. University of Princeton. **A High-loading Nanoparticle-based Formulation For Water-insoluble Steroids.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/013-505-909-032-422>
- WO 2013/082295 A1. University of Medicine and Dentistry of New Jersey. **Insulin-mimetics As Therapeutic Adjuncts For Bone Regeneration.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/150-839-282-694-007>
- WO 2013/119650 A1. University of Nebraska and University of Washington-Ct Commercial. **Delivery Of Biotherapeutics To The Brain.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/072-567-808-474-380>
- WO 2013/148841 A2. Mucell Extrusion Llc. **Method of forming polymeric foam and related foam articles.** (2013). <https://www.lens.org/lens/patent/033-479-644-135-74X>
- WO 2014/019083 A1. Sunnybrook Health Sciences Ct and University of Toronto. **Bone Stabilization Device And Method Of Production.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/011-588-426-379-329>

- WO 2014/025974 A1. Brown University. **Autologous Cell-based Therapy For Treating Obesity.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/121-948-590-249-192>
- WO 2014/054026 A1. University of Witwatersrand. **Liposomal Drug Delivery System.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/191-547-977-388-244>
- WO 2014/076147 A2. Universität Zürich. **Device For Fixation Of A Flexible Element, Particularly A Natural Or Synthetical Ligament Or Tendon, To A Bone.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/089-336-038-947-32X>
- WO 2014/077781 A1. Agency Science Tech & Res. **Method For Eliciting An Immune Response To An Immunogen.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/157-473-047-917-486>
- WO 2014/081391 A1. University Nanyang Tech. **New Photoactive Bioadhesive Compositions.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/034-581-592-587-476>
- WO 2014/093836 A1. University of Georgia, Stice, S. L., Peroni, J. F. and Mumaw J. **Ossification-inducing Composition And Methods Of Use Thereof.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/026-761-391-064-503>
- WO 2014/113773 A1. University Johns Hopkins. **Ultrasound-detectable Markers, Ultrasound System, And Methods For Monitoring Vascular Flow And Patency.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/024-556-542-956-002>
- WO 2014/124006 A1. University Johns Hopkins. **Nanoparticles For Magnetic Resonance Imaging Tracking And Methods Of Making And Using Thereof.** (2014). <https://www.lens.org/lens/patent/165-696-982-416-242>
- WO 2019/150377 A1. Technion Res & Dev Foundation, B G Negev Technologies And Applications Ltd At Ben Gurion Univ and Rambam Med Tech Ltd. **Methods And Compositions For Treating And Preventing Diabetes.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/078-654-136-681-195>
- WO 2019/175288 A1. Instituto Quimico De Sàrria. **Vascular Repair Patch.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/104-082-961-455-649>
- WO 2019/202519 A1. University of Virginia Commonwealth. **Synthesis Of Dentimol, An Antiglaucoma Drug.** (2019). <https://www.lens.org/lens/patent/144-214-072-632-871>
- WO 2021/050568 A1. University of Yale. **Nanoparticles For Selective Tissue Or Cellular Uptake.** (2021). <https://www.lens.org/lens/patent/131-314-012-135-837>
- XU, X. et al. **Stabilizing lactate production through repeated batch fermentation of food waste and waste activated sludge.** Bioresource Technology, v.300, 122709, 2020.

ZAABA, N. F.; JAAFAR, M. **A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation.** Polymers Engineering Science, v.60(9), p.2061-2075, 2020.

ZAINI, N. A. M. et al. **Purification and polymerisation of microbial d-lactic acid from DDGS hydrolysates fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v.150, n.107265, 2019.

ZHANG, Y.; YOSHIDA, M.; VADLANI, P. V. **Biosynthesis of D-lactic acid from lignocellulosic biomass.** Biotechnology Letters, v.40, p.1167–1179, 2018.

ZHOU, S. et al. **Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110.** Applied Environmental Microbiology, v.69(1), p.399–407, 2003.