



UnB

**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ**

Tese de Doutorado

Produção de ácido láctico: seleção de bactérias, purificação e síntese de novos polímeros renováveis

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

Brasília, 2024.



UnB

**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ**

Produção de ácido láctico: seleção de bactérias, purificação e síntese de novos polímeros renováveis

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

Brasília, 2024.

Folha de aprovação

Aos vinte e cinco dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e quatro, instalou-se a banca examinadora de Tese de Doutorado da aluna **Raissa Gabriela Martins Reis Barroso**, matrícula **19/0071010**. A discente apresentou o trabalho intitulado “**Produção de ácido láctico: seleção de bactérias, purificação e síntese de novos polímeros renováveis**”.

Concluída a exposição, procedeu-se a arguição da candidata, e após as considerações dos examinadores o resultado da avaliação do trabalho foi pela aprovação do trabalho

Dr. Fabricio Machado Silva/UnB
(Presidente)

Dra. Ana Karla de Souza Abud/UFS
(Membro Titular)

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida/Embrapa
(Membro Titular)

Dr. José Joaquín Linares León/UnB
(Membro Titular)

Dra. Sarah Silva Brum/UnB
(Suplente)

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso
(Doutoranda)



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio Machado Silva, Professor(a) de Magistério Superior do Instituto de Química**, em 25/10/2024, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Karla de Souza Abud, Usuário Externo**, em 25/10/2024, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **João Ricardo Moreira de Almeida, Usuário Externo**, em 25/10/2024, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Joaquín Linares Leon, Professor(a) de Magistério Superior do Instituto de Química**, em 26/10/2024, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Raissa Gabriela Martins Rêis Barroso, Usuário Externo**, em 31/10/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **11928790** e o código CRC **5EA2F6D6**.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e pela força.

Ao meu esposo, Pedro Rafael, por ser o meu maior incentivador, meu parceiro e meu apoio durante todo o processo. Obrigada por tudo! Sua paciência e compreensão foram fundamentais neste processo. Agradeço por todo o apoio emocional e por celebrar minhas vitórias ao meu lado.

Aos meus pais, por toda a base que me deram. Tudo o que conquistei foi graças a vocês. São minha maior inspiração. Sempre priorizaram minha educação com muito apoio e carinho. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter.

Ao meu orientador, Fabricio Machado, e à minha coorientadora, Sílvia Belém, pelo aprendizado que vai além do âmbito acadêmico. Agradeço por todos esses anos de convivência e por contribuírem de forma tão positiva na minha carreira acadêmica.

Aos meus colegas de bancada da Embrapa e do LDPQ, em especial à Isabela Castro. Vocês sempre me acolheram com um sorriso e um café, comemorando minhas conquistas e ajudando no dia a dia. Esta jornada não seria a mesma sem a ajuda de vocês. Levarei todos no meu coração e espero retribuir todo o bem que me fizeram ao longo desse tempo.

Aos técnicos e analistas da UnB e Embrapa Agroenergia, que me acompanharam durante esses anos, auxiliando e contribuindo para que a pesquisa pudesse acontecer.

À CAPES e ao CNPq, por fomentar minha pesquisa com bolsas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Uma alternativa para substituição de plásticos derivados de petroquímicos é a produção sustentável de plásticos, como o poli(ácido láctico), (PLA), cujo bloco construtor de partida, o ácido láctico, pode ser obtido de fontes renováveis através de fermentação microbiana. Dentre os diferentes microrganismos utilizados na produção de ácido láctico, as bactérias lácticas apresentam uma vantagem, visto que naturalmente produzem o ácido láctico como metabólito principal, são resistentes a pH ácido e a uma grande faixa de temperatura. Neste trabalho, quatro bactérias (*Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactic* e *Weissella thailandensis*) isoladas de leite de búfalas foram submetidas a fermentações com as fontes de carbono: lactose, sacarose, glicose e glicerol para selecionar a bactéria elite para produção de ácido láctico. Parâmetros como concentração inicial da fonte de carbono, oxigênio dissolvido, tempo de pré-inóculo e controle de pH foram avaliados para encontrar a melhor condição de produção de L-(+)-ácido láctico. Inicialmente, a bactéria *L. lactis* foi a que obteve maior produção de ácido láctico com sacarose, produzindo 27,44 g/L. A *E. durans* produziu 18,44 g/L de ácido láctico com um rendimento de 0,92 g/g com a lactose. Tendo em vista o potencial de consumo de lactose da *E. durans*, esta cepa foi selecionada para produção de ácido láctico em fermentadores, visando futuras fermentações utilizando resíduo da indústria do leite como fonte de carbono. Com base nos experimentos com diferentes concentrações iniciais de substrato, concluiu-se que a associação de 20 g/L de lactose com 10 g/L de glicose possibilitou uma melhor bioconversão a ácido láctico. A adição de nitrogênio ao meio fermentativo para diminuir a concentração de oxigênio dissolvido não contribuiu para uma maior produção de ácido láctico. O controle de pH por meio da adição de base e o reciclo de células melhoram a produção de ácido láctico, chegando a 36,47 g/L e 0,38 g/L.h de produtividade. O processo foi otimizado com o aumento de escala em fermentadores de 5 L com alimentação em pulso, possibilitando uma produção de aproximadamente 66 g/L de ácido láctico. Diferentes métodos de purificação foram testados, e utilização da resina de troca iônica Amberlite IRA-67 Cl⁻ possibilitou a recuperação do ácido láctico com pureza acima de 90%, apropriada para sua modificação química e posterior polimerização. Foi realizada a esterificação seletiva do ácido láctico purificado com ácido acrílico. Esse ácido láctico modificado foi então copolimerizado com metacrilato de isobornila em miniemulsão, resultando em um polímero com propriedades promissoras para várias aplicações. No entanto, nas polimerizações via transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação (RAFT), o ácido láctico purificado comprometeu a reação, devido à sensibilidade do método a contaminantes.

Palavras chaves: Fermentação, L-(+)-ácido láctico, bactérias lácticas, purificação de ácido láctico e polímero.

Abstract

An alternative to replace petrochemical-derived plastics is the production of biodegradable polymers, such as poly(lactic acid) (PLA). The starting building block for PLA, lactic acid, can be obtained from renewable sources through microbial fermentation. Among the different microorganisms used in fermentation, lactic acid bacteria have advantages since they naturally produce lactic acid as their main metabolite, are resistant to acidic pH, and thrive in a wide temperature range. In this work, four strains (*Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactic e* *Weissella thailandensis*) isolated from buffalo milk were subjected to fermentations with different carbon sources (lactose, sucrose, glucose, and glycerol). Parameters such as initial concentration of carbon source, dissolved oxygen, pre-inoculum time, and pH control were studied to determine the best conditions for L-(+)-lactic acid production. Initially, *L. lactis* produced the highest lactic acid production with sucrose (27.44 g/L). *E. durans* produced 18.44 g/L lactic acid (yield of 0.92 g/g) with lactose. Given *E. durans*' potential for lactose consumption, this strain was selected for lactic acid production in fermenters. It was concluded that the association of 20 g/L of lactose with 10 g/L of glucose enabled a better bioconversion to lactic acid. The addition of nitrogen to the fermentation medium to decrease dissolved oxygen concentration did not contribute to increased lactic acid production. However, controlling pH through base addition and recycling cells improved lactic acid production, reaching 36.47 g/L and a productivity of 0.38 g/L.h. The scale-up in 5 L fermenters with pulse feeding enabled a production of approximately 66 g/L of lactic acid. Different purification methods were tested, and the use of the ion exchange resin Amberlite IRA-67 Cl⁻ resin enabled the recovery of lactic acid with purities greater than 90% for chemical modification and subsequent polymerizations. Selective esterification of purified lactic acid with acrylic acid was achieved. Purified lactic acid was selectively esterified with acrylic acid, and this modified lactic acid was then copolymerized with isobornyl methacrylate, resulting in a polymer with promising properties for various applications. However, during RAFT polymerizations, the purified lactic acid compromised the reaction due to the method's sensitivity to contaminants.

Keywords: Fermentation, L-(+)-lactic acid, lactic acid bacteria, lactic acid purification and polymer.

Sumário

1 - Introdução.....	1
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Objetivos gerais	3
1.2.1 Objetivos específicos.....	3
2 - Revisão bibliográfica	4
2.1 Ácido láctico.....	4
2.2 Poli(ácido láctico)	5
2.3 Obtenção do ácido láctico.....	8
2.3.1 Síntese via processos químicos	8
2.3.2 Síntese via processos fermentativos	10
2.4 Microrganismos empregados na produção de ácido láctico neste estudo	15
2.4.1 <i>Enterococcus</i>	16
2.4.2 <i>Weissella</i>	18
2.4.3 <i>Lactococcus</i>	19
2.4.4 <i>Pediococcus</i>	21
2.5 Purificação do ácido láctico.....	23
2.6 Modificação do ácido láctico	27
2.7 Polimerização	28
2.7.1 Polimerização em emulsão.....	29
2.7.2 Polimerização em miniemulsão	31
2.7.3 Polimerização controlada via Transferência de Cadeia Reversível por Adição-Fragmentação (RAFT).....	32
3 - Material e métodos.....	35
3.1 Material	35
3.1.1 Linhagens	35
3.1.2 Equipamentos	35
3.1.3 Meios e Soluções.....	36
3.2 Etapa 1	37
3.2.1 Correlação da massa da bactéria com a densidade ótica	37
3.2.2 Crescimento de pré-inóculo.....	38
3.2.3 Avaliação da produção de ácido láctico em frascos	38
3.2.3.1 Avaliação da capacidade de produção de ácido láctico utilizando diferentes fontes complementares de carbono.....	38
3.2.3.2 Adaptação celular natural com glicerol	39
3.3 Etapa 2	39
3.3.1 Avaliação da produção de ácido láctico em diferentes concentrações de lactose em Biorreator de 1 litro	39
3.3.2 Avaliação da produção de ácido láctico com <i>E. durans</i> em condições anaeróbicas em biorreator de 1 litro.....	40
3.3.3 Avaliação da produção de ácido láctico com <i>E. durans</i> com reciclo de células em biorreator de 1 litro	40
3.3.4 Avaliação da produção de ácido láctico com <i>E. durans</i> com alimentação em pulso e controle de pH em biorreator de 1 litro.....	41
3.3.5 Fermentações com <i>E. durans</i> em biorreator de 5 litros	41
3.3.6 Purificação do ácido láctico obtido por processo fermentativo	41
3.3.6.1 Precipitação com carbonato de cálcio	42

3.3.6.2	Precipitação com etanol.....	42
3.3.6.3	Troca iônica em coluna de vidro	43
3.3.7	Detecção e quantificação dos produtos de fermentação	46
3.3.8	Avaliação da performance de fermentação e purificação	47
3.4	Etapa 3	48
3.4.1	Esterificação seletiva do ácido lático purificado com ácido acrílico ...	48
3.4.2	Modificação do ácido lático via esterificação de Steglich com ácido acrílico	48
3.5	Etapa 4	49
3.5.1	Reação de copolimerização em miniemulsão de ácido lático modificado com metacrilato de isobornila.....	49
3.5.2	Reação de polimerização do ácido lático modificado via RAFT.....	49
3.5.3	Técnicas de caracterização dos polímeros	50
4	- Resultados e discussões	51
4.1	Etapa 1	51
4.1.1	Perfil de crescimento em meio líquido	51
4.1.2	Avaliação da produção de ácido lático em frascos	53
4.1.2.1	Avaliação da capacidade de produção de ácido lático utilizando diferentes fontes complementares de carbono.....	53
4.1.2.2	Adaptação celular natural com glicerol	70
4.2	Etapa 2	75
4.2.1	Avaliação da produção de ácido lático em diferentes concentrações de lactose com <i>E. durans</i> em biorreator.....	75
4.2.2	Avaliação da produção de ácido lático com <i>E. durans</i> em condições anaeróbicas em biorreator.	78
4.2.3	Avaliação da produção de ácido lático com <i>E. durans</i> com reciclo de células em biorreator.....	81
4.2.4	Avaliação da produção de ácido lático com <i>E. durans</i> com alimentação com pulso e controle de pH em biorreator	83
4.2.5	Avaliação da produção de ácido lático com <i>E. durans</i> em biorreator de 5 Litros com múltiplos pulsos de alimentação.....	85
4.2.6	Purificação do ácido lático obtido por processo fermentativo	88
4.3	Etapa 3	94
4.3.1	Esterificação seletiva do ácido lático purificado com ácido acrílico ..	94
4.3.2	Modificação do ácido lático via esterificação de Steglich.....	97
4.4	Etapa 4	100
4.4.1	Reação de copolimerização em miniemulsão com metacrilato de isobornila	100
4.4.2	Reação de polimerização do ácido lático modificado via RAFT	106
5	- Conclusões	113
6	- Referências.....	115

Lista de Abreviações

AA	Ácido acrílico
ADP	Adenosina difosfato
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitrila)
AL	Ácido láctico
ALC	Ácido láctico comercial
ALM	Ácido láctico modificado
ALP	Ácido láctico purificado
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATP	Adenosina trifosfato
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
CTAs	Agentes de transferência de cadeia
CMC	Concentração micelar crítica
DCC	N, N'-díciclohexilcarbodiimida
D _p	tamanho médio de partículas
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
Đ _M	Dispersão da massa molar
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DO%	Oxigênio dissolvido
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTP	Distribuição do tamanho de partículas
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HD	Hexadecano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBMA	Metacrilato de isobornila
KPS	Persulfato de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
MMA	Metilmetacrilato
M _n	Massa molar média em número

MRS	Meio de Man, Rogosa e Sharpe para cultivo microbiano.
Mw	Massa molar média em massa
OD	Densidade óptica
PLA	Poli(ácido láctico)
RAFT	Transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SLS	Dodecil sulfato de sódio
T _g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química das estereoformas L(+)-ácido láctico e D(-) ácido láctico Fonte: adaptado de Gupta 2007. ⁷	4
Figura 2 - Síntese da lactida em duas etapas. Fonte: adaptado de Ghadamyari e colaboradores. ²²	7
Figura 3 - Mecanismo de polimerização via abertura aniônica de anel da lactida. Fonte: Ali e Ismail. ²³	7
Figura 4 - Esquema simplificado da síntese química para obtenção de ácido láctico (Adaptado de Narayan ²⁹).....	9
Figura 5 - Produtos obtidos a partir do glicerol (GOL) utilizando catalisadores de óxido de cobalto. Gliceraldeído (GLY), 2-hidroxipropenal (HP), piruvadeído (PVR), ácido láctico (LA), 1,2-propanodiol (1,2-PDO), hidroxiacetona (HA), ácido acético (AA). Fonte: Torres e colaboradores ³²	10
Figura 6 - Vias catabólicas das bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) (Modificado de Hofvendahl e Hägerdal ³⁴).	11
Figura 7 - Metabolismo da lactose (Adaptado de Forsythe ³⁵).	12
Figura 8 - Possíveis vias metabólicas a partir de glicerol (Fonte: Adaptado de Da Silva ⁴⁶).....	15
Figura 9 - Reação de esterificação para modificação do ácido láctico com ácido acrílico catalisada com ácido metanossulfônico. ⁹⁶	28
Figura 10 – Esquema da reação de esterificação de Steglich. ⁹⁷	28
Figura 11 - Os três intervalos de uma reação de polimerização em emulsão, indicando as moléculas de surfactante (cauda hidrofóbica e extremidade hidrofílica), gotas de monômero, micelas (grupos de surfactante na Etapa I), radicais (R´), iniciador (I) e partículas de látex estabilizadas com surfactante. (Fonte: Adaptado de Thickett e Gilbert ¹⁰²).	30
Figura 12 - O mecanismo da polimerização RAFT: sequência de reações de adição e fragmentação. (Fonte: adaptado de Bradford et, al. 2021. ¹⁰⁴).....	33
Figura 13 - Curva padrão de correlação entre o peso seco das bactérias A) <i>E. durans</i> , B) <i>W. thailandensis</i> , C) <i>P. acidilactici</i> e D) <i>L. lactis</i> com a densidade óptica.....	38
Figura 14 – Etapas de purificação do ácido láctico com carbonato de cálcio. ...	42
Figura 15 - Etapas de purificação do ácido láctico com precipitação com etanol.	43
Figura 16 - Equipamentos utilizados para os experimentos de troca iônica. Coluna de vidro com membrana de vidro para retenção da resina acoplada a bomba peristáltica.....	45
Figura 17 – Esquema para experimentos de troca iônica com resina Amberlite IRA-67 Cl ⁻	45
Figura 18 – Etapas da purificação do ácido láctico por troca iônica em coluna de vidro.....	46
Figura 19 - Concentração celular das bactérias <i>E. durans</i> (verde), <i>P. acidilactici</i> (vermelho), <i>W. thailandensis</i> (preto) e <i>L. lactis</i> (azul) em meio MRS líquido por 72 horas.....	52

Figura 20 – Produção de ácido láctico para a bactéria <i>P. acidilactici</i> com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.....	54
Figura 21 – Produção de ácido láctico para a bactéria <i>E. durans</i> com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.....	56
Figura 22 – Produção de ácido láctico para a bactéria <i>W. thailandensis</i> com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.....	57
Figura 23 – Produção de ácido láctico para a bactéria <i>L. lactis</i> com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.....	59
Figura 24 – Produção de ácido láctico com <i>P. acidilactici</i> para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.....	62
Figura 25 - Produção de ácido láctico com <i>W. thailandensis</i> para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.....	64
Figura 26 - Produção de ácido láctico com <i>L. lactis</i> para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose e 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.....	66
Figura 27 - Produção de ácido láctico com <i>E. durans</i> para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.....	69
Figura 28 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria <i>P. acidilactici</i> em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.....	71
Figura 29 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria <i>E. durans</i> em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.....	72
Figura 30 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria <i>W. thailandensis</i> em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.....	73
Figura 31 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria <i>L. lactis</i> em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.....	74
Figura 32 – Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose por <i>E. durans</i> em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10 g/L de glicose e 40 g/L de lactose (condição 1) e meio MRS com 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose (Condição 2).....	76
Figura 33 - Produção em condições anaeróbicas de ácido láctico e consumo de lactose e glicose por <i>E. durans</i> em fermentações em biorreator de 1 litro com 600 mL de meio MRS suplementado com 10 g/L de glicose e 10 g/L de lactose.....	79
Figura 34 – Correlação entre pH, densidade óptica (OD) e oxigênio dissolvido para <i>E. durans</i> em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10g/L de glicose e 10 g/L de lactose em anaerobiose.....	80
Figura 35 - Produção de ácido láctico, consumo de lactose, pH e densidade óptica para a bactéria <i>E. durans</i> em fermentações com reciclo de células obtidas da fermentação em biorreator de 1 litro. Cada ciclo de 96 horas..	82

Figura 36 - Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose para a bactéria <i>E. durans</i> em fermentações com controle de pH = 5,0 em biorreator de 1 litro.....	84
Figura 37 - Correlação entre pH, densidade óptica (OD) e oxigênio dissolvido para <i>E. durans</i> em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10 g/L de glicose e 10 g/L de lactose.....	84
Figura 38 - Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose para a bactéria <i>E. durans</i> em fermentações com controle de pH = 5,0 em biorreator de 5 litros e alimentação em pulsos.	87
Figura 39 - Correlação entre pH e biomassa para <i>E. durans</i> em fermentações em biorreator de 5 litros.	87
Figura 40 - Curva obtida na etapa de eluição do ácido láctico com NH ₄ HCO ₃ . .	93
Figura 41 - Gráficos da análise FTIR <i>in situ</i> da reação de esterificação entre o ácido láctico comercial e ácido acrílico: (A) espectro FTIR 3D, (B) espectro FTIR 2D e (C) perfil da altura do pico em função do tempo.....	95
Figura 42 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico. Espectro 1 – Ácido láctico comercial. Espectro 2 – Ácido láctico purificado.	96
Figura 43 - Gráficos da análise FTIR <i>in situ</i> da reação de esterificação entre o ácido láctico comercial e ácido acrílico via Reação de Steglich: (A) espectro FTIR 3D, (B) espectro FTIR 2D e (C) perfil da altura do pico em função do tempo.....	98
Figura 44 – Proposta de Esterificação de Steglich entre o ácido acrílico e ácido láctico.	99
Figura 45 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico.	99
Figura 46 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros IBMA/ALM.	102
Figura 47 - Curvas de DSC dos polímeros IBMA-ALC e IBMA-ALP.	103
Figura 48 - Curvas termogravimétricas (TG/DTG) dos polímeros IBMA-ALC e IBMA-ALP.	104
Figura 49 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de copolimerização entre o ácido láctico comercial modificado e o IBMA.....	105
Figura 50 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de copolimerização entre o ácido láctico comercial modificado e o IBMA.....	106
Figura 51 - Síntese das partículas de macroRAFT obtido via polimerização RAFT.	107
Figura 52 - Distribuições de massa molar (DMM) do homopolímero de ALM proveniente de AL comercial.	109
Figura 53 - Curvas de DSC do homopolímero de ALM proveniente do AL comercial.	110
Figura 54 - Curvas termogravimétricas (TG/DTG) dos homopolímeros de ALC e ALP.....	110
Figura 55 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da polimerização RAFT do ALC e ALP modificados.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produção de ácido láctico via fermentação de diversas fontes.....	13
Tabela 2 - Propriedades das resinas utilizadas nos experimentos de troca iônica.....	44
Tabela 3 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>P. acidilactici</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	55
Tabela 4 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>E. durans</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	56
Tabela 5 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>W. thailandensis</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	58
Tabela 6 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>L. lactis</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	60
Tabela 7 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>P. acidilactici</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	61
Tabela 8 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria <i>W. thailandensis</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	63
Tabela 9 - Produção de ácido láctico e consumo da fonte de carbono para a bactéria <i>L. lactis</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	66
Tabela 10 - Produção de ácido láctico e consumo da fonte de carbono para a bactéria <i>E. durans</i> em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.....	68
Tabela 11 – Comparação dos valores de produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para cada experimento em biorreator de 1 litro.....	85
Tabela 12 - Resultados de pureza e recuperação do ácido láctico para os métodos de precipitação com carbonato de cálcio, com etanol e carvão ativo.....	89
Tabela 13 – Experimentos de Troca iônica com as Resinas comerciais Amberlite IR-120 H ⁺ e IRA-67 Cl ⁻ e suas respectivas recuperações e purezas.....	90
Tabela 14 - Dados experimentais de tamanho médio de partículas (Dp), índice de polidispersão do tamanho de partícula (Pdl), massa molar média em massa (Mw), massa molar média em número (Mn) e a dispersão da massa molar ($D_M = Mw/ Mn$) e temperatura de transição vítrea (T_g) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.....	101

1 - Introdução

1.1 Contextualização

O ácido láctico é um ácido carboxílico com aplicações nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e de polímeros. De acordo com a Markets and Markets, o mercado global de ácido láctico foi estimado em US\$ 1,3 bilhão em 2023, com previsão de alcançar US\$ 2,8 bilhões até 2028. O mercado global de poli(ácido láctico) (PLA) foi estimado em US\$ 1,3 bilhão em 2023 e deve chegar a US\$ 2,9 bilhões até 2028. As projeções para o PLA estão em ascensão, especialmente devido ao seu papel fundamental na sustentabilidade. Atualmente, aproximadamente 79% dos plásticos são descartados no meio ambiente, causando acúmulos no meio ambiente e riscos à saúde. Apenas cerca de 10% são reciclados e 12% queimados. O PLA é visto como o substituto potencial para polímeros à base de petróleo, devido à sua biocompatibilidade, estabilidade térmica e moldabilidade.¹

A fermentação é uma das principais formas de obtenção do ácido láctico. Diversas fontes de carbono, microrganismos e processos fermentativos são estudados visando a otimização da produção, podendo destacar as bactérias lácticas.²

A bubalinocultura tem se destacado no Brasil devido à robustez, adaptabilidade e longevidade produtiva dos búfalos. Em 2022, o número de bubalinos no Brasil foi de cerca de 1,5 milhão de cabeças, um aumento em relação aos anos anteriores.³ O leite de búfala possui maior teor de gordura, proteína e lactose comparado ao leite de vaca, o que resulta em maior rendimento industrial. Sendo assim, o resíduo desta indústria tem grande potencial para ser utilizado como fonte de carbono em fermentações lácticas. Além disso, o leite de búfala é naturalmente rico em bactérias lácticas, que estão adaptadas ao ambiente com alta concentração de lactose. Muitas dessas bactérias são homoláticas, o que significa que podem produzir ácido láctico de

forma eficiente.⁴ Um desafio da produção do ácido láctico via fermentativa é sua purificação, e técnicas como troca-iônica, destilação a vácuo, esterificação, métodos de hidrólise, separação por membrana (osmose inversa).⁵

Uma das principais aplicações do ácido láctico é na indústria de polímeros, uma vez que pode ser modificado quimicamente e ser empregado como unidade monomérica para a produção de derivados do PLA. Além disso, novos materiais poliméricos renováveis são estudados visando diminuir a produção dos plásticos derivados do petróleo, já que tais polímeros têm gerado um acúmulo de resíduos no meio ambiente com altos tempos de degradação. Uma outra desvantagem de plásticos de origem fóssil é o fato de ser dependente a uma matéria prima não renovável.⁶ A produção de polímeros provenientes de fontes não petroquímicas como o PLA é de grande interesse, pois são provenientes de fontes renováveis, e que muitas vezes podem ser biodegradáveis.⁷

De acordo com o Portal Comex Stat (<http://comexstat.mdic.gov.br>) utilizando a Nomenclatura Comum do Mercosul para o ácido láctico (29181100), as exportações brasileiras de ácido láctico no ano de 2021 foram de US\$ 21.701.261,00 e as importações US\$ 14.565.740,00, estes dados demonstram a importância da exportação de ácido láctico pelo Brasil, sendo que a Alemanha, Holanda, China e Espanha foram os países dos quais o Brasil mais importou ácido láctico em 2021. Holanda, Argentina e Colômbia e Estados Unidos foram os países para os quais o Brasil mais exportou ácido láctico em 2021.⁸

A modificação do ácido láctico é uma alternativa para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, com aplicações e propriedades de interesse industrial, como por exemplo implantes ósseos e reconstituição de tecidos. A adição de sítios reativos a molécula do ácido láctico permite que novos métodos de polimerização sejam explorados para obtenção de produtos poliméricos inéditos. A polimerização por transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação (RAFT) é um exemplo de processo que pode ser usado para polimerizar o ácido láctico modificado. A polimerização RAFT permite o controle do crescimento das cadeias poliméricas e síntese de polímeros com distribuição estreita de massa molar.⁹

1.2 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é produzir ácido láctico por processos fermentativos utilizando bactérias lácticas e realizar a síntese de novos monômeros e polímeros. Para isto, o trabalho foi dividido em 4 Etapas.

1.2.1 Objetivos específicos

Etapa 1:

- Selecionar a bactéria elite para a produção de ácido láctico.
- Avaliar as diferentes fontes de carbono e condições de fermentação que maximizem a produção de ácido láctico.

Etapa 2:

- Ajustar os parâmetros de fermentação para maximizar a produção de ácido láctico com a bactéria elite em fermentadores.
- Purificar o ácido láctico obtido nas fermentações.

Etapa 3:

- Modificação química estrutural da molécula de ácido láctico via reação de esterificação com acompanhamento *in situ*.

Etapa 4:

- Utilizar os derivados do ácido láctico para a produção de polímeros utilizando a polimerização em miniemulsão e RAFT.
- Elucidar as estruturas dos monômeros e polímeros obtidos, utilizando espectroscopia no infravermelho, cromatografia de permeação em gel e ressonância magnética nuclear.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico, também conhecido como ácido 2-hidroxipropiônico ($C_3H_6O_3$). A presença dos grupos funcionais hidroxila e carboxila possibilita sua transformação química para novas moléculas para diversas aplicações.^{7, 11} Devido à assimetria do carbono 2, o ácido láctico possui atividade óptica.² A Figura 1 mostra a estrutura química dessa molécula.

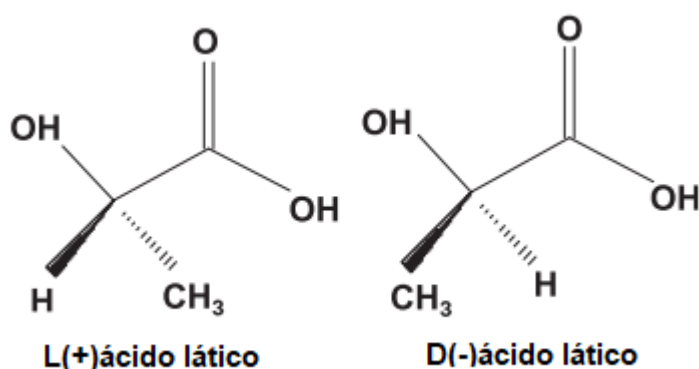


Figura 1 - Estrutura química das estereoformas L(+)-ácido láctico e D(-) ácido láctico
Fonte: adaptado de Gupta 2007.⁷

Segundo as previsões do Grand View Research, o mercado do ácido láctico será equivalente a US\$ 5,02 bilhões em 2028, com uma taxa de crescimento anual composta de 8,0% de 2021 a 2028. O crescimento do mercado deve-se à crescente demanda por ácido láctico nas indústrias de alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos e bioplásticos.¹²

Com base nos dados do Portal Comex Stat, o Brasil importou 5.859.576 kg líquidos de ácido láctico no ano de 2021. No mesmo ano, o Brasil exportou 23.913.045 kg deste ácido orgânico.⁸

O carbono β quiral proporciona à molécula dois enantiômeros, que são a imagem especular um do outro. Os isômeros possuem as mesmas propriedades físicas e químicas, exceto quando reagem com outros compostos com atividade óptica. O L(+)-ácido láctico é o mais utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, uma vez que este enantiômero é capaz de ser metabolizado mais rapidamente pelo corpo humano, devido a presença da enzima L-lactato desidrogenase.^{2,13}

A indústria alimentícia utiliza o ácido láctico como acidulante, flavorizante, regulador de pH e inibidor de crescimento microbiano. Na indústria de cosméticos, o ácido láctico pode ser utilizado na produção de hidratantes, como agente de clareamento e agente anti-acne.^{7,13}

Parte importante da demanda de ácido láctico é para a produção de polímeros. Tais materiais são de interesse para a biomedicina devido sua especificidade para ambientes biológicos, que é medida em termos de sua biocompatibilidade e bioestabilidade e depende de suas interações com células e fluidos biológicos.⁷ Por exemplo, Gayer e colaboradores¹⁴ desenvolveram um material composto de polilactídeo e carbonato de cálcio com estrutura de poros interligados biocompatível, com grande potencial de serem usados como implantes de substituição óssea.

2.2 Poli(ácido láctico)

O esgotamento de recursos e acúmulo de resíduos no meio ambiente geram um interesse no desenvolvimento de produtos sustentáveis e duráveis.¹⁵ Portanto, produtos com carbono fóssil reduzido são estudados para reduzir a dependência de recursos petrolíferos e substituir parte dos polímeros convencionais à base de petróleo e não biodegradáveis por plásticos de base biológica, como o polímero derivado do ácido láctico (PLA).¹⁶

O PLA possui diversas aplicações além de potencial plástico biodegradável e biocompatível. Tal polímero pode ser útil em diversas aplicações por simples modificações da sua estrutura físico-químico. O PLA pode ser misturado com outros componentes poliméricos para alcançar propriedades distintas, já que o polímero de ácido láctico puro pode apresentar limitações nas suas propriedades mecânicas, como baixa resistência térmica e baixa resistência ao impacto.^{7,17}

As propriedades mecânicas e a taxa de degradação do PLA podem ser ajustadas e controladas a depender do peso molecular e do método de polimerização. Na policondensação, por exemplo, o controle no peso molecular do polímero é dificultado e variações no tempo e a temperatura afetam suas propriedades finais. Em geral, peso molecular mais alto resulta em materiais com maior resistência mecânica.¹⁸

O tempo de vida útil destes polímeros é um atrativo ecológico quando comparado com os provenientes de hidrocarbonetos, podendo ser degradado no meio ambiente mais rapidamente em condições de aerobiose ou anaerobiose controladas. Por ser um termoplástico natural, ao ser exposto à altas temperaturas e alta umidade, pode ter sua biodegradação otimizada.¹⁹ A termodegradação e fotodegradação são técnicas capazes de acelerar degradação do PLA.²⁰

A síntese do PLA é feita principalmente por dois métodos: policondensação direta de ácido láctico e polimerização por abertura do anel láctico (lactida), que é o dímero cíclico do ácido láctico.⁷

A policondensação direta de ácido láctico utiliza solvente, vácuo e altas temperaturas para remoção de água produzida na condensação e geralmente produz polímeros com baixa massa molar.⁷ O processo de policondensação direta consiste na desidratação do ácido láctico que será polimerizado a PLA, a remoção da água produzida a partir da condensação do ácido láctico é dificultada no estágio final da polimerização, porque a difusão de umidade no polímero muito viscoso é lenta, a água residual retida limita o peso molecular do PLA, sendo assim, o processo de policondensação direta é pouco usado.²¹

A polimerização por abertura de anel da lactida é um processo de reação em que monômeros cíclicos são propagados pela iniciação de diferentes íons. A lactida é sintetizada a partir do ácido láctico em meio aquoso em duas etapas. Primeiramente, a água é removida do material de partida de ácido láctico para formar o pré-polímero. Em seguida, ocorre a despolimerização do pré-polímero, formando a lactida, tal reação pode ser realizada com catalisadores básicos homogêneos, como o carbonato de cézio, por exemplo.²² A Figura 2 exemplifica a síntese da lactida.

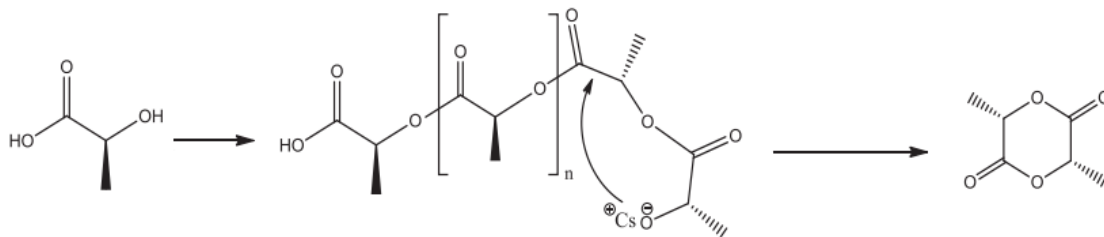


Figura 2 - Síntese da lactida em duas etapas. Fonte: adaptado de Ghadamyari e colaboradores.²²

O mecanismo aniônico de abertura de anel para a produção do PLA está demonstrado na Figura 3. Neste mecanismo, alcóxidos de metais alcalinos (por exemplo, CH_3OK) atuam como iniciadores do processo. Durante a reação de propagação, a ligação do oxigênio é clivada pelo ataque do ânion do iniciador. A macromolécula de PLA obtida possui um átomo de oxigênio do grupo terminal alcóxido, possibilitando sucessivos ataques e a formação do polímero.²¹

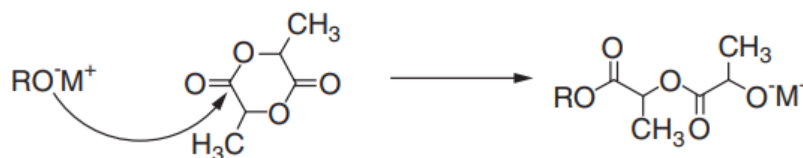


Figura 3 - Mecanismo de polimerização via abertura aniônica de anel da lactida. Fonte: Ali e Ismail.²³

Quando usada com monômero, a lactida é capaz de formar polímeros termoplásticos, biodegradáveis, de alta massa molar, elevado grau de cristalinidade e resistência à tração. Tais polímeros são similares aos obtidos a partir de fontes fósseis.²

Jiang e colaboradores¹⁷ produziram copolímeros em blocos com poli(ácido L-lático) (PLLA), tricloroetanol e poli(metacrilato de metila) (PMMA) por polimerização via abertura de anel seguida de polimerização radicalar, esses copolímeros possuíam resistência de impacto de 63 kJ/m^2 e se mostraram eficientes e versáteis para fabricar materiais plásticos mais resistentes.

Gitari e colaboradores²⁴ avaliaram as propriedades mecânicas, térmicas e de resistência à água da nanocelulose revestida com PLA e constataram que os nanocompósitos apresentavam alto desempenho para embalagens.

Tappa e colaboradores²⁵ desenvolveram métodos de impressão 3D para a fabricação de implantes de PLA que permitem a liberação controlada de medicamentos. A impressão 3D foi usada para fabricar parafusos, pinos e placas ósseas com fixação de gentamicina (antibiótico) e metotrexato (antifolato). Foram realizadas peças com e sem os medicamentos. Os resultados com liberação controlada dos princípios ativos foram bem sucedidos quanto os efeitos antibacteriano e quimioterápico.

2.3 Obtenção do ácido lático

A obtenção do ácido lático pode ser pela rota biológica (bioconversão com bactérias, fungos e leveduras) ou pela rota química, sendo que a síntese química de ácido lático produz a mistura racêmica dos isômeros. A fermentação permite a produção de L-ácido lático ou D-ácido lático opticamente puros, a depender do microrganismo utilizado. A eficiência dos processos de fermentação depende principalmente do microrganismo produtor, da fonte de carbono e condições da fermentação.²⁶

Açúcares simples como lactose, glicose ou sacarose são amplamente utilizados nas fermentações como fonte de carbono, uma vez que podem ser fermentados diretamente a ácido lático.²⁶ No mercado global atual, o ácido lático é proveniente da cana-de-açúcar e do milho. O baixo custo e a abundância destes insumos viabiliza sua utilização na produção.^{27,28}

2.3.1 Síntese via processos químicos

O processo de obtenção do ácido lático por síntese química ocorre principalmente a partir da reação entre acetaldeído e ácido cianídrico na presença de uma base sob alta pressão para produzir lactonitrila. A destilação é utilizada para purificar a lactonitrila. Uma vez purificada, a lactonitrila é então hidrolisada com ácido sulfúrico para produzir ácido lático e como subproduto sal de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A Figura 4 exemplifica tal processo.^{26,29}

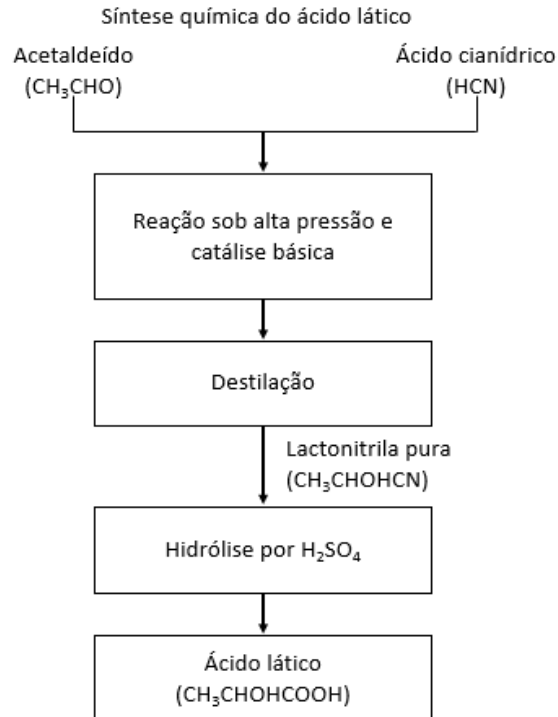
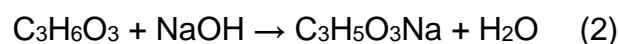
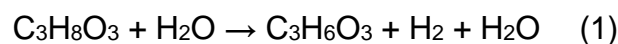


Figura 4 - Esquema simplificado da síntese química para obtenção de ácido láctico (Adaptado de Narayan²⁹).

Reações de oxidação e hidrotermais usando catalisador também são potenciais técnicas para produção de ácido láctico com alta seletividade. Usualmente, os mecanismos de reação do glicerol são propostos com base na desidrogenação oxidativa e desidratação em meio aquoso alcalino.³⁰

O processo hidrotermal é realizado em meio alcalino usando hidróxido de sódio ou potássio como catalisador ou por catálise heterogênea usando uma ampla gama de óxidos como catalisador, entre eles óxidos de cobre, níquel, ouro e zinco. Rodrigues e colaboradores³¹ produziram ácido láctico pelo processo hidrotermal, utilizando o NaOH como catalisador, a partir de glicerol bruto a 260 °C. As reações 1 e 2 demonstram as etapas realizadas neste estudo.



Torres e colaboradores³² utilizaram catalisadores heterogêneo de Co_3O_4 suportado em CeO_2 e ZrO_2 na oxidação do glicerol a ácido láctico, segundo os autores o catalisador suportado em óxido de Cério foi o mais seletivo para ácido láctico (90% de seletividade). As reações seguiram o processo hidrotermal a 250 °C. A Figura 5 exemplifica as reações e os produtos obtidos no estudo.

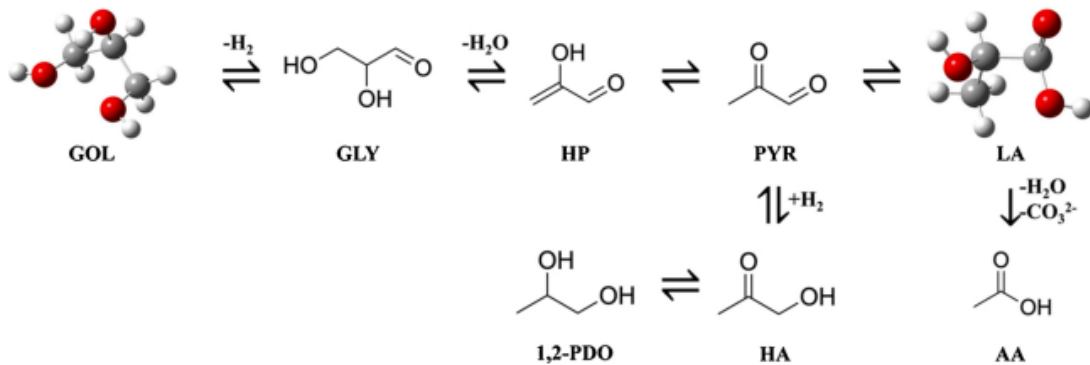


Figura 5 - Produtos obtidos a partir do glicerol (GOL) utilizando catalisadores de óxido de cobalto. Gliceraldeído (GLY), 2-hidroxiopropanal (HP), piruvaleído (PVR), ácido láctico (LA), 1,2-propanodiol (1,2-PDO), hidroxiaçetona (HA), ácido acético (AA). Fonte: Torres e colaboradores³²

2.3.2 Síntese via processos fermentativos

A fermentação é o termo bioquímico que se refere à degradação anaeróbica de nutrientes orgânicos para a produção de energia, armazenada na forma de ATP. Diferentemente da respiração celular, que utiliza oxigênio comoceptor final de elétrons, a fermentação ocorre na ausência de oxigênio (ou em condições de baixo oxigênio). Nesse processo, o aceitador final de hidrogênios é uma molécula orgânica, o que é crucial para a obtenção de energia em condições anaeróbicas, como ocorre em bactérias, leveduras e fungos, por exemplo. Além de gerar energia, a fermentação resulta em produtos finais como etanol, dióxido de carbono e outros ácidos orgânicos.³³

Os processos fermentativos são capazes de produzir os isômeros dextrogiro (D (-) ácido láctico) ou levogiro (L (+) ácido láctico). As enzimas L(+) lactato desidrogenase ou D(-) lactato desidrogenase (nLDH) nas células bacterianas são as responsáveis pela produção dos enantiômeros. Quando há somente um enantiômero obtido no processo fermentativo, a via é denominada como homofermentativa e se há mais de um produto gerado na bioconversão, a via é denominada heterofermentativa.³⁴

A Figura 6 demonstra as vias catabólicas de glicose em bactérias lácticas. O ácido láctico é o produto da homofermentação, em que o piruvato é reduzido e convertido a lactato. Na via heterofermentativa, outros compostos são obtidos a partir da glicose: lactato, dióxido de carbono, etanol e acetato. Os parâmetros da fermentação são fatores determinantes para induzir a produção de

compostos de interesse, dentre as condições que podem ser alteradas estão a concentração do substrato, variações no pH e temperatura de fermentação.³⁴

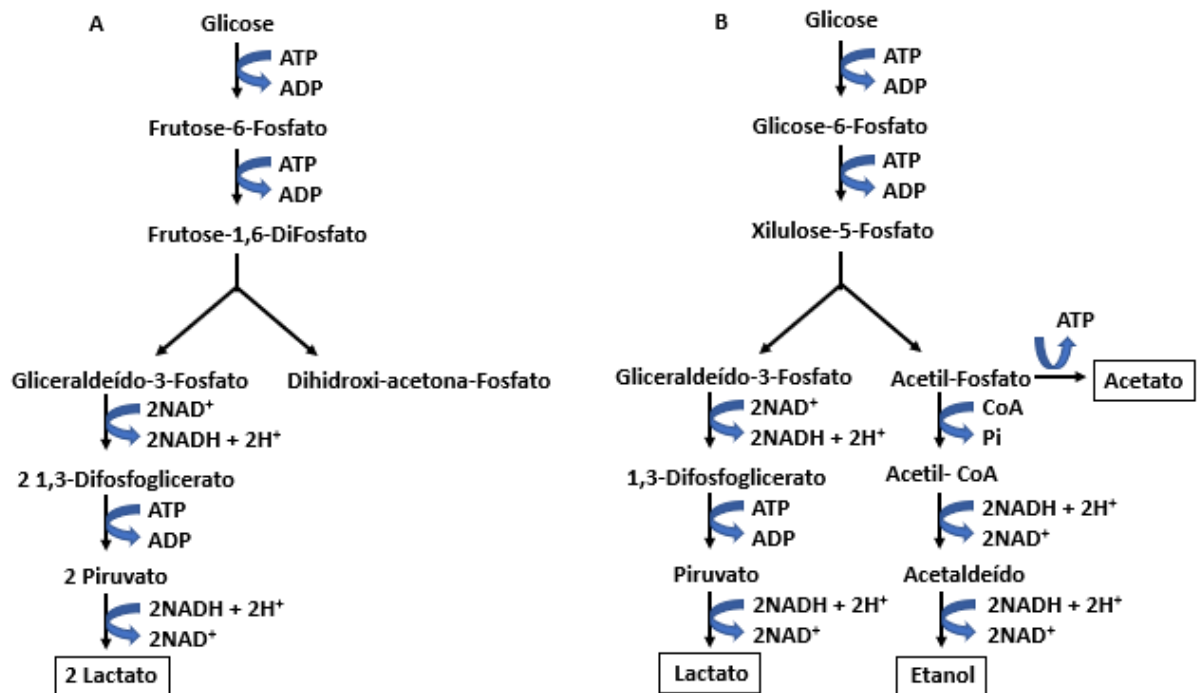


Figura 6 - Vias catabólicas das bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) (Modificado de Hofvendahl e Hägerdal³⁴).

A lactose é um dissacarídeo utilizado pelas bactérias lácticas no seu metabolismo. A sua absorção é facilitada pela presença de permeases (proteínas transportadoras localizadas na membrana plasmática) nestas bactérias. A molécula de lactose é clivada produzindo galactose e glicose, que seguirá sua via catabólica. A galactose sofre uma fosforilação podendo seguir o metabolismo da glicose.³⁵ A Figura 7 exemplifica via catabólica da lactose.

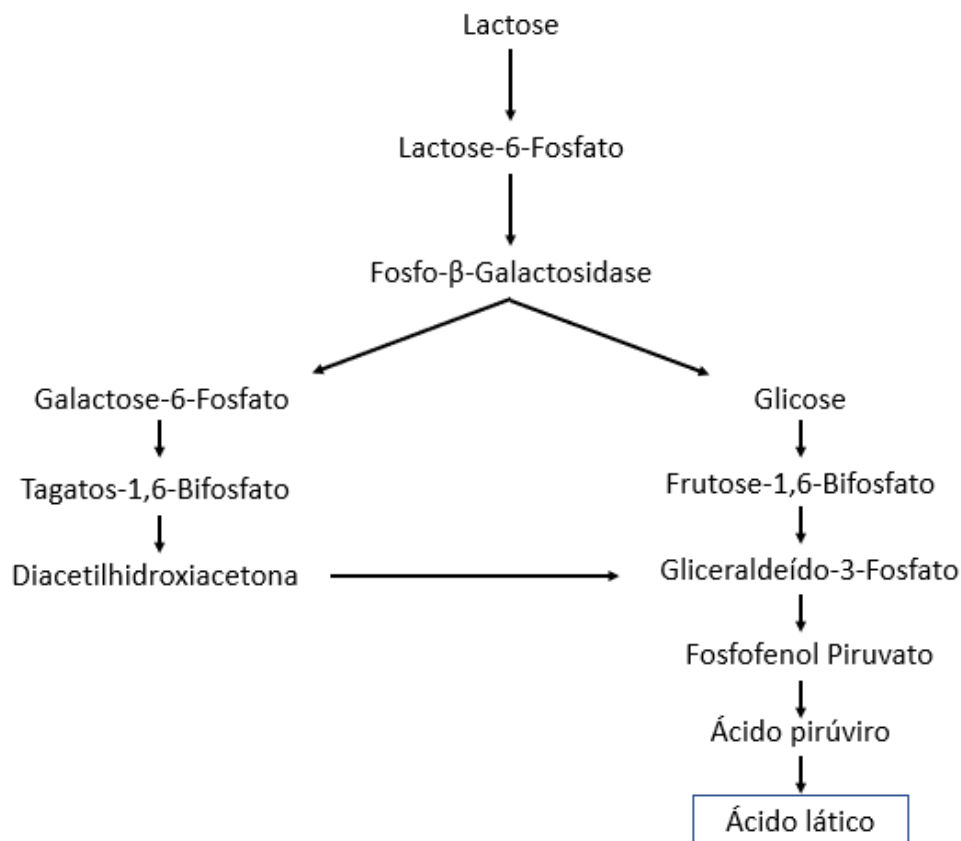


Figura 7 - Metabolismo da lactose (Adaptado de Forsythe³⁵).

Tango³⁶ relatou que 10 moléculas de lactose podem produzir 27 moléculas de ácido láctico em condições anaeróbicas. Portanto, o rendimento estequiométrico teórico para o ácido láctico é aproximadamente 0,71 grama de ácido láctico por grama de lactose. O que não for usado para a conversão de ácido láctico é convertido a dióxido de carbono, água ou é usado para o crescimento bacteriano.

Além da glicose e da lactose, açúcares como a frutose, manose, sacarose, maltose e pentoses também são metabolizadas pelas bactérias lácticas, podendo ser usados como fonte de carbono para o crescimento e bioconversão de outros compostos químicos.³⁵ A Tabela 1 indica exemplos de produção de ácido láctico a partir de alguns açúcares, com base na literatura.

Tabela 1 - Produção de ácido láctico via fermentação de diversas fontes.

Microrganismo	Substrato	Concentração de Ácido láctico (g/L)	Rendimento (g/g)	Referências
<i>Lactococcus lactis subs lactis</i>	Glicose	35,0	0,45	Cock ³⁷
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	33,73	0,88	Panesar ³⁸
<i>Enterococcus faecium</i>	Glicose	18,0	0,90	Pessione ³⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	Frutose	18,0	0,90	Pessione ³⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	Celobiose	13,5	0,71	Pessione ³⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	Xilose	4,5	0,27	Pessione ³⁹
<i>Lactobacillus</i> sp. TERI-D3	Sacarose	19,4	0,86	Verma ⁴⁰
<i>Lactobacillus</i> sp. TERI-D3	Galactose	15,8	0,80	Verma ⁴⁰
<i>Lactobacillus</i> sp. TERI-D3	Lactose	18,1	0,90	Verma ⁴⁰
<i>Lactobacillus</i> sp. TERI-D3	Glicose	17,5	0,90	Verma ⁴⁰
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Glicose	20,0	0,68	Nagarajan ⁴¹
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	Bagaço de cana de açúcar hidrolisado (xilose e glicose)	65,0	0,93	Wischral ⁴²
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Caldo de cana (sacarose, glicose, frutose)	113,0	0,34	Oliveira ⁴³
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Melaço de cana	84,2	0,89	Saavedra ⁴⁴
<i>Lactobacillus casei</i> Ke11	Sacarose	175,4	0,95	Oliveira ⁴⁵
<i>Lactobacillus casei</i>	Melaço de cana (Glicose e frutose)	83,0	0,57	Vidra ⁴⁶
<i>Lactobacillus</i> sp. MKT878	Melaço de cana (Glicose e frutose)	68,0	0,76	Vidra ⁴⁶
<i>Bacillus coagulans</i> DSM2314	Bagaço de cana de açúcar tratado (xilose e glicose)	76,7	0,78	Alves ⁴⁷
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	Hidrolisado de malte com vinhaça (Glicose)	48,02	0,87	Radosavljević ⁴⁸

As fermentações podem ocorrer em diferentes ambientes e escalas. Pode-se realizar fermentações em escalas laboratoriais utilizando pequenos volumes. Em escala piloto e industrial, são utilizados biorreatores ou fermentadores, que consistem em reatores químicos onde ocorrem reações.⁴⁹ Tais equipamentos possibilitam maior controle dos parâmetros como temperatura, agitação e pH no decorrer do processo.

Além disto, outros parâmetros também podem ser estudados/empregados quando são utilizados os sistemas em reatores. Tais como: concentração do substrato e produto. No processo contínuo de fermentação, que possui alimentação contínua de meio de cultura a vazão constante, mantendo o volume de reação constante, devido a retirada contínua

de meio fermentado. No processo descontínuo (batelada) não há adição do meio de cultura e o inóculo é realizado no fermentador esterilizado, podendo haver adição de oxigênio ou nitrogênio, e ácido e bases para controle de pH.⁴⁹

Aso e colaboradores (2019) observaram que o reciclo de células era uma ferramenta que melhorava a produção de ácido lático. Com este método, o processo resultou em maiores valores de produtividade. A produção de ácido lático aumentou de 0,6 para 5 g/L com o reciclo de células.⁵⁰

O uso de resíduos é uma alternativa economicamente viável para a produção de diversos produtos de maior valor agregado, uma vez que além de diminuir a geração de resíduos, contribuem positivamente para a economia do processo.^{51,52}

Glicerol é um resíduo do biodiesel que pode ser usado como fonte de carbono em processos fermentativos. O biodiesel é um combustível produzido a partir de matéria-prima renovável e vem sendo utilizado em adição ou substituição aos combustíveis provenientes de fontes não renováveis. A transesterificação de triglicerídeos com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador homogêneo ou heterogêneo é a principal forma de obtenção de biodiesel. O produto principal obtido são ésteres de ácidos graxos, os quais são utilizados como biocombustível, e o glicerol que também é conhecido como glicerina (termo comumente associado ao glicerol contendo impurezas).⁵¹

Devido à natureza reduzida da molécula de glicerol, os microrganismos são capazes de convertê-la a uma série de metabólitos, com rendimentos semelhantes aos obtidos com o metabolismo de açúcares, uma vez que o glicerol tem a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática por difusão passiva. A principal desvantagem dessa difusão é que o crescimento celular depende de baixas concentrações de substrato para que a fonte de carbono não seja tóxica ao microrganismo. Uma vez dentro da célula, o glicerol intracelular permanece até que seja posteriormente metabolizado.^{51,53}

O gargalo para a utilização do glicerol bruto na produção de químicos em processos fermentativos é a obtenção de microrganismos tolerantes aos compostos inibitórios da glicerina, tais como o metanol residual. A bioprospecção de microrganismos é uma alternativa para encontrar cepas capazes de metabolizar o glicerol.⁵⁴ A Figura 8 exemplifica as vias metabólicas a partir do glicerol e seus possíveis produtos.

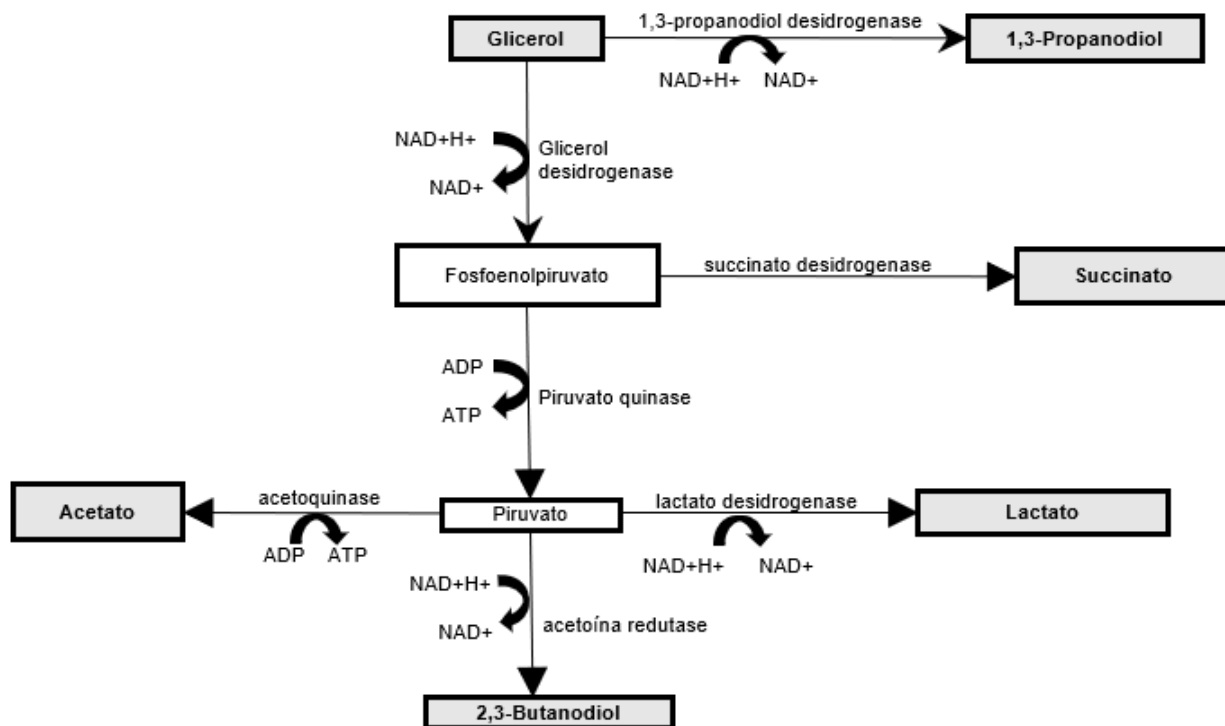


Figura 8 - Possíveis vias metabólicas a partir de glicerol (Fonte: Adaptado de Da Silva⁵¹).

Vários microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol em meios anaeróbicos e aeróbicos com glicerol como única fonte de carbono e energia gerando diversos metabólitos secundários de interesse. Entre os gêneros de microrganismos mais explorados capazes de metabolizar o glicerol estão *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter* e *Lactobacillus*. O desenvolvimento e aprimoramento da engenharia genética e o estudo intensivo do potencial metabólico dos microrganismos têm permitido que microrganismos geneticamente modificados (OGM) potencializem a bioconversão do glicerol bruto.⁵¹

2.4 Microrganismos empregados na produção de ácido láctico neste estudo

As bactérias lácticas são bactérias gram-positivas que usam carboidratos como única ou principal fonte de carbono.⁵⁵ Tais microrganismos são geralmente cocos ou bastonetes, e têm forte tolerância a pH ácido. Os gêneros mais utilizados em fermentações são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*.⁵⁶

Dentre as características das bactérias lácticas, podemos citar a capacidade de decompor macromoleculares, incluindo polissacarídeos, podendo produzir ácido láctico, outros ácidos orgânicos e vitaminas. Sendo assim, as bactérias lácticas têm mostrado diversas aplicações.⁵⁷ Além do ácido láctico estas bactérias também são capazes de produzir outras moléculas como: acetato, propionato, formato e succinato.⁵⁸

Dentre as vitaminas produzidas por bactérias lácticas estão o ácido fólico (uma das vitaminas do grupo B) e a menaquinona (vitamina K2). Park e colaboradores⁵⁹ utilizaram a bactéria *Lactobacillus plantarum* em fermentações e obtiveram 9,03 µg/mL de ácido fólico após 24 h de incubação em meio MRS.

Liu e colaboradores (2019) realizaram fermentações aeróbicas com *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 e o microrganismo foi capaz de sintetizar vitamina K2 (menaquinona), utilizando frutose como fonte de carbono.⁶⁰

2.4.1 *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* pertence ao grupo de bactérias lácticas e são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos. Possuem grande importância no que se refere à fermentação ou deterioração de alimentos. São microrganismos onipresentes, mas têm um habitat predominante no trato gastrointestinal de humanos e animais.^{61,62}

Tais bactérias contribuem para a maturação de queijos e desenvolvimento de características organolépticas como aroma de queijos, sendo normalmente utilizadas como culturas iniciadoras.⁶²

Além de serem encontradas em animais, podem também ser encontradas em solos, águas e alimentos, principalmente em laticínios. A maior parte das linhagens são homofermentativas, produzindo ácido láctico ao consumir glicose. *Enterococcus* isolados de leite têm capacidade de inibir outras bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas.⁶¹

Pessione e colaboradores³⁹ cultivaram a bactéria *E. faecium* LLAA-1 em diferentes meios de cultura suplementados com glicose, frutose, celobiose e xilose para avaliar a capacidade de metabolizá-los em ácido láctico. O

crescimento em condições aeróbicas melhorou a produção de ácido láctico com frutose. A maior produção de ácido láctico (aproximadamente 200 mM) foi obtida usando glicose e frutose como substrato. Utilizando meio M17, a conversão a ácido láctico foi de aproximadamente 90% do valor teórico máximo para glicose e frutose, cerca de 70% para celobiose e apenas cerca de 22% para xilose.

Murakami e colaboradores⁶³ utilizaram *Enterococcus faecalis* para produzir ácido láctico a partir de glicerol na presença de ácido acético, a cromatografia gasosa indicou que o ácido acético foi convertido em etanol durante a fermentação láctica do glicerol. A produção em batelada alimentada com 30 g/L de glicerol e 10 g/L de ácido acético apresentou o melhor desempenho, produzindo 55,3 g/L de ácido láctico, rendimento de 0,991 mol_{ácido láctico}/mol_{glicerol}.

Yuan e colaboradores⁶⁴ relataram que ácido láctico foi obtido a partir de fermentação com sólidos de 20 a 35% de lascas de madeira compensada em escala de planta piloto usando *E. faecalis* a 42 °C. A fermentação em biorreator de 100 L, produziu aproximadamente 65,40 g/L de ácido láctico com 1,21 g/L.h de produtividade com este resíduo.

Ćirić e colaboradores⁶⁵ utilizaram o glicerol residual obtido da produção de biodiesel como fonte de carbono de fermentações com a bactéria *E. faecalis* MK3-10A, alcançando uma produção de até 15,8 g/L de ácido láctico.

Há menos trabalhos utilizando a *E. durans* para a produção de ácido láctico via fermentação. Hassan e colaboradores⁶⁶ relataram que produziram ácido láctico a partir da fermentação com *E. durans* usando cascas de banana como substrato. Foi constatado que o aumento de sólidos melhorava a produção de ácido láctico, chegando a 28,8 g/L, sem necessidade de adicionar suplementos de nutrientes.

Hayat e colaboradores⁶⁷ abordaram a atividade antifúngica da *E. durans* contra dois fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. A atividade antifúngica deste microrganismo foi atribuída à capacidade de produção da enzima gelatinase.

O gênero *Enterococcus* possui diversas espécies que são capazes de obter produtos de interesse tecnológico já relatados na literatura. A *E. durans* tem potencial para produção de ácido láctico em grande escala ainda pouco estudado. Estudos explorando diferentes fontes de carbono e parâmetros de fermentação possibilitam a otimização da formação do produto de interesse.

2.4.2 *Weissella*

As bactérias atribuídas ao gênero *Weissella* são Gram-positivas, não formadoras de esporos com morfologia na forma de cocos ou bastonete e pertencem ao grupo das bactérias lácticas. Tais microrganismos são heterofermentativos, produzindo ácido láctico e ácido acético como principais produtos finais do metabolismo de carboidratos. São capazes de sobreviver em pH entre 3,9 e 9,0 e as temperaturas ideais variam entre 25 a 40 °C.⁶⁸

São conhecidas 19 espécies de *Weissella* que foram isoladas, principalmente, da pele e do leite de animais, e de plantas e vegetais. Cepas específicas de *Weissella* também estão recebendo atenção como potenciais probióticos, como por exemplo a *W. cibaria*.⁶⁸ Algumas cepas mostram atividade antagônica contra patógenos devido à produção de vários compostos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio.⁶⁹

Kariyawasam e colaboradores⁷⁰ utilizaram a cepa *W. cibaria* D30 como cultura adjunta na fabricação de queijo cottage e a bactéria foi capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* garantindo a segurança microbiana dos queijos.

Teixeira e colaboradores⁷¹ isolaram cepas de *Weissella* spp. a partir de diferentes alimentos e caracterizaram-nas com base em seus perfis genéticos e potencial tecnológico. A *W. paramesenteroides* apresentou alta capacidade de acidificação devido a produção de ácido láctico não quantificada, além de produzir diacetil. O diacetil é um composto volátil gerado como produto final da conversão do citrato a piruvato, o que confere um aroma amanteigado ao leite fermentado.

Outra aplicação que a bactéria apresenta foi estudada por Li e colaboradores⁷², em que cepa *Weissella viridescens* ZY-6 foi utilizada para remover íons de cádmio de solução aquosa, investigando seu uso para a remoção de Cd²⁺ de sucos de frutas e vegetais. Os resultados mostraram que a taxa de remoção diminuiu na presença de outros cátions metálicos como Mg²⁺,

Mn²⁺ e Fe²⁺. Os experimentos indicaram que o Cd²⁺ foi adsorvido principalmente na parede celular bacteriana, viabilizando o uso da *W. viridescens* ZY-6 p como um bioadsorvente de cádmio.

Carlosama e colaboradores⁷³ realizaram fermentações suplementadas com os resíduos em pó de abacaxi e noz inca com *Weissella cibaria* avaliando a influência da temperatura, pH e agitação. A produção de ácido láctico variou com os parâmetros, sendo a mínima 14,40 g/L e a máxima 44,50 g/L. O pH 5,5, 100 rpm e 36 °C de temperatura foram as condições de maior produção de ácido láctico.

Ahn e colaboradores⁷⁴ avaliaram a atividade antibacterianas da *Weissella* sp. contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os resultados indicaram que as cepas isoladas *Weissella* sp. S3 produziu uma agente bacteriocina e que poderia ser usada no desenvolvimento de bioconservantes para alimentos.

Nagarajan e colaboradores⁴¹ relataram que por meio de fermentações em batelada, utilizando glicose como fonte de carbono a 40 g/L no meio com algas marinhas hidrolisadas, produziram 20 g/L de ácido láctico com *W. paramesenteroides*, consumindo 88% da glicose e rendimento de 0,68 g/g. *Weissella* sp. e *Weissella cibaria* produziram 17,48 e 18,34 g/L de ácido láctico, respectivamente.

Bactérias do gênero *Weissella* são retratadas na literatura devido suas propriedades de serem bioconservantes, bioadsorvente de metais e por produzirem ácido láctico. A *Weissella thailandensis* tem potencial para ser mais estudada, a fim de maximizar a produção de ácido láctico, bem como avaliar suas propriedades como bioadsorventes e bioconservantes.

2.4.3 *Lactococcus*

Schleifer e colaboradores reclassificaram algumas espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* em 1985 e propuseram um novo gênero: o *Lactococcus*. Tal gênero é composto por cinco espécies: *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* e *L. Lactis*.⁷⁵

O gênero *Lactococcus* são cocos Gram-positivos pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, apresentam formato ovóide com cerca de 0,5 a 1,5 µm de

comprimento e temperatura ótima de crescimento em 30 °C. São anaeróbicas facultativas, não produzem esporos e possuem metabolismo homolático, ou seja, o L(+) ácido láctico é o único produto resultante da fermentação da glicose. Podem ser encontrados em plantas, animais e leite cru.⁷⁶

A espécie *L. lactis* é amplamente utilizada como culturas iniciadoras para a produção de produtos lácteos fermentados, como queijos, manteigas e coalhadas, tendo como principal função o desenvolvimento de atividades acidificantes, capaz de fornecer textura, sabor e aroma, além de atuar como bioconservantes, por meio da produção de ácidos orgânicos antimicrobianos.⁷⁶

Cock e Stouvenel³⁷ fizeram experimentos utilizando a *L. lactis subs lactis* com e sem controle de pH e concentrações de glicose variando entre 20 e 110 g/L. Foi relatado que na fermentação em batelada a 32 °C, com 60 g/L de glicose e controle de pH em 6,0, obtiveram 32,3 g/L de ácido láctico. A maior conversão de glicose foi alcançada em baixas concentrações de substrato, indicando que possivelmente o microrganismo sofre inibição pelo substrato. Sem controle de pH durante a fermentação, a produção de ácido láctico foi de 13,7 g/L.

Rodríguez e colaboradores⁷⁷ obtiveram resultados semelhantes usando a *L. lactis*, em biorreator e controle de pH em 6,8 com 25,5 g/L de glicose em meio MRS. Em 6 horas de fermentação a 30 °C houve total consumo de glicose e produção de ácido láctico de 23 g/L. Sem o controle de pH o consumo de glicose diminuiu e a produção de ácido láctico foi de 7,8 g/L em 30 horas de fermentação.

Pessione e colaboradores³⁹ avaliaram a produção de ácido láctico com diferentes cepas de *L. lactis* utilizando M17 comercial, com 5 g/L de lactose como fonte de carbono. A cepa com melhor produção de ácido láctico foi a *Lactococcus lactis cremoris* 88A, alcançando aproximadamente 27,17 mM.

Bolocan e colaboradores⁷⁸ investigaram a capacidade de bactérias produtoras de bacteriocinas em prevenir a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* na produção de cogumelos. Foi detectada a produção de nisina Z por isolados de *Lactococcus lactis*, que preveniu a formação do biofilme, bem como reduziu biofilmes já formados.

Souza e colaboradores⁷⁹ utilizaram a bactéria *L. lactis* e produziram 23,4

g/L de ácido láctico utilizando glicose como fonte de carbono em 16 horas de fermentação a 40 °C com controle de pH em 5,0. Tal valor foi 47,4% maior do que a produção com as mesmas condições sem controle de pH.

Mecherfi e colaboradores⁸⁰ exploraram a capacidade promissora da *Lactococcus lactis* para reduzir a alergenicidade do trigo devido ao seu sistema proteolítico. A análise proteômica mostrou que a *L. lactis* LLGKC18 causou degradação das principais proteínas alergênicas do glúten: gliadinas, gluteninas.

Bactérias do gênero *Lactococcus* são amplamente relatadas em estudos científicos com diversas aplicações. A *Lactococcus lactis* além de ser utilizada para produção de ácido láctico, sua capacidade de produção de bacteriocinas e de degradar proteínas alergênicas possibilita estudos promissores.

2.4.4 *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* é composto por bactérias lácticas amplamente descritas como probióticos. Possuem forma de cocos, são Gram-positivas, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. Existem muitas cepas de *Pediococcus* que produzem pediocina, uma eficaz bacteriocina.⁸¹

Pediococcus pentosaceus e *Pediococcus acidilactici* são as principais espécies utilizadas na produção de pediocina, processos de fermentação como co-cultura para evitar a contaminação, e suplementos probióticos para animais e humanos.⁸¹

Juodeikiene e colaboradores⁸² avaliaram a bioconversão de subprodutos agroindustriais ricos em celulose, como farelo de trigo, grãos de destilaria com sólidos e grãos de cerveja em ácido láctico usando a cepa *Pediococcus acidilactici* KTU05–7, chegando a produzir 20,18 g/kg de ácido láctico em 48 horas de fermentação sólida.

Othman e colaboradores⁸³ mostraram que a adição *in situ* de resina de troca aniônica no meio fermentativo foi capaz de reduzir o efeito inibitório do ácido láctico no crescimento da *P. acidilactici*. Entre as cinco resinas de troca aniônica testadas, a Amberlite IRA 67 na concentração de carregamento de 10 g/L removeu mais ácido láctico do meio, melhorando o crescimento da *P. acidilactici* e produção de ácido láctico. A produção máxima de ácido láctico foi de

14,32 g/L, com rendimento de aproximadamente 1,23 g/g_{glicose} e produtividade de 0,59 g/L.h.

Zhang e colaboradores⁸⁴ utilizaram lixo doméstico orgânico selecionado para a produção de ácido láctico com *Pediococcus acidilactici*. A temperatura ótima para a fermentação foi 32,4 °C e pH 8,0. A produção máxima de ácido láctico foi 31,9 g/L, com rendimento de 0,742 g/g_{açúcar}. Glicose e xilose foram os açúcares presentes no substrato usados na bioconversão.

Das e colaboradores⁸⁵ exploraram os potenciais antibacterianos e antifúngicos da *Pediococcus acidilactici* LAB001 contra bactérias e fungos deteriorantes dos alimentos. A maior quantidade de bacteriocina foi produzida em meio TGE em 24 horas a 30 °C. A exposição de bacteriocina por 1 hora causou a inibição de cepas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* MTCC98.

Qiu e colaboradores⁸⁶ utilizaram uma cepa de *Pediococcus acidilactici* modificadas para serem capazes de consumir a xilose e produzir (L)-ácido láctico. A capacidade de consumo de xilose pela cepa modificada foi otimizada por evolução adaptativa. A cepa modificada foi submetida a fermentação sob alta carga de sólidos de palha de trigo, produzindo 130,8 ± 1,6 g/L de ácido L-láctico, produtividade 1,82 ± 0,0 g/L.h e conversão de 94,9 ± 0,0% na condição otimizada.

Campos e colaboradores⁸⁷ investigaram a produção de ácido láctico a partir de manose por duas cepas modificadas: *Pediococcus acidilactici* TY112 produtora de ácido L-láctico e ZP26 produtora de ácido D-láctico. As duas cepas foram capazes de converter eficientemente manose nos enantiômeros L-lactato (14 g/L) e D-lactato (12 g/L), com pureza óptica maiores que 99%. As cepas estudadas foram capazes de produzir ácido láctico a partir de manose com rendimentos próximos de 90%. Foi observado também que a taxa de consumo de manose é menor do que o consumo de glicose para as bactérias modificadas.

Os estudos com bactérias do gênero *Pediococcus* são voltados para a produção de pediocina ou ácido láctico. A *Pediococcus acidilactici* foi relatada como produtora de ácido láctico a partir de diversos resíduos e os parâmetros de

fermentação para maximizar a produção de ácido láctico já são descritos na literatura.

2.5 Purificação do ácido láctico

O ácido láctico, cítrico e succínico são ácidos carboxílicos amplamente produzidos por processo fermentativo. Para recuperar estes ácidos dos meios fermentativos, via de regra a primeira etapa é realizada a remoção das células por centrifugação. Em seguida, é realizada a etapa de recuperação primária, que pode ser o emprego da extração líquido-líquido, adsorção ou precipitação. Por fim, a purificação do ácido requer uma etapa de evaporação da água, podendo ser por destilação ou cristalização.⁵

Embora a diferença entre o ponto de ebulição do ácido láctico e da água seja relativamente grande, não é trivial obter ácido láctico cristalino puro. Isso ocorre pela alta afinidade entre a água e o ácido láctico.⁸⁸

López-Garzón e Straathof⁵ definiram as etapas do processo de recuperação de ácidos carboxílicos em escala industrial em 6 passos:

1. Clarificação – consiste na remoção de partículas grandes, principalmente células e seus detritos, utilizando filtração ou centrifugação.
2. Recuperação primária – tem como objetivo separar o produto da solução aquosa, por extração ou adsorção, principalmente.
3. Remoção do contra-íon – etapa opcional que substitui o cátion do carboxilato por H^+ para obter o ácido carboxílico.
4. Concentração / purificação – consiste na remoção do solvente ou captura do ácido carboxílico.
5. Aprimoramento – etapa opcional de transformação do ácido carboxílico purificado em derivados químicos.
6. Formulação – adaptação do produto às necessidades de armazenamento final.

No processo de recuperação tradicional do ácido láctico, o caldo de

fermentação é primeiro neutralizado por CaCO_3 , precipitando o lactato de cálcio que pode ser filtrado. Em seguida, ao ser acidificado com ácido sulfúrico, obtém-se o ácido láctico e CaSO_4 , que é insolúvel e pode ser removido por filtração. Esse processo produz sulfato de cálcio como subproduto. O sulfato de cálcio impacta negativamente no processo de filtração, já que sua remoção completa não é trivial, resultando em alto custo e geração de resíduos. Há uma crescente procura por métodos alternativos para a purificação que minimize os impactos ambientais. Entre eles estão: troca-iônica, destilação a vácuo, esterificação, métodos de hidrólise, separação por membrana (osmose inversa).⁵

Os avanços nas tecnologias das membranas viabilizaram seu uso para separação e purificação de ácido láctico do meio fermentativo. Houve uma tendência em aprofundar os estudos nos processos de separação por membrana, dado que costumam ser mais eficientes quando comparados aos processos de separação química.⁵

O caldo de fermentação para produção de ácido láctico contém lactato, resíduos de lactose ou de outras fontes de carbono, células microbianas e outros resíduos de fermentação. As células e os resíduos de grande peso molecular podem ser removidos por microfiltração ou ultrafiltração. As membranas de nanofiltração, com peso molecular de corte de 100-400 Da, podem reter 97-100% da lactose para obter um meio aquoso contendo apenas ácido láctico e água. Com a separação por osmose reversa, o ácido láctico do meio aquoso obtido na nanofiltração pode ser ainda mais concentrado, reduzindo o custo do processo de evaporação.⁸⁹

Outra técnica que pode ser utilizada na purificação do ácido láctico é a eletrodialise, que remove íons do caldo de fermentação sob a força motriz de um campo elétrico gerado pelo empilhamento de membranas de troca catiônica e aniônica. Primeiramente, a eletrodialise de dessalinização é aplicada para recuperar o lactato. Em seguida, a eletrodialise usando membranas biopolares é aplicada para a acidificação do lactato, por meio das camadas de troca aniônica e catiônica.⁵

Em virtude da alta seletividade, os processos de purificação de ácido láctico utilizando membranas podem assegurar elevados níveis de purificação e separação. Outra vantagem é que as membranas podem ser integradas aos fermentadores, fornecendo produção e purificação simultaneamente. A principal desvantagem é o elevado custo.⁹⁰

Alvarado-Morales e colaboradores⁹¹ investigaram dois processos para recuperar ácido láctico obtido via fermentação de biocelulose. Etapas de pré-purificação, como centrifugação, ultrafiltração e o carvão ativado foram utilizadas nos dois métodos investigados. Primeiramente, foram realizados experimentos com troca iônica e destilação a vácuo, resultando na recuperação de 75,7% do ácido láctico e pureza de 72,5%. No segundo método, uma unidade de nanofiltração foi incluída após a etapa de pré-purificação, obtendo uma recuperação de 65,0% do ácido láctico, com 82,0% de pureza.

A destilação reativa também tem sido estudada como processo de separação promissor para a recuperação de ácido láctico. Esta técnica é aplicada a reações químicas reversíveis na fase líquida, em que o equilíbrio da reação limita a conversão de reagentes. A recuperação do ácido láctico consiste na sua esterificação com um álcool (metanol, etanol ou butanol). No caso da esterificação com etanol, há a formação de água e acetato de etila. O catalisador utilizado é o ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. A reação reversa indica a hidrólise do acetato de etila a ácido láctico na presença de um catalisador ácido.⁹²

Anbreen e colaboradores⁹³ realizaram a purificação do ácido láctico com uma coluna de destilação reativa baseada em recompressão de vapor. O processo consiste em duas etapas envolvendo a esterificação do ácido láctico bruto com metanol para produzir lactato de metila seguido da hidrólise do lactato de metila para produzir ácido láctico de alta pureza. A etapa de hidrólise foi realizada com uma coluna de destilação reativa baseada em recompressão de vapor, otimizando o processo com destilação reativa simples.

Liu e colaboradores⁵ realizaram a purificação do ácido xilônico por precipitação de etanol. A técnica de purificação do ácido xilônico utilizada no trabalho de Liu e colaboradores consistia numa primeira etapa de clarificação

com carvão ativo, seguida pela precipitação a frio com etanol, na proporção 3:1 (v/v).⁹⁴ Sabendo que o lactato é insolúvel em etanol, a técnica usada para o ácido xilônico poderia servir para a purificação do ácido láctico obtido por fermentação. A correção do pH do meio fermentativo para 7,0 acarretaria em apenas ácido láctico desprotonado (lactato) como espécie disponível no meio.

Coelho e colaboradores⁹⁵ realizaram experimentos de purificação e recuperação de ácido láctico usando dupla filtração com carvão e celite, seguida de uma coluna de troca catiônica. Ao final, uma etapa de purificação adicional (extração com éter etílico) foi necessária para viabilizar a polimerização do ácido láctico obtido. Tal método proporcionou a recuperação do ácido láctico com 80 % de pureza. As fermentações foram realizadas utilizando 100 g/L de açúcar cristalizado, e NH₄OH como agente neutralizante. A produção máxima de L-ácido láctico por *Bacillus coagulans* arr4 foi de 75,26 g/L em 24 horas, com 2,76 g/L de açúcar residual.

Ahmad e colaboradores⁹⁶ utilizaram as resinas disponíveis comercialmente (Amberlite IRI-67 e IR-120) para recuperar ácido láctico obtido via fermentação do resíduo de polpa de tâmara. O efeito do pH e concentração inicial de ácido láctico foram avaliados na purificação. A capacidade máxima de adsorção do ácido láctico foi de 150 mg/g com a resina aniônica em pH = 3,0. Em coluna de leito fixo, 91% de recuperação de ácido láctico foi obtida com 94,6% de pureza óptica. A dessorção e regeneração da resina de troca aniônica com HCl 1 M como eluente resultou em recuperação de 98,2% do ácido láctico.

Zaini e colaboradores⁹⁷ também avaliaram resinas (Amberlite IRA 120 para acidificação e IRA 67 para adsorção de ácido láctico) e recuperaram cerca de 80% do ácido láctico, com pureza de 91,8%.

Luongo e colaboradores⁹⁸ estudaram a adsorção de ácido láctico e dessorção usando resinas (Amberlite IRA-900, IRA-400, IRA- 96 e IRA-67) em reatores descontínuos e em reatores de leito fixo. Com a utilização da resina IRA-67 foi possível obter um melhor desempenho ao longo de 13 ciclos, mostrando uma recuperação de 97%, juntamente com uma capacidade de adsorção máxima de 134,2 mg/g.

A troca iônica é um processo de purificação amplamente utilizado na indústria química e bioquímica. Tal técnica consiste na interação entre íons presentes na solução a ser purificada e íons fixos em uma matriz sólida (resinas de troca iônica). As resinas possuem grupos funcionais que interagem seletivamente com os íons da solução, permitindo sua remoção e, conseqüentemente, sua purificação. Alguns fatores físico-químicos, como área superficial do adsorvente, características estruturais e morfológicas, pH, temperatura e tempo de contato, podem influenciar a adsorção.⁹⁹

2.6 Modificação do ácido láctico

A síntese de polímeros funcionalizados pode ocorrer pela polimerização ou copolimerização de um ou vários monômeros funcionais. O polímero funcionalizado origina-se de um ou vários monômeros reativos. Pode-se realizar mudanças em monômeros comuns para incorporar em suas estruturas novos sítios ativos mais reagentes, possibilitando novas formas de polimerização.¹⁰⁰

A modificação do ácido láctico tem como objetivo desenvolver novas moléculas com potencial para serem usadas como monômeros de novos polímeros. Tendo em vista as inúmeras aplicações do ácido láctico na biomedicina, o desenvolvimento de polímeros utilizando o ácido láctico modificado desempenham um papel de interesse na área científica. A expectativa é a síntese de materiais poliméricos biodegradáveis, biocompatíveis, proveniente de fontes renováveis com propriedades semelhantes aos polímeros fósseis. Com a mudança na estrutura do ácido láctico, ele pode se polimerizar por métodos mais brandos e simples do que policondensação direta, por exemplo.¹⁰¹

Barroso e colaboradores usaram a esterificação do ácido láctico com ácido acrílico para sintetizar um monômero capaz de se polimerizar por adição através da insaturação. A Figura 9 mostra a reação de esterificação para obter o ácido láctico modificado. Em seguida, foi realizada uma copolimerização do monômero com metilmetacrilato (MMA) via polimerização em miniemulsão para obter um novo material polimérico.¹⁰¹

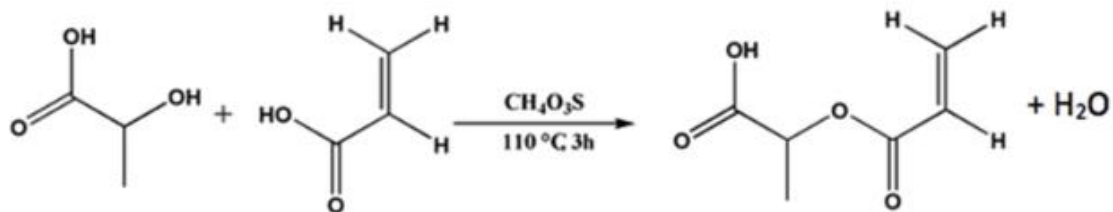


Figura 9 - Reação de esterificação para modificação do ácido láctico com ácido acrílico catalisada com ácido metanossulfônico.¹⁰¹

Outra forma de modificação que o ácido láctico pode sofrer é a Esterificação de Steglich, utilizando o agente de acoplamento de amida N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e o organocatalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP). A Figura 10 exemplifica tal reação, que é amplamente utilizada com ácidos carboxílicos e tem como vantagem a não utilização da hidroquinona.¹⁰²

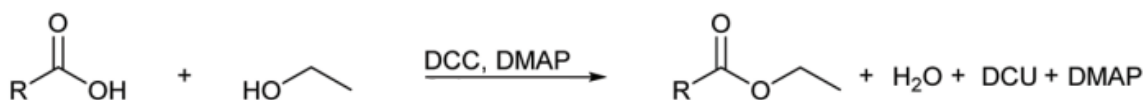


Figura 10 – Esquema da reação de esterificação de Steglich.¹⁰²

2.7 Polimerização

Polímeros são macromoléculas obtidas da repetição de moléculas individuais, os monômeros. A polimerização é a reação em que monômeros reagem produzindo o material polimérico de elevada massa molar.¹⁰³

As aplicações e propriedades do material polimérico dependem do monômeros que o constituem e do processo de polimerização aplicado, uma vez que cada processo tem suas peculiaridades, resultando em diferentes aplicações do material polimérico final.¹⁰⁴

Os processos de polimerização podem ser realizados em fase homogênea (polimerização em massa e em solução) ou em fase heterogênea (suspensão, emulsão, miniemulsão, entre outras). A escolha do processo de polimerização é feita com base nas características desejadas para o produto final.¹⁰³

As polimerizações em cadeia podem ser iniciadas por radicais livres. Tais

reações são exotérmicas. Nas polimerizações em massa, por serem realizadas na ausência de solvente, há um aumento da viscosidade do meio reacional na polimerização em massa que desfavorece a dissipação do calor devido à limitação no mecanismo de transferência de calor, causando uma aceleração descontrolada da taxa de reação e até degradação do material formado.¹⁰³

A polimerização em solução utiliza um solvente que diminui a viscosidade do meio, facilitando a dissipação do calor e a transferência de massa. Apesar de apresentar vantagens quando comparado com o processo de polimerização em massa, a polimerização em solução também tem limitações, como baixas conversões e necessidade de remoção do solvente e monômero residual.¹⁰⁵

Nas polimerizações em meio heterogêneo, a fase contínua, imiscível com o monômero, é responsável pela troca de calor e dispersão apropriada da fase orgânica. Isto propicia o controle mais eficaz da temperatura durante a reação e com a diminuição da viscosidade do meio, mesmo com altas taxas de reação.^{105,106}

2.7.1 Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão é composta por uma fase orgânica (monômeros), surfactante, uma fase contínua e iniciador. Látex é o produto da polimerização em emulsão que consiste na dispersão estável das nanopartículas poliméricas na fase contínua.¹⁰³

Os surfactantes são moléculas orgânicas que apresentam em sua estrutura uma cadeia de natureza hidrofóbica, e uma terminação hidrofílica, que possibilita a interação com a fase orgânica dos monômeros e com a fase contínua aquosa simultaneamente. Quando o surfactante atinge a concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de surfactante se organizam de forma que as caudas hidrofóbicas fiquem voltadas para o interior da micela, e as extremidades hidrofílicas no exterior, formando as micelas. A estabilidade das microgotas (reservatório) de monômero é obtida pelas micelas.¹⁰⁶

Na polimerização em emulsão, a formação das partículas é denominada de nucleação. Tal fenômeno ocorre no interior das micelas inchadas pelo

monômero. O iniciador hidrossolúvel forma radicais na fase aquosa que reagirão com as moléculas de monômeros. O mecanismo de transferência de massa é responsável pela transferência dos monômeros para o interior das micelas, uma vez que o monômero apresenta pouca solubilidade pela fase aquosa. Ao reagir com o iniciador, os monômeros passam a formar cadeias, cada vez mais hidrofóbicas, tendendo a ser capturados pelas micelas. ^{103,106}

A polimerização em emulsão pode ser dividida em três etapas. A etapa I é a nucleação, que corresponde ao aumento do número de partículas e da taxa de polimerização. Polímeros são formados no interior das micelas, causando o consumo dos monômeros. ¹⁰³

Na etapa II, o número de partículas permanece constante e os monômeros são incorporados à cadeia polimérica. Quando as gotas de monômero são consumidas o número de partículas se mantém constante e aumentam em tamanho. O aumento da dimensão das partículas causa a dissolução das micelas residuais não nucleadas. ¹⁰³

Por fim, a etapa III consiste no crescimento da cadeia polimérica, causado exclusivamente pela incorporação dos monômeros residuais. Se todo monômero for consumido, a máxima conversão é obtida. ¹⁰³ A Figura 11 exemplifica tais etapas.

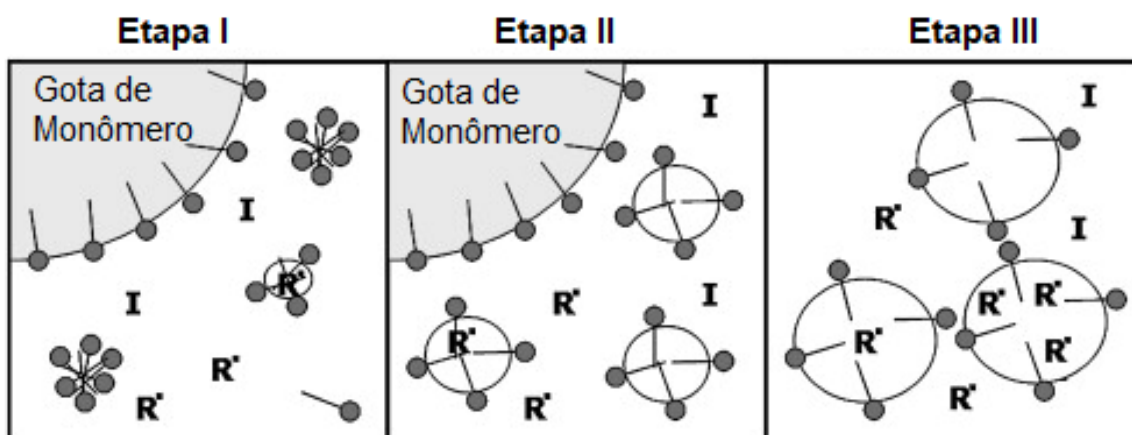


Figura 11 - Os três intervalos de uma reação de polimerização em emulsão, indicando as moléculas de surfactante (cauda hidrofóbica e extremidade hidrofílica), gotas de monômero, micelas (grupos de surfactante na Etapa I),

radicais (R^{\cdot}), iniciador (I) e partículas de látex estabilizadas com surfactante. (Fonte: Adaptado de Thickett e Gilbert¹⁰⁷).

2.7.2 Polimerização em miniemulsão

No processo de polimerização em miniemulsão, além de monômero, água e surfactante, há adição de um coestabilizador, para promover a dispersão uniforme da fase orgânica na fase aquosa em nanogotas que serão transformadas em partículas poliméricas que variam de 50 nm a 400 nm. São nestas nanogotas que a polimerização ocorre.^{100,103,105}

Para este tipo de polimerização, a concentração de surfactantes é menor que a CMC, uma vez que as reações não necessitam das micelas para ocorrerem. Diferentemente da polimerização em emulsão, os iniciadores não são necessariamente hidrossolúveis, podendo ser organossolúveis. A elevada energia mecânica proveniente do cisalhamento mecânico, homogeneizador ultrassônico de alta potência, reduz o tamanho das gotas de monômeros, previamente à polimerização.^{100,103,105}

As gotas de monômero se mantêm estáveis durante a polimerização em miniemulsão devido ação combinada do surfactante e coestabilizador. A presença destes compostos evita os efeitos de coalescência das nanogotas e de degradação difusional (conhecida como fenômeno de Ostwald ripening).¹⁰⁰

Uma vez estabilizada, a polimerização em miniemulsão tem seu início por meio da formação dos radicais de iniciador dentro nanogotas de monômero (quando um iniciador organossolúvel é empregado) ou na fase contínua aquosa (quando um iniciador hidrossolúvel é usado). Por ter alta estabilidade coloidal, as partículas poliméricas possuem distribuição e tamanho semelhantes às nanogotas de monômero. Gotas menores proporcionam maiores áreas superficiais, e conseqüentemente, mais chances de radicais dos iniciadores hidrossolúveis iniciarem uma reação. Isto possibilita a obtenção de cadeias poliméricas com elevadas massas molares.¹⁰⁰

O mecanismo de formação de miniemulsões, suas propriedades coloidais e de estabilidade proporciona a produção de polímeros com estreita distribuição de tamanho de partícula e com potencial para a incorporação de substâncias

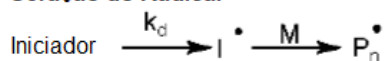
hidrofóbicas.^{100,108}

2.7.3 Polimerização controlada via Transferência de Cadeia Reversível por Adição-Fragmentação (RAFT)

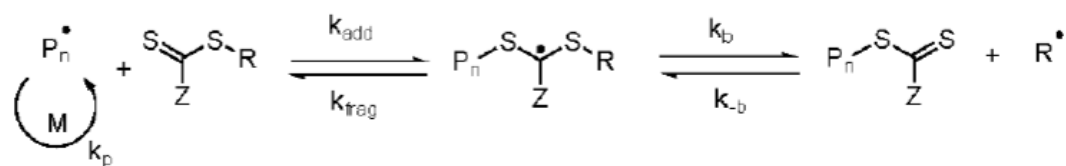
A polimerização controlada é uma técnica que usa agentes de transferência de cadeia (CTAs). Com isso, é possível controlar a massa molar, formando polímeros com distribuições estreitas de massa molar. Também é possível o controle da composição de polímeros com estruturas mais complexas (como polímeros em bloco, estrela, enxerto, ramificado e polímeros de rede), permitindo uma ampla gama de aplicações. O mecanismo de reação é similar ao de polimerização radicalar, a diferença é que há um processo reversível de ativação e desativação dos radicais, proporcionando um equilíbrio dinâmico entre as espécies.¹⁰⁹

O mecanismo cinético de polimerização RAFT clássica, mostrada na Figura 12, começa com iniciação térmica para gerar um radical que, em seguida, reage com unidades monoméricas gerando uma cadeia em crescimento que reage com o agente RAFT. No estágio de pré-equilíbrio, há a formação de um intermediário, que gera um novo radical e uma cadeia dormente com extremidade RAFT. Os radicais formados são responsáveis por consumir os monômeros, gerando uma cadeia polimérica viva. O equilíbrio entre as cadeias poliméricas vivas e dormentes é alcançado, proporcionando reações de transferências mais rápidas que as de propagação.¹⁰⁹

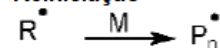
Geração do Radical



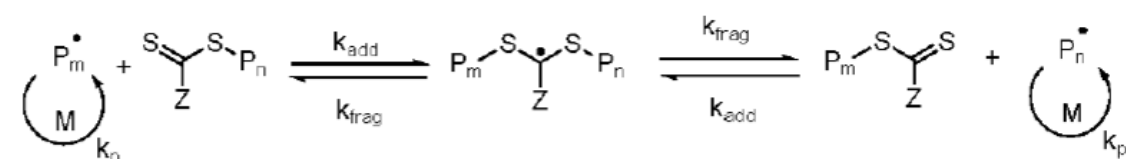
Pré-equilíbrio RAFT



Reiniciação



Equilíbrio



Terminação

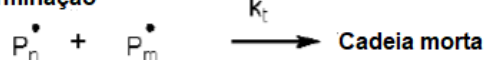


Figura 12 - O mecanismo da polimerização RAFT: sequência de reações de adição e fragmentação. (Fonte: adaptado de Bradford et, al. 2021.¹⁰⁹).

A polimerização RAFT é mediada por uma variedade de agentes, que desempenham papel fundamental no controle de crescimento da cadeia polimérica. A estrutura dos agentes RAFT é frequentemente composta de tiocarbonila ligada a vários grupos R e Z. Esses grupos R e Z devem ser ajustados para cada monômero para garantir baixa dispersão de massa molar, taxas de reação razoáveis e controle da reação. Os quatro tipos comuns são ditiobenzoatos, tritiocarbonatos, ditiocarbamatos e xantatos. O grupo R representa a espécie radicalar R' que adicionará monômeros, formando a cadeia polimérica P_n' e determinando a atividade do agente RAFT. O grupo Z é responsável por estabilizar o radical intermediário, garantindo a adição eficiente do radical ao agente RAFT. Os ditiobenzoatos são os estabilizadores mais eficientes, pois eles possuem um grupo fenil altamente conjugado.¹⁰⁹

Os pontos que tornam a polimerização controlada uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos polímeros é a possibilidade de sintetizar materiais poliméricos com estreita dispersão de massa molar e composição química e morfologia controladas, o que viabiliza a obtenção de

polímeros com composição bem definida e baixa heterogeneidade. Há diversos monômeros que podem ser utilizados neste tipo de polimerização.^{9,110}

Materiais poliméricos com as mais diversas aplicações podem ser obtidos com a polimerização controlada, uma vez que diferentes arquiteturas da cadeia polimérica podem ser obtidas usando esta técnica.⁹

3 - Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Linhagens

As bactérias utilizadas neste trabalho foram obtidas em parceria com o Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília (LABLEITE/FAV/UnB). Os microrganismos foram isolados de amostras de leite de búfalas, no período de setembro de 2017 a fevereiro de 2018, provenientes de uma propriedade/laticínio localizada em Brazlândia, Distrito Federal e de um fornecedor de leite cru cuja propriedade está localizada em Monte Alto, Padre Bernardo, no estado de Goiás.⁴

As bactérias com maior capacidade de acidificação foram selecionadas para serem usadas no presente trabalho. Uma vez identificadas, as bactérias foram transferidas para a Embrapa Agroenergia em criotubos contendo meio MRS e Glicerol a 30% e armazenados em ultrafreezer a -80 °C. Cada bactéria teve seu código de origem mantido e foram denominadas de:

- 84 JL - *Pediococcus acidilactici*
- 105 JL - *Enterococcus durans*
- 140 JL - *Weissella thailandensis*
- 153 JL - *Lactococcus lactis*

3.1.2 Equipamentos

Equipamentos utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Espectrofotômetro portátil com absorvância UV/VIS, marca Implén, modelo OD600.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, marca Agilent, modelo 1260 Infinity.
- ✓ *Shaker* orbital de bancada com incubação e refrigeração, marca Thermo Scientific, modelo Max 4000.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Eppendorf, marca Herme Labortechnik, modelo Z326K.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos cônicos tipo Falcon,

marca MPW MED Instruments, modelo MPW-352R.

- ✓ Autoclave Vertical, marca Primatec, modelo CS capacidade 100 L.
- ✓ Biorreator, marca Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock.
- ✓ Biorreator, marca Eppendorf, modelo Bioflo 120.
- ✓ Liofilizador, marca Liotop, modelo K120.
- ✓ Bomba peristáltica, marca Gilson, modelo Miniplus3.
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 600 MHz, marca Bruker, modelo Magneto Ascend 600 Console Avance III HD
- ✓ Processador Ultrassônico marca Cole Parmer
- ✓ Calorímetro exploratório diferencial, marca Shimadzu, modelo DSC-60
- ✓ Zetasizer-NanoSeries, marca Malvern, modelo NANO ZS
- ✓ Analisador termogravimétrico, marca Shimadzu, modelo DTG-60H
- ✓ Cromatógrafo de Permeação em Gel, marca Malvern, modelo Viscotek RImax
- ✓ Capela de fluxo laminar, marca Filter flux, modelo FLV-960/4
- ✓ Placa de aquecimento com agitação magnética, marca IKA, modelo C-MAG HS7
- ✓ Estufa de secagem e esterilização com circulação de ar, marca American lab, modelo AL-102-10
- ✓ Bomba de vácuo, marca Buchi, modelo V-700
- ✓ Banho térmico com circulação externa, marca Huber, modelo 118A-E
- ✓ Balança analítica, marca Shimadzu, modelo AY220

3.1.3 Meios e Soluções

- Composição do meio MRS comercial:

Peptona bacteriológica (10 g/L), Fosfato dipotássio (2 g/L), Sulfato de manganês (0,5 g/L), Acetato de sódio (5 g/L), Extrato de levedura (4 g/L), Sulfato de magnésio (0,2 g/L), Tween 80 (1 g/L), Citrato de amônio (2 g/L) e Glicose (20 g/L).

- Composição do meio MRS modificado:

Peptona bacteriológica (10 g/L), Fosfato dipotássio (2 g/L), Sulfato de manganês (0,5 g/L), Acetato de sódio (5 g/L), Extrato de levedura (4 g/L), Sulfato de magnésio (0,2 g/L), Tween 80 (1 g/L), Citrato de amônio (2 g/L).

A quantidade de fonte de carbono de cada experimento é acrescida à base do meio MRS modificado.

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0:

Ajustar o pH para 7,0 adicionando a solução 0,1 M de fosfato de potássio monobásico na 0,1 M fosfato de potássio dibásico.

- Bicarbonato de amônio 2M:

Para cada litro de água destilada, aproximadamente 158,12 g de NH_4HCO_3 foram dissolvidos.

3.2 Etapa 1

3.2.1 Correlação da massa da bactéria com a densidade ótica

A fim de observar o perfil de crescimento das bactérias, as cepas foram crescidas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio MRS comercial por 72 horas, em *shaker* a 30 °C e 180 rpm. Foi realizada uma curva de calibração entre a densidade ótica do espectrofotômetro e a concentração de cada bactéria na cultura, através da medição do peso seco.

Para o cálculo do peso seco retirou-se 1 mL da cultura do pré-inóculo de cada microrganismo, centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos. Ao término da centrifugação, as células das bactérias foram ressuspendidas em água destilada e repetiu-se a centrifugação. Em seguida, a água destilada foi desprezada, deixando apenas as células no tubo. As células foram colocadas em uma estufa a 70 °C e pesadas até obter uma massa constante. A Figura 13 mostra a relação obtida entre a medição peso seco medido e a densidade ótica.

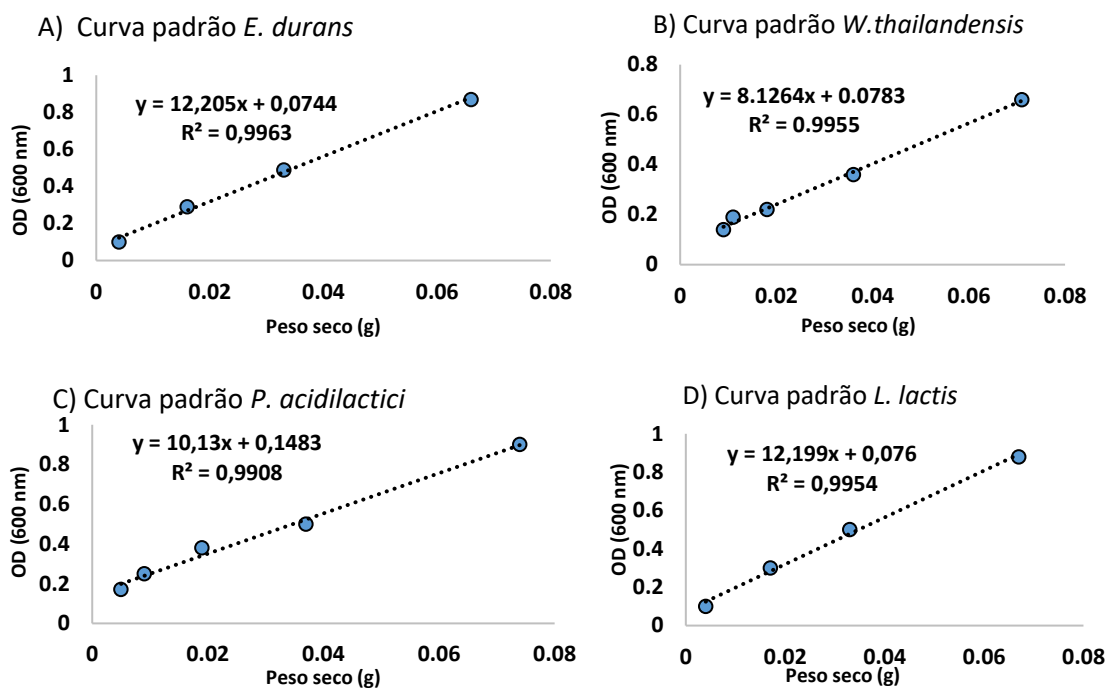


Figura 13 - Curva padrão de correlação entre o peso seco das bactérias A) *E. durans*, B) *W. thailandensis*, C) *P. acidilactici* e D) *L. lactis* com a densidade óptica.

3.2.2 Crescimento de pré-inóculo

Primeiramente, houve a fase de adaptação dos microrganismos no mesmo meio utilizado no processo de bioconversão, devido à estocagem em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A primeira etapa foi realizada em meio MRS ágar, para crescimento em meio sólido, em estufa por 48 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O pré-inóculo foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio MRS e incubados a 180 rpm e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ou 72 horas.

Para os experimentos em fermentadores de 5 litros, a primeiro pré-inóculo teve duração de 24h em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio MRS a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 180 rpm. Um segundo pré-inóculo foi realizado com duração de 15 h em Erlenmeyers de 1 L com 150 mL de meio MRS suplementado com 10 g/L de lactose a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 180 rpm. Após finalizado o primeiro pré-inóculo, os 100 mL presentes nos frascos de 250 mL foram vestidos nos frascos de 1 L.

3.2.3 Avaliação da produção de ácido lático em frascos

3.2.3.1 Avaliação da capacidade de produção de ácido lático utilizando diferentes fontes complementares de carbono

Primeiras condições - Em tubos cônico tipo Falcon de 50 mL devidamente autoclavados foram adicionados 30 mL de meio MRS comercial suplementado com 40 g/L de glicerol, lactose ou sacarose, em triplicata, em capela de fluxo laminar, inoculados com OD_{600nm} de 1,8 de cada bactéria. Para este experimento, foi realizado um pré-inóculo para os 4 microrganismos por 72h. Os tubos foram mantidos em *shaker* a 30 °C e 120 rpm por 96 horas. Foram retiradas alíquotas de 1000 microlitros a cada 24 horas para quantificar o crescimento celular em espectrofotômetro, a produção de metabolitos e consumo da fonte de carbono em HPLC. O peso seco foi realizado no início e ao final da fermentação.

Segundas condições - O pré-inóculo foi realizado em Erlenmeyers por 72 h para as 4 bactérias. O inóculo realizado foi com uma OD₆₀₀ de aproximadamente 1,55 e foi realizado para as 3 fontes de carbono em tubos cônicos de 50 mL contendo 30 mL de meio MRS modificado com 20 g/L de sacarose e 10 g/L de glicose, 20 g/L lactose e 10 g/L de glicose ou 20 g/L glicerol. De 24 em 24 horas pontos foram retirados para análises quantitativas de ácido láctico e da fonte de carbono e a Densidade óptica (OD) para verificar o crescimento celular.

3.2.3.2 Adaptação celular natural com glicerol

Foram realizadas fermentações com meio MRS modificado suplementado com 30 g/L de glicerol em tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL com 30 mL de meio. De 96 em 96 horas, os tubos eram centrifugados, o sobrenadante era recolhido para análise e as células eram ressuspendidas em um novo meio, com as mesmas concentrações de glicerol. Ao todo, 6 ciclos foram realizados para induzir o consumo do glicerol, visando a produção de ácido láctico.

3.3 Etapa 2

3.3.1 Avaliação da produção de ácido láctico em diferentes concentrações de lactose em Biorreator de 1 litro

Nos experimentos com a bactéria *E. durans*, foram realizadas fermentações em reatores de 1 litro com 600 mL de meio MRS modificado tamponado (fosfato de potássio pH = 7) suplementado com 40 g/L lactose e 10 g/L de glicose ou com 20 g/L de lactose e 10 g/L de glicose. Em Erlenmeyers de

125 mL com 50 mL do meio MRS, o pré inóculo foi realizado com as colônias obtidas nas placas de petri, para crescimento celular. Os frascos foram mantidos em *shaker* com rotação 180 rpm, a 30 °C por 24h. O meio foi centrifugado para coletar as células e inocular nos fermentadores.

O inóculo foi realizado com OD_{600nm} de aproximadamente 0,7. As fermentações foram realizadas em duplicata em biorreator de 1 litro a temperatura de 30 °C e agitação de 180 rpm, por 72 horas. Foram retiradas alíquotas de 24 em 24 horas para verificar o crescimento celular com espectrofotômetro e os metabolitos formados e consumo de açúcares por HPLC.

3.3.2 Avaliação da produção de ácido lático com *E. durans* em condições anaeróbicas em biorreator de 1 litro

Para avaliar a produção de ácido lático na ausência de oxigênio dissolvido ao meio, foram realizadas fermentações com injeção de gás nitrogênio. O pré-inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL do meio MRS para crescimento celular. Os frascos foram deixados em *shaker* com rotação de 180 rpm, a 30 °C por 24h. O meio foi centrifugado para coletar as células e inocular com uma OD_{600nm} de 2,2 nos fermentadores.

Foram realizadas fermentações em reatores de 1 litro com 600 mL de meio MRS modificado tamponado (fosfato de potássio pH = 7) suplementado com 10 g/L lactose e 10 g/L de glicose. A fermentação em duplicata ocorreu a uma temperatura de 30°C e agitação de 180 rpm, com injeção de nitrogênio 0,8 mL/min ao meio, por 48 horas. As amostras foram coletadas a cada 24 horas e quantificou-se a lactose no meio, para analisar se seria necessário alimentar o meio fermentativo com a solução estoque de 100 g/L.

3.3.3 Avaliação da produção de ácido lático com *E. durans* com reciclo de células em biorreator de 1 litro

Para este experimento foi realizado um pré-inóculo de 72h em Erlenmeyers em *shaker* com rotação de 180 rpm a 30 °C, para uma primeira batelada em reator de 1 litro com inóculo de OD_{600nm} 3,5. As fermentações foram realizadas em duplicata a 30°C e 180 rpm de agitação por 96 horas com meio MRS suplementado com 20 g/L lactose e 10 g/L de glicose. Para o reciclo, as células eram centrifugadas e inoculadas em partes iguais.

As células recuperadas foram inoculadas com OD_{600nm} inicial de 4,6 e a fermentação seguiu para mais 96 horas. Não houve adição de nitrogênio ao fermentador e o meio não foi tamponado.

3.3.4 Avaliação da produção de ácido láctico com *E. durans* com alimentação em pulso e controle de pH em biorreator de 1 litro

Para avaliar a influência do pH na produção de ácido láctico, fermentações foram realizadas com o controle de pH em 5,0 este controle foi realizado com adição de solução de hidróxido de potássio 2 M. O pré inóculo foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio MRS comercial por 72h em *shaker* a 30 °C. A fermentação foi realizada em meio contendo 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose a 30 °C e 180 rpm de agitação por 96 horas. Foram retiradas amostras de 24 em 24 horas. O inóculo foi realizado com OD_{600nm} de 2,6.

Com 48 e 72 horas de fermentação, alimentou-se o meio com uma solução estoque de 150 g/L de lactose ao meio para manter a concentração de 10 g/L no meio fermentativo.

3.3.5 Fermentações com *E. durans* em biorreator de 5 litros

As fermentações realizadas em fermentadores com capacidade nominal de 5 litros foram realizadas com 3 L de meio MRS modificado com 10 g/L glicose + 20 g/L lactose. Ao final do segundo pré-inóculo, o meio foi centrifugado por 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 110 mL de água destilada estéril, com densidade óptica inicial de 380. Este creme foi inoculado no biorreator autoclavado para iniciar o experimento com aproximadamente OD_{600nm} de 5.

De 12 em 12 horas, as alíquotas eram retiradas do fermentador para quantificação de metabólitos e consumo de açúcares em HPLC, bem como analisar a densidade óptica. A fermentação durou 144 horas, com alimentação de lactose em 24, 31, 48, 72, 78 e 96 horas.

3.3.6 Purificação do ácido láctico obtido por processo fermentativo

O caldo proveniente das fermentações foi reservado. Foi realizada centrifugação a 800 g (4400 rpm) por 10 minutos e com o sobrenadante foram realizados diferentes métodos de purificação. A primeira etapa da purificação foi realizada em banho térmico a 70 °C sob agitação em um béquer com o

sobrenadante obtido nas fermentações em biorreator para redução de volume, visando uma maior concentração de ácido láctico.

3.3.6.1 Precipitação com carbonato de cálcio

Foi adicionado CaCO_3 (equivalente a 5 e 3 vezes quantidade de mols de ácido láctico presente na solução) ao meio concentrado e mantido em agitação de 500 rpm por 3 horas a 60 °C. Em seguida, o meio foi filtrado com membrana de 0,22 μm a vácuo, com o Manifold. Por fim, ácido clorídrico 1 mol/L foi adicionado ao precipitado obtido para recuperação do ácido láctico e, posteriormente, as frações foram analisadas por HPLC. A Figura 14 exemplifica as etapas utilizadas no método tradicional de purificação do ácido láctico.



Figura 14 – Etapas de purificação do ácido láctico com carbonato de cálcio.

3.3.6.2 Precipitação com etanol

Assim como descrito por Liu e colaboradores⁹⁴, no procedimento por precipitação com etanol, inicialmente, as células foram removidas do meio fermentativo por centrifugação. Em seguida, parte do sobrenadante foi filtrado com 0,15 g de carvão ativo para cada 10 mL de meio e filtrado com membrana de 0,22 μm . Etanol (3:1 v/v) foi adicionado a frio ao sobrenadante para precipitar o ácido láctico. A mistura foi mantida na geladeira por 3 horas. O produto foi seco a vácuo e liofilizado por 24h. Em seguida, foi analisado por HPLC. A Figura 15

retrata as etapas utilizadas no método 2 de purificação do ácido láctico, adaptada da purificação do ácido xilônico.

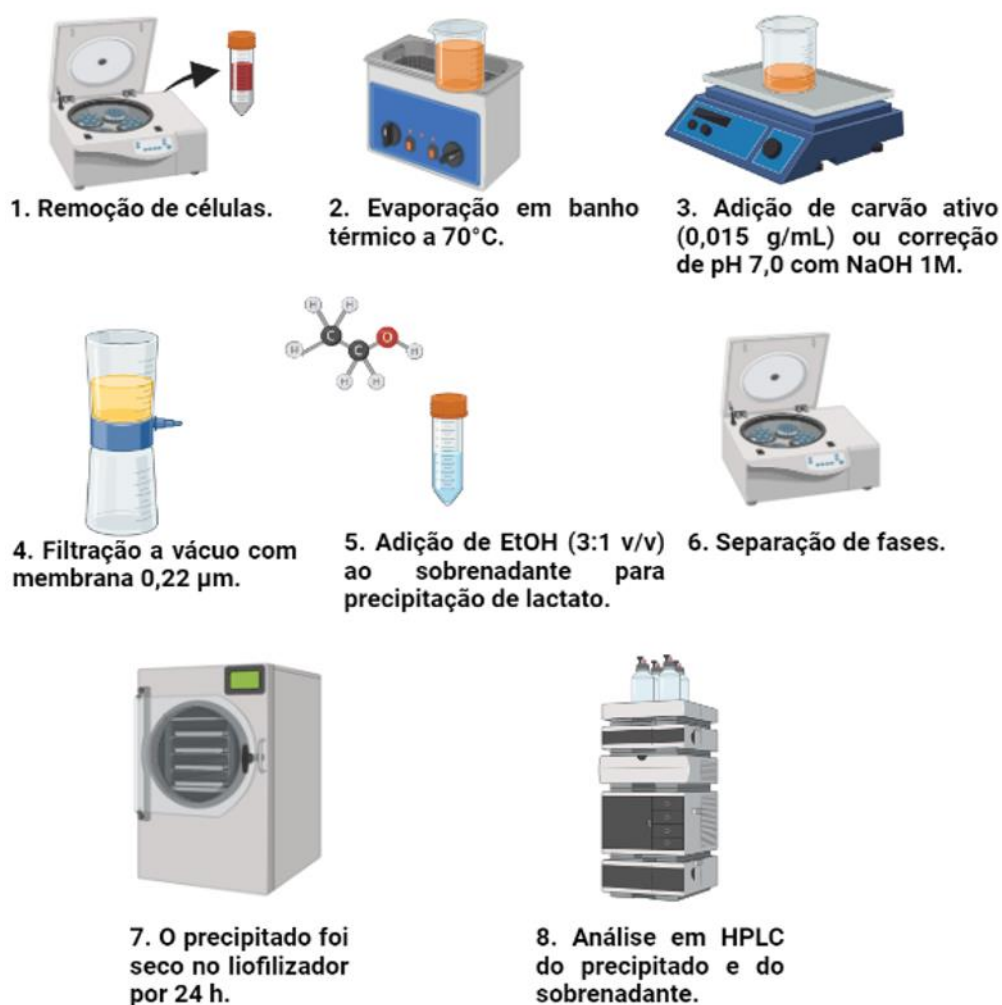


Figura 15 - Etapas de purificação do ácido láctico com precipitação com etanol.

Sabendo que em pH 7,0 a espécie predominante é o lactato e que ele é pouco solúvel em etanol, corrigiu-se o pH do meio fermentativo para 7,0. Também foi realizado o teste de precipitação com etanol sem correção do pH.

111

3.3.6.3 Troca iônica em coluna de vidro

Para os ensaios de troca iônica foram testadas as resinas Amberlite IRA-67 Cl⁻ e IR-120 H⁺, sendo utilizados como eluente bicarbonato de amônio 2M e água deionizada, respectivamente. A Tabela 2 apresenta as propriedades das resinas utilizadas.

Tabela 2 - Propriedades das resinas utilizadas nos experimentos de troca iônica.

Resina	Tipo de troca iônica	Grupo funcional	Matriz	Tamanho de partícula (µm)	pH
Amberlite IRA-67 Cl ⁻	Aniônica fraca	Amina terciária	Acrílico (gel)	500-700	0-7
Amberlite IR-120 H ⁺	Catiônica fortemente ácida	Ácido sulfônico	Estireno-divinilbenzeno (gel)	620-830	0-14

A resina de troca aniônica fraca (Amberlite IRA-67) foi adquirida na forma Cl⁻ e foi apenas lavada com água destilada para sua preparação. Para a resina de troca catiônica fortemente ácida na forma H⁺, Amberlite IR-120, foi realizada a lavagem com água destilada três vezes para remover quaisquer contaminantes.⁹⁷

Um ciclo completo era realizado em quatro passos para a resina Amberlite IRA-67 Cl⁻:

1. Carregamento com meio fermentativo real contendo ácido láctico;
2. Lavagem com água deionizada;
3. Eluição com solução 2,0 M de NH₄HCO₃ e
4. Lavagem com água deionizada.

Todos os experimentos eram realizados em coluna de vidro contendo uma membrana de vidro, para a retenção do leito de resina, onde eram colocados 22,2 g da resina (BV – volume de leito), conforme as Figuras 16 e 17.



Figura 16 - Equipamentos utilizados para os experimentos de troca iônica. Coluna de vidro com membrana de vidro para retenção da resina acoplada a bomba peristáltica.

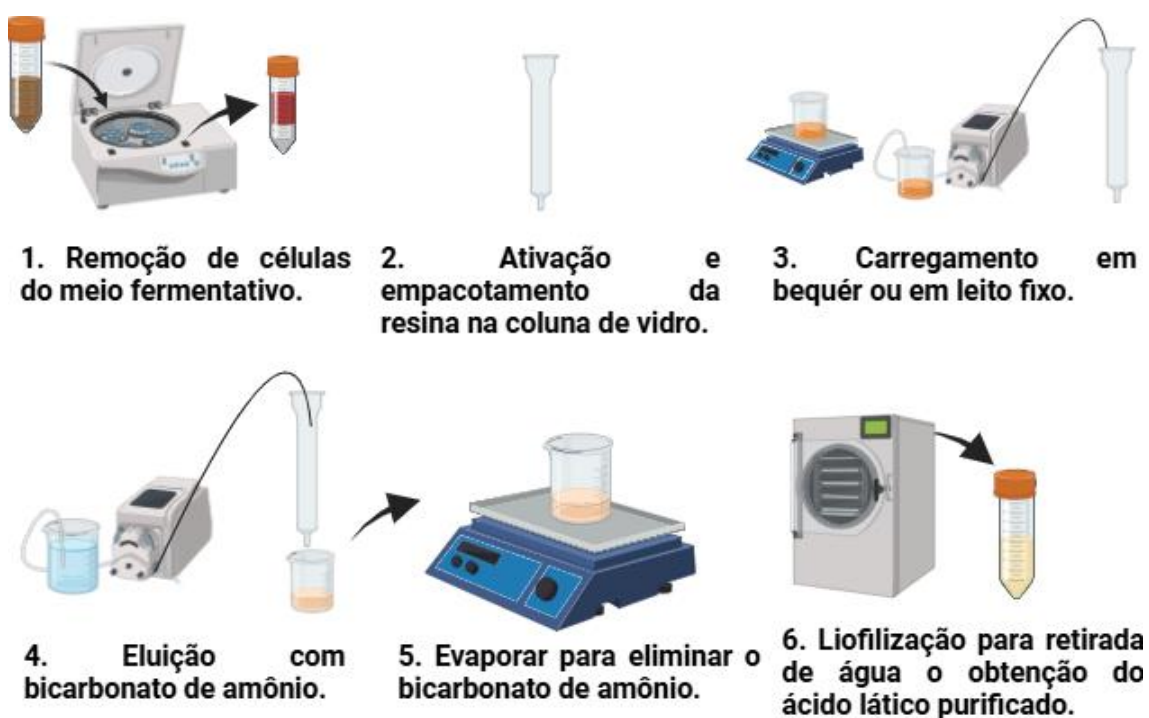


Figura 17 – Esquema para experimentos de troca iônica com resina Amberlite IRA-67 Cl⁻.

As resinas foram testadas tanto individualmente quanto em associação, a fim de avaliar a pureza e a recuperação em cada condição. A concentração de ácido láctico no meio fermentativo de carregamento foi variada (2, 10, 30, 40, 60 e 90 g/L de ácido láctico). O método de carregamento também foi uma variável

estudada, como indicado na Figura 18. O carregamento foi realizado sob agitação em béquer (10, 20 ou 40 min) ou sob fluxo contínuo com a bomba peristáltica diretamente na coluna. Além disso, diferentes vazões de eluição foram testadas (2,5 a 10,0 mL/min).

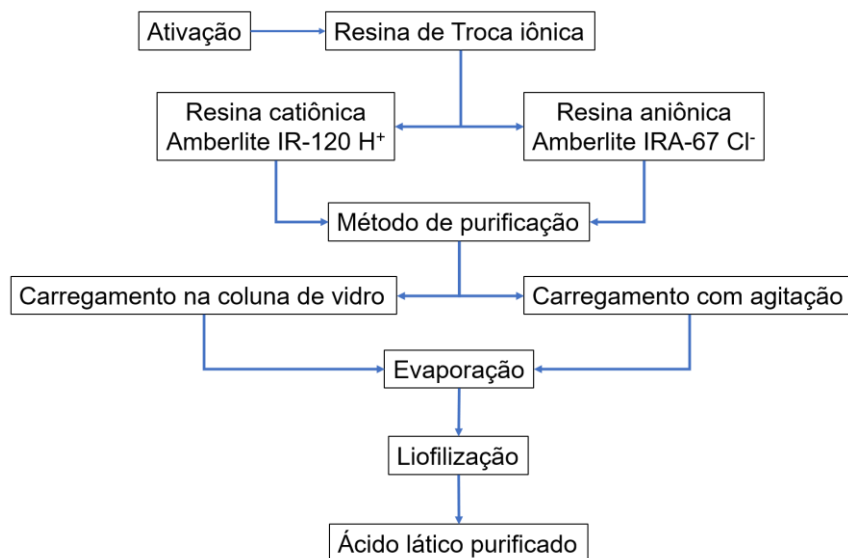


Figura 18 – Etapas da purificação do ácido láctico por troca iônica em coluna de vidro.

Uma vez que era obtido o ácido láctico modificado, a alíquota era submetida a banho térmico de 80 °C para evaporar parte da água da amostra e eliminar o carbonato de amônio. Em seguida, a amostra era congelada e submetida a liofilização por 24 horas para eliminar toda água da alíquota, resultando no ácido láctico purificado.

3.3.7 Detecção e quantificação dos produtos de fermentação

As alíquotas coletadas durante as fermentações foram analisadas em HPLC para quantificação do ácido láctico e dos substratos. As alíquotas obtidas nas etapas de purificação também foram quantificadas por HPLC. As amostras foram diluídas dez vezes com água ultrapura e injetadas na coluna Aminex HPX-87H a 40 °C. A fase móvel de 0,005 mol/L H₂SO₄ foi mantida a 0,6 mL/min de vazão e as análises foram realizadas com detector do índice de refração de acordo com a curva-padrão para cada analito.

Para a identificação do enantiômero do ácido láctico produzido, o detector de arranjo de diodo DAD (254nm) e a coluna Chirex 3126 (D)-Penicillamine. A fase móvel foi CuSO₄ 0,001 mol/L com vazão de 1 mL/min a 30 °C.

3.3.8 Avaliação da performance de fermentação e purificação

Após as fermentações, parâmetros de rendimento e produtividade foram calculados com base nas equações 1 e 2, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (1)$$

O rendimento foi expresso em g ácido láctico/g açúcares consumidos, onde P é a concentração do produto e S a concentração do substrato consumido em g/L. P_f e P_i são as concentrações finais e iniciais do produto. S_f e S_i são as somas das concentrações finais e iniciais dos substratos.

$$P = \frac{dP}{dt} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} = \frac{\text{Formação de produtos}}{\text{Tempo de fermentação}} \quad (2)$$

A produtividade foi expressa em g/L.h, onde P é a concentração do produto em g/L e t o tempo da fermentação em horas. P_f e P_i são as concentrações finais e iniciais do produto. t_f e t_i os tempos finais e iniciais da fermentação.

Usando o modelo Monod, a biomassa (X) é medida pelo peso seco de células por unidade de volume e μ (h^{-1}) é a taxa de crescimento específica da massa celular. A taxa de crescimento específico para massa celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi calculada traçando o gráfico $\ln X/X_0$ em função do tempo, e o coeficiente angular de a reta ajustada aos dados experimentais durante a fase exponencial de crescimento corresponde ao $\mu_{m\acute{a}x}$.

A recuperação de ácido láctico nos métodos de purificação foi calculada em termos percentuais, com base na massa de ácido láctico presente na amostra antes do processo de purificação.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{massa de AL em cada etapa da purificação}}{\text{massa AL do meio fermentativo}} \cdot 100 \quad (3)$$

A pureza foi calculada com base nos percentuais na massa seca da amostra obtida após a purificação e na concentração de ácido láctico obtida por CLAE após diluir a massa seca em 5 mL de água.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{massa de AL em cada etapa da purificação}}{\text{massa seca total}} \cdot 100 \quad (4)$$

3.4 Etapa 3

3.4.1 Esterificação seletiva do ácido láctico purificado com ácido acrílico

Foram realizadas reações de esterificação para a modificação do ácido láctico purificado via troca iônica conforme o método estudado por Barroso e colaboradores.¹⁰¹ Cerca de 35 mmol de ácido láctico foi adicionado a um balão de fundo redondo juntamente com ácido acrílico na proporção 1:1 mol. Aproximadamente 0,35 mmol de ácido metanosulfônico foi usado como catalisador da reação. Foi adicionado 0,17 mmol de hidroquinona como inibidor para evitar que houvesse polimerização, visto que em sua estrutura há um anel benzênico com 2 hidroxilas na posição para, que geram íons H⁺ que reagem com os possíveis sítios iniciadores.

A reação foi realizada com Dean Stark e condensador acoplado com uma bomba a vácuo para retirada de água do sistema. O meio reacional foi submetido a 100 °C com agitação de 600 rpm por 3 horas em banho de óleo mineral. A mesma reação foi realizada utilizando ácido láctico comercial, para comparar com o desempenho do monômero obtido pela purificação com troca iônica.

O éster obtido foi submetido a caracterização por RMN 600 MHz com CDCl₃ como solvente e cerca de 20 mg de amostra com TMS ($\delta = 0$ ppm) como padrão interno.

3.4.2 Modificação do ácido láctico via esterificação de Steglich com ácido acrílico

Em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador foi adicionado 50 mL de clorofórmio e 0,01 mol de DCC, que agiu como agente de acoplamento. Em seguida, foram adicionados 0,01 mol de ácido acrílico. Após 10 minutos 0,01 mol de ácido láctico foram acrescentados à mistura. Por fim, 0,2 mol de DMAP foi adicionado ao meio reacional, que atua como catalisador de reação.

A reação de esterificação foi realizada a temperatura ambiente por 3 horas com acompanhamento em tempo real por uma sonda de infravermelho *in situ*. A reação ocorreu a 20 °C e 600 rpm.

Ao final, a fase orgânica foi filtrada em funil de Büchner e lavada 3 vezes com uma solução de bicarbonato de sódio 5 % para neutralizar quaisquer ácidos residuais. Em seguida, foi realizada a lavagem com água destilada para retirada do bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca evaporando o clorofórmio para isolamento do éster formado para caracterização por RMN 600 MHz com CDCl_3 como solvente e cerca de 20 mg de amostra com TMS ($\delta = 0$ ppm) como padrão interno.¹⁰²

3.5 Etapa 4

3.5.1 Reação de copolimerização em miniemulsão de ácido láctico modificado com metacrilato de isobornila

As reações de copolimerização em miniemulsão foram realizadas em batelada, em balões de fundo redondo de 50 mL, com aquecimento via banho de silicone. As reações foram realizadas a 80 °C por 2 horas. Por fim, o material polimérico foi colocado em estufa a 60 °C para secagem e calcular a conversão.

Em um béquer adiciona-se as quantidades de 33 g de água, 0,15 g de dodecil sulfato de sódio (SLS), 0,15 g de hexadecano (HD) e 0,15 g de persulfato de potássio (KPS) e 6 g de monômero. Em seguida, a mistura é submetida ao ultrassonicador por 4 minutos, com 70% de amplitude e 10 segundos on/5 off em banho de gelo para evitar polimerização.

Foram realizadas reações de copolimerização utilizando 5% em massa de monômero de ácido láctico modificado (ALM) produzido pela esterificação seletiva com ácido acrílico com ácido acrílico (AA) e 95% de metacrilato de isobornila.

3.5.2 Reação de polimerização do ácido láctico modificado via RAFT

A polimerização RAFT foi planejada com base no trabalho de Haribabu e Vijayakrishna¹¹² em que o agente RAFT 2-ciano-2-propil dodecil tritiocarbonato (12 mg, 0,035 mmols) e iniciador radical Azobisisobutironitrila AIBN (1,3 mg, 0,004 mmoles) foram colocados em um *Schlenk* e solubilizado em 4 mL de dimetilformamida (DMF). Em seguida, o ácido láctico (purificado ou comercial) (0,35 g, 3,9 mmols) foi adicionado à mistura, com a finalidade de obter 2 polímeros para comparação. A solução foi submetida a um fluxo de N_2 durante 10 min para tornar a atmosfera inerte. A polimerização foi iniciada mergulhando

o *Schlenk* no banho de óleo a 65°C e durou 6 horas. O polímero final foi seco em estufa a 60 °C.

3.5.3 Técnicas de caracterização dos polímeros

- Cromatografia de permeação em gel (GPC):

As distribuições de massa molar e as massas molares médias foram determinados pela análise de 3 mg do monômero dissolvido em 1 mL de tetrahidrofurano (THF), filtrado em filtro de Teflon com um tamanho de malha de 45 micrômetros. O cromatógrafo é composto por três colunas em série (KF-802.5, KF-804L e KF-805L) e detector de índice de refração (RID-10A), utilizando THF como fase móvel, a 40 °C, e com uma vazão volumétrica de 1 mL·min⁻¹.

- Espalhamento de luz dinâmico (DLS):

O espalhamento de luz dinâmico é usado para medir o tamanho das partículas da miniemulsão. A técnica é capaz de informar qual o tamanho médio de partículas (Dp) e a distribuição do tamanho de partículas (DTP). O equipamento utilizado foi Malvern Zetasizer-NanoSeries, modelo NANO ZS. A diluição feita foi de aproximadamente 10 µL do látex para 3 mL de água destilada.

- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial ou exploratória de varredura foi aplicada nas amostras dos produtos poliméricos utilizando cadinho de alumínio com, aproximadamente, 4 mg de amostra. As aquisições foram realizadas com uma vazão de 30 mL·min⁻¹ de hélio para propiciar atmosfera inerte nas aquisições feitas com duas rampas de resfriamento e aquecimento na faixa de -30 °C a 200 °C e taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹.

- Termogravimetria (TG/DTG):

A análise termogravimétrica foi efetuada nas amostras poliméricas utilizando um porta-amostra de platina com cerca de 10 mg de amostra. O analisador termogravimétrico da marca Shimadzu e modelo DTG-60H foi operado em atmosfera inerte com vazão de 30 mL·min⁻¹ de nitrogênio. Foram feitas aquisições na faixa de temperatura de 25 °C a 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹.

4 - Resultados e discussões

4.1 Etapa 1

4.1.1 Perfil de crescimento em meio líquido

Para obter o perfil de crescimento celular de cada bactéria, foram realizadas fermentações em tubos de 50 mL, contendo 30 mL de meio MRS comercial. Após o preparo do inóculo de cada bactéria, as reações em tubos cônicos do tipo Falcon foram realizadas por 72 horas, em *shaker*, a 30 °C e 180 rpm. A cada 4 horas foram retiradas alíquotas para aferir a densidade óptica.

A curva de crescimento celular é dividida em: fase de latência (lag), fase exponencial (ou log), fase estacionária e fase de declínio (morte celular). A fase lag é o período em que o número de células sofre pequenas variações, uma vez que o crescimento não se inicia de imediato. A fase de crescimento exponencial é referente ao período em que as células iniciam seu processo de divisão, aumentando significativamente o número de células no meio. Na fase estacionária, o número de células se mantém constante, ou por limitação de nutrientes ou por produção de compostos inibitórios. A fase de declínio corresponde ao período em que grande parte das células morrem.¹¹³ A Figura 19 mostra as curvas de crescimento celular obtidas para cada bactéria.

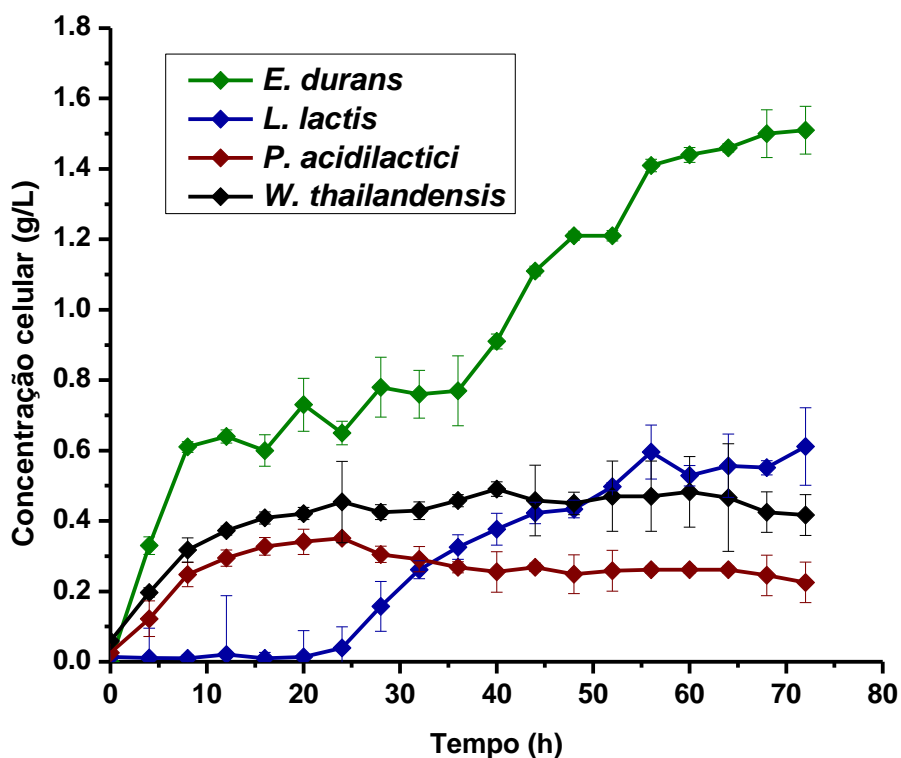


Figura 19 - Concentração celular das bactérias *E. durans* (verde), *P. acidilactici* (vermelho), *W. thailandensis* (preto) e *L. lactis* (azul) em meio MRS líquido por 72 horas.

Com base no perfil das curvas, percebe-se que a *E. durans* tem uma fase exponencial nas primeiras 8 horas. Após este tempo, observa-se uma fase de crescimento mais lenta até 36 horas, seguida de uma nova fase exponencial até 48 horas. O crescimento celular é mais expressivo entre 36 e 52 horas de fermentação. A segunda etapa de crescimento pode estar associada ao consumo do próprio ácido láctico produzido, já que a glicose pode ter sido metabolizada nas primeiras horas de fermentação. Algumas bactérias lácticas, como *L. buchneri*, são capazes de consumir o ácido láctico na ausência de outra fonte de carbono.¹¹⁴ Após 60 horas de fermentação, a concentração celular se mantém constante, indicando que alcançou a fase estacionária. Durante as 72 horas de fermentação, não foi possível observar a fase de declínio.

Foi observado que a *L. lactis* apresentou a maior fase lag com glicose, chegando a 24 horas. Comparando com as demais bactérias, percebe-se que a *L. lactis* leva mais tempo para iniciar a fase de crescimento exponencial, indicando que levou mais tempo para ajustar suas funções metabólicas e

começar a crescer ativamente com a glicose do que as demais bactérias. A partir de 56 horas de experimento, a bactéria não teve aumento nos valores de concentração celular, indicando que entrou na fase estacionária.

As bactérias *P. acidilactici* e *W. thailandensis* possuem perfis semelhantes. Apesar do crescimento celular atingir valores máximos em menos horas para esses dois organismos, a bactéria *E. durans* alcançou valores de concentração celular maiores. Isso indica que a *E. durans* pode ter uma capacidade de crescimento prolongada, que resulta em uma população celular final maior.

4.1.2 Avaliação da produção de ácido láctico em frascos

As bactérias *P. acidilactici*, *E. durans*, *W. thailandensis* e *L. lactis* foram submetidas a cultivos em meio MRS comercial para uma avaliação preliminar da produção de ácido láctico, bem como o consumo de diferentes fontes de carbono (glicerol, lactose e sacarose).

4.1.2.1 Avaliação da capacidade de produção de ácido láctico utilizando diferentes fontes complementares de carbono

Os experimentos foram realizados em frasco de 50 mL e tiveram como principal objetivo verificar a capacidade de produção de ácido láctico de cada bactéria utilizando três fontes de carbono. Cada bactéria foi cultivada em meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de glicerol, 40 g/L de lactose ou 40 g/L de sacarose. Neste experimento, constatou-se por HPLC que todas as bactérias analisadas produziram o enantiômero (L)-ácido láctico com pureza óptica, cenário que possibilita utilizá-lo como monômero para produção de polímeros a base de ácido láctico.¹¹⁵

A bactéria *P. acidilactici* consumiu 0,6 g de glicose em todos os ensaios antes das 24 horas de fermentação, exaurindo os 20 g/L de concentração inicial presentes no meio comercial. Já as fontes suplementadas não foram totalmente consumidas.

A Figura 20 mostra as produções de ácido láctico obtidas com a bactéria *P. acidilactici* para cada condição. A produção máxima de ácido láctico foi de $7,56 \pm 1,42$ g/L com a sacarose, seguido por $7,51 \pm 0,89$ g/L no experimento com glicerol e $7,05 \pm 0,53$ g/L com lactose ao final das 96 h.

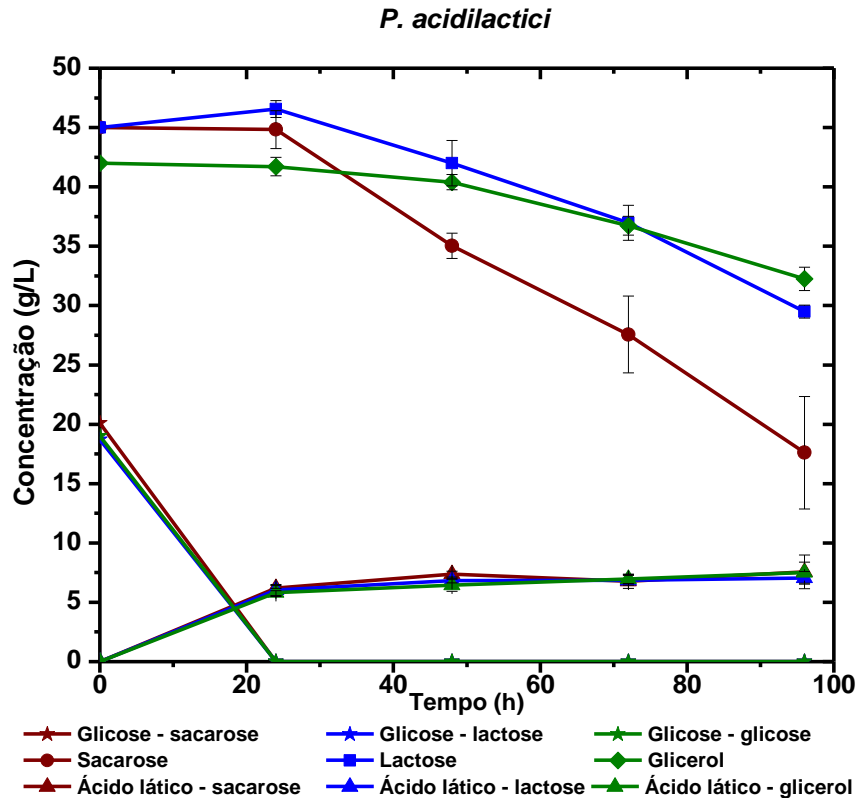


Figura 20 – Produção de ácido láctico para a bactéria *P. acidilactici* com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.

Foi observado que após as primeiras 24 horas de fermentação não foi observado um aumento significativo na produção de ácido láctico conforme Figura 20. Após esgotar a glicose, a bactéria *P. acidilactici* consumiu aproximadamente 0,3 g (15 g /L) de lactose dos 1,4 g (45 g/L) disponíveis inicialmente. Uma produtividade máxima de 0,25 g/L·h e rendimento de 0,24 g/g foram alcançados neste experimento para o ponto de 24 horas. O consumo do glicerol também foi baixo e apenas 0,24 g (9,75 g /L) foi consumido no decorrer do processo fermentativo. Porém, como a produção de ácido láctico para este substrato foi semelhante à produção das demais fontes, resultou numa produtividade máxima de 0,26 g/L·h e rendimento de 0,26 g/g para o experimento com glicerol para 24 horas de processo. Quando a fonte de carbono foi a sacarose a *P. acidilactici* consumiu 0,6 g (27 g/L) ao final das 96 horas de fermentação, para esta fonte de carbono, a produtividade máxima foi de 0,24 g/L·h, com 0,19 g/g de rendimento para 24 horas de processo, além de consumir toda a glicose. Apesar de consumir uma maior quantidade da fonte

de carbono, a bioconversão a ácido láctico não foi eficiente, resultando em rendimento menor. A Tabela 3 traz os dados de produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 3 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria *P. acidilactici* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.

<i>P. acidilactici</i> – 20 g/L glicose + 40 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	7,05 ± 0,53	0,21	0,24	0,25
Sacarose e glicose	7,56 ± 1,42	0,23	0,19	0,24
Glicerol e glicose	7,51 ± 0,89	0,22	0,26	0,26

Assim como relatado por Campos e colaboradores⁸⁷, foi observado que para a *P. acidilactici*, a taxa de consumo de glicose é maior que a de outros açúcares, indicando uma preferência pela glicose, seguida por uma fase de adaptação com as outras fontes.

A bactéria *P. acidilactici* produziu aproximadamente 7 g/L de ácido láctico para as 3 fontes de carbono. Deste modo, podemos inferir que a lactose, sacarose e glicerol não contribuíram para a produção de ácido láctico.

Seguindo as mesmas condições de cultivo para *P. acidilactici*, a Figura 21 mostra as concentrações obtidas ao final de 96 horas de fermentação com a *E. durans*. Pode-se observar que as fermentações com a bactéria *E. durans*, a produção de ácido láctico foi semelhante ao obtido nos experimentos com a bactéria *P. acidilactici* (Figura 20).

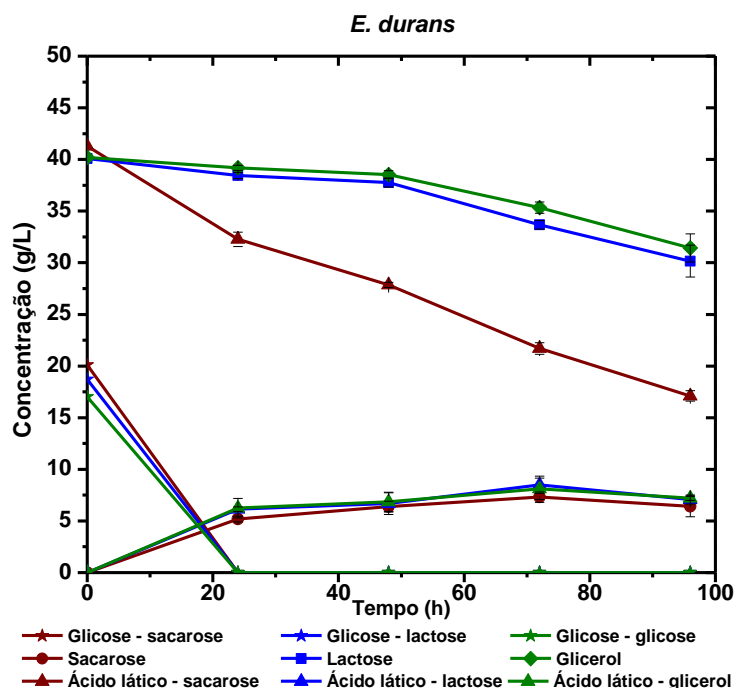


Figura 21 – Produção de ácido láctico para a bactéria *E. durans* com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.

A produção máxima de ácido láctico pela bactéria *E. durans* foi de $7,31 \pm 0,51$ g/L com a sacarose, $8,11 \pm 1,03$ g/L com o glicerol e $8,50 \pm 0,83$ g/L com a lactose. Ao final das 96 horas de fermentação, a bactéria consumiu 0,29 g (10 g/L) de lactose, resultando em um rendimento de 0,28 g/g e produtividade de 0,26 g/L.h em 24 horas e na maior produção entre os substratos testados. Um comportamento semelhante foi observado para o glicerol, em que cerca de 0,26 g do substrato foi consumido durante a fermentação, alcançando um rendimento de 0,28 g/g e produtividade de 0,26 g/L.h. A Tabela 4 traz os dados de produção de ácido láctico, de rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 4 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria *E. durans* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.

<i>E. durans</i> – 20 g/L glicose + 40 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (gAL/gfonte consumida)	Produtividade (g/L.h)
Lactose e glicose	$8,50 \pm 0,83$	0,29	0,33	0,26
Sacarose e glicose	$7,31 \pm 0,51$	0,22	0,17	0,22
Glicerol e glicose	$8,11 \pm 1,03$	0,26	0,28	0,26

A bactéria *E. durans* foi capaz de consumir cerca de 0,69 g (24 g/L) de sacarose, obtendo um rendimento de 0,17 g/g e produtividade 0,22 g/L.h com

25 de processo. Toda a glicose (0,6 g) foi consumida antes das primeiras 24 horas de fermentação em todos os ensaios. Como a concentração de ácido láctico aumentou entre 48 e 72 horas de fermentação, podemos atribuir esta conversão ao consumo da lactose e da sacarose, já que a glicose já havia sido exaurida.

A bactéria *W. thailandensis* foi a que apresentou menores produções de ácido láctico. A glicose foi totalmente consumida antes das primeiras 24 horas de fermentação. Para o experimento com sacarose, 0,54 g de açúcar foi consumido e produziu aproximadamente 0,11 g de ácido láctico. Na fermentação com lactose, 0,78 g de açúcar foi utilizado para produzir aproximadamente 0,12 g de ácido láctico. Para o glicerol, o consumo de 0,88 g de fonte de carbono produziu 0,11g de ácido láctico. A Figura 22 mostra a produção no decorrer da fermentação.

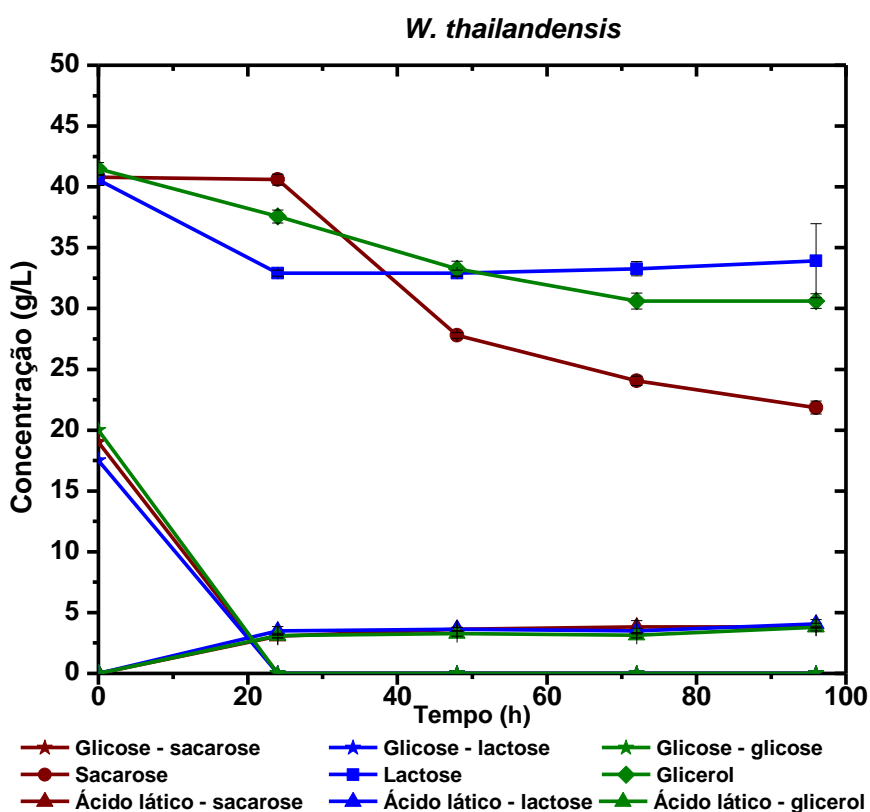


Figura 22 – Produção de ácido láctico para a bactéria *W. thailandensis* com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.

O consumo de lactose foi de apenas 0,18 g, produzindo $4,06 \pm 0,35$ g/L de ácido láctico com rendimento de 0,16 g/g e produtividade de 0,15 g/L.h para

24 h de experimento. A bactéria consumiu 0,28 g de glicerol, produzindo 0,11 g de ácido láctico com rendimento de 0,13 g/g e produtividade de 0,13 g/L·h em 24 horas. Para a sacarose, foi observado um perfil semelhante, com consumo maior da fonte de carbono suplementar (0,54 g) e produzindo a mesma quantidade de ácido láctico. Tal fato indica que o consumo da sacarose foi direcionado para produção celular, resultando em rendimento menor (0,10 g/g). A Tabela 5 traz os dados de produção de ácido láctico, de rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 5 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria *W. thailandensis* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.

<i>W. thailandensis</i> – 20 g/L glicose + 40 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (gAL/g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	4,06 ± 0,35	0,12	0,16	0,15
Sacarose e glicose	3,83 ± 0,31	0,11	0,10	0,13
Glicerol e glicose	3,80 ± 0,31	0,11	0,13	0,13

As produções de ácido láctico e as produtividades alcançadas neste experimento foram menores do que as relatadas por Carlosama e colaboradores⁷³ com *Weissella cibaria*, que variou entre 14,40 e 44,50 g/L de ácido láctico e produtividade entre 2,4 e 7,42 g/L·h a depender das condições de pH, temperatura e agitação e fonte de carbono.⁷³ Sendo assim, pode se avaliar que ajustes nos parâmetros da fermentação podem otimizar a produção de ácido láctico.

A bactéria *L. lactis* foi a que obteve melhor desempenho na produção de ácido láctico. A fonte que teve a melhor produção de ácido láctico, 27,44 ± 4,63 g/L, foi a sacarose. Aproximadamente 0,81 g (27 g/L) de sacarose foi consumido, além de 0,6 g (10 g/L) de glicose, resultando um rendimento de 0,59 g/g e produtividade de 0,29 g/L·h em 96 horas. A Figura 23 mostra as produções de ácido láctico para as diferentes fontes de carbono utilizando a *L. lactis*.

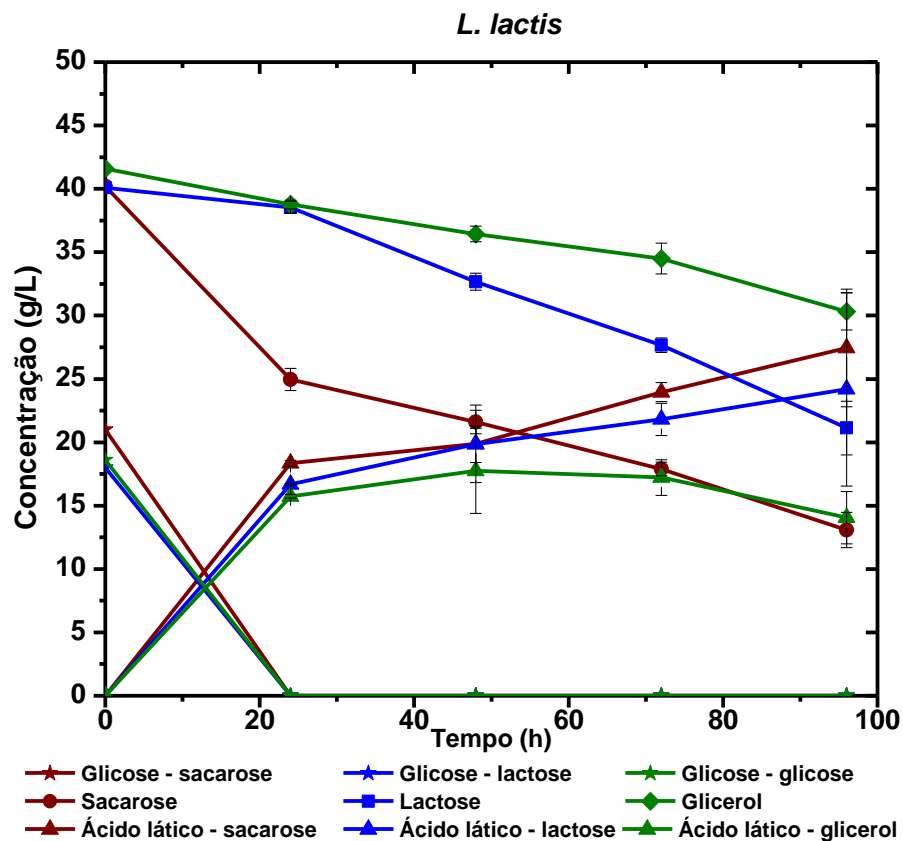


Figura 23 – Produção de ácido láctico para a bactéria *L. lactis* com meio MRS comercial (20 g/L de glicose) suplementado com 40 g/L de lactose, sacarose e glicerol.

A produção de $27,44 \pm 4,63$ g/L de ácido láctico com sacarose e glicose sem controle de pH foi próxima à obtida por Cock e Stouvenel (2006) na fermentação em batelada a 32 °C, com 60 g/L de glicose e controle de pH em 6,0, chegando a produzir 32,3 g/L de ácido láctico com a *L. lactis subs lactis*.³⁷

Para a *L. lactis*, a produção de ácido láctico com lactose foi de $24,19 \pm 5,63$ g/L, sendo que 0,47 g (15 g/L) de lactose foi consumida no final da fermentação. A glicose também foi totalmente consumida nestas condições, obtendo um rendimento de 0,68 g/g e produtividade de 0,26 g/L·h em 96 horas. A Tabela 6 traz os dados de produção de ácido láctico, de rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 6 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria *L. lactis* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL

<i>L. lactis</i> – 20 g/L glicose + 40 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	24,19 ± 5,63	0,73	0,68	0,26
Sacarose e glicose	27,44 ± 4,63	0,82	0,59	0,29
Glicerol e glicose	17,75 ± 3,35	0,53	0,59	0,18

A fermentação com glicerol teve como produção máxima de ácido láctico 17,75 ± 3,35 g/L, com um consumo total da glicose e 0,29 g de glicerol. Para esta fonte, obteve-se um rendimento de 0,59 g/g e produtividade de 0,18 g/L·h em 96 horas. A bactéria *L. lactis* teve um desempenho melhor que os demais microrganismos sendo capaz de produzir ácido láctico a partir de lactose e sacarose nas condições empregadas.

Neste experimento com a *L. lactis*, as produções de ácido láctico foram maiores do que as relatadas por Cock e Stouvenel³⁷ nas fermentações sem controle de pH com glicose, as quais obtiveram produção máxima de ácido láctico de 13,7 g/L. pela *L. lactis subs lactis*.

Souza e colaboradores⁷⁹ utilizando a bactéria *L. lactis* produziram 47,4% mais ácido láctico (23,4 g/L) com controle de pH do que a com as mesmas condições sem controle de pH. Uma vez que a cepa utilizada neste experimento foi capaz de produzir mais ácido láctico sem o controle de pH do que Souza e colaboradores⁷⁹ infere-se que a *L. lactis* tem grande potencial de maximizar sua produção com ajustes nos parâmetros da fermentação, como pH.

Todas as bactérias foram capazes de produzir o L-(+)-ácido láctico com pureza óptica e não tiveram o crescimento celular inibido na presença de glicerol, uma vez que nos experimentos com 40 g/L de glicerol, as cepas foram capazes de produzir ácido láctico em quantidades semelhantes às produzidas na ausência desta fonte.

Os experimentos seguintes utilizaram o meio MRS modificado com concentrações menores das fontes de carbono para verificar se o excesso de açúcar no meio estaria prejudicando a produção de ácido láctico. Já que estudos como Cock e Stouvenel³⁷ apontam que a produção máxima de ácido láctico e a

maior conversão da fonte de carbono foram alcançadas em baixas concentrações de glicose.

Uma vez que o consumo das fontes de carbono suplementares não se mostrou satisfatório, novos experimentos foram realizados com menor quantidade de glicose inicial, 10 g/L. Com a glicose em menores concentrações, foi possível verificar uma melhor assimilação dos demais açúcares, proporcionando um aumento na produção de ácido láctico quando comparamos com fermentações com maiores concentrações de glicose. O meio foi suplementado com 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose ou sacarose. Os experimentos com glicerol foram realizados sem glicose. Fermentações foram realizadas com as 4 bactérias com a finalidade de verificar qual fonte apresenta maior rendimento e produtividade para a produção de ácido láctico.

Ao final das 96 horas, a bactéria *P. acidilactici* consumiu aproximadamente 0,38 g (12 g/L) de sacarose e 0,46 g (15 g/L) de lactose, além de 0,30 g (10 g/L) de glicose para ambas condições. A Tabela 7 e a Figura 24 mostram a produção de ácido láctico e o consumo de cada fonte.

Tabela 7 - Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para a bactéria *P. acidilactici* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL

<i>P. acidilactici</i> – 10 g/L glicose + 20 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	10,03 ± 0,66	0,30	0,61	0,37
Sacarose e glicose	11,81 ± 0,11	0,35	0,94	0,37
Glicerol	1,25 ± 0,071	0,04	0,62	0,01

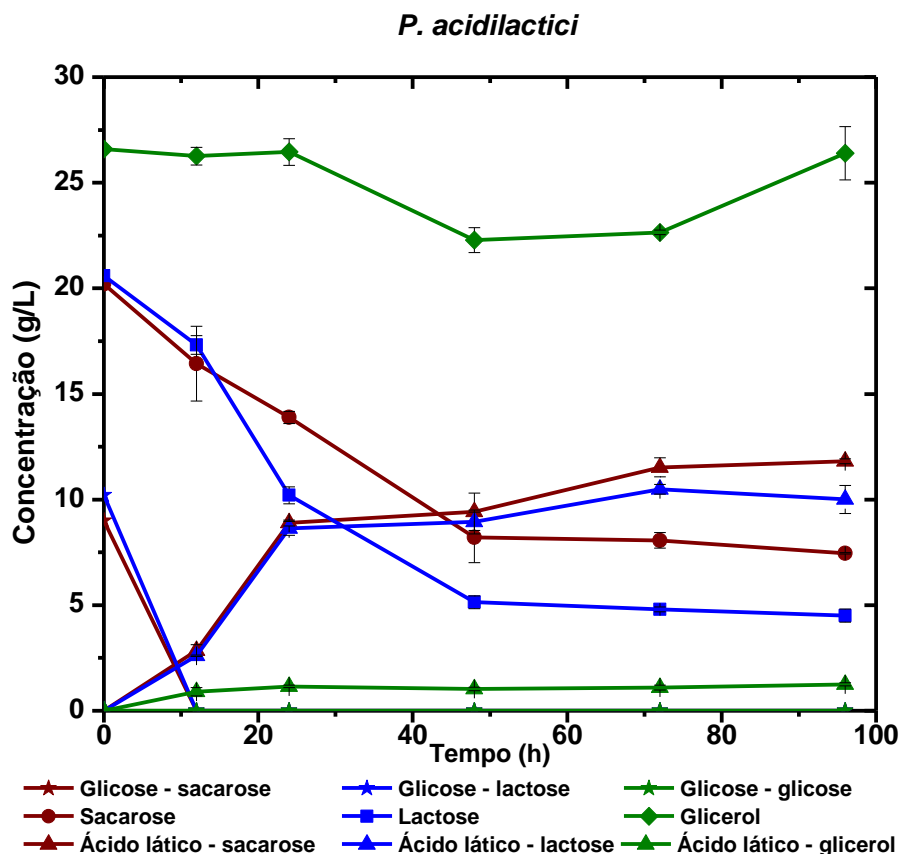


Figura 24 – Produção de ácido láctico com *P. acidilactici* para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.

A bactéria *P. acidilactici* produziu $10,03 \pm 0,66$ g/L de ácido láctico nas fermentações com lactose, alcançando um rendimento de 0,61 g/g e produtividade de 0,37 g/L.h em 24 horas. A melhor condição para a *P. acidilactici* foi a fermentação com sacarose como fonte de carbono, produzindo $11,81 \pm 0,11$ g/L de ácido láctico com um rendimento de 0,94 g/g e produtividade de 0,37 g/L.h em 24 horas.

A utilização de uma fonte de carbono suplementar de 40 g/L (Figura 20) resultou em uma menor produção de ácido láctico quando comparada com uma concentração menor (20 g/L) (Figura 24), sugerindo que os microrganismos sofreram inibição em concentrações mais elevadas de fonte suplementar. Nas primeiras 24 horas de fermentação a glicose já havia sido totalmente consumida. Este tempo coincide com o aumento mais expressivo na produção de ácido láctico e crescimento celular.

Na fermentação utilizando somente glicerol como substrato, observou-se que apenas 0,06 g (2 g/L) de glicerol foi consumido durante a fermentação, produzindo $1,25 \pm 0,07$ g/L de ácido lático. Na fermentação com glicerol suplementado com glicose, a *P. acidilactici* foi capaz de metabolizar 0,24 g (8 g/L) de glicerol, indicando que a associação das fontes de carbono favorece a via metabólica do glicerol. Entretanto, a fermentação com glicerol como única fonte de carbono apresentou rendimento maior (0,62 g/g_{glicerol}) do que quando associado com glicose (0,268 g/g_{glicose+glicerol}).

A bioconversão das fontes de carbono avaliadas apresentou valores absolutos de produção menores do que os relatados por Juodeikiene e colaboradores⁸², que avaliaram a bioconversão de subprodutos agroindustriais sólidos em ácido lático usando a cepa *Pediococcus acidilactici* KTU05-7 e obtiveram 20,18 g/kg de ácido lático em 48 horas de fermentação. Porém, os resultados obtidos com sacarose e glicose apresentaram um rendimento maior (0,94 g/g) do que no relatado por Zhang e colaboradores⁸⁴, que utilizaram a *Pediococcus acidilactici* para produzir ácido lático, alcançando 31,9 g/L, com rendimento de 0,742 g/g_{açúcar} com glicose e xilose. Em conjunto, os dados apontam o potencial da associação destes açúcares como fonte de carbono.

A bactéria *W. thailandensis* produziu $13,05 \pm 0,57$ g/L de ácido lático nas fermentações com sacarose, alcançando um rendimento de 0,75 g/g e produtividade de 0,19 g/L·h nas fermentações com menores concentrações iniciais das fontes de carbono. Para a lactose, a produção de ácido lático foi de $10,74 \pm 0,28$ g/L em 96 horas, com rendimento de 0,74 g/g e produtividade de 0,14 g/L·h em 72 horas. A Tabela 8 traz os resultados de produção, rendimento e produtividade obtidos para as diferentes fontes de carbono.

Tabela 8 - Produção de ácido lático, rendimento e produtividade para a bactéria *W. thailandensis* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.

<i>W. thailandensis</i> – 10 g/L glicose + 20 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido lático (g/L)	Produção de ácido lático (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	$10,74 \pm 0,28$	0,32	0,74	0,13
Sacarose e glicose	$13,05 \pm 0,57$	0,39	0,75	0,19
Glicerol	$0,78 \pm 0,26$	0,02	0,30	-*

*Valor menor que o erro experimental

A melhor condição de fermentação para a *W. thailandensis* foi a fermentação com sacarose como fonte de carbono e aproximadamente 0,57 g de sacarose foi consumido no decorrer da fermentação. O consumo de lactose foi de aproximadamente 0,43 g (14 g/L). Além disso, a bactéria consumiu 0,3 g (10 g/L) de glicose nas primeiras 24 horas de experimento para ambas as fontes. A Figura 25 apresenta os resultados de consumo das fontes de carbono correlacionadas com a produção de ácido láctico.

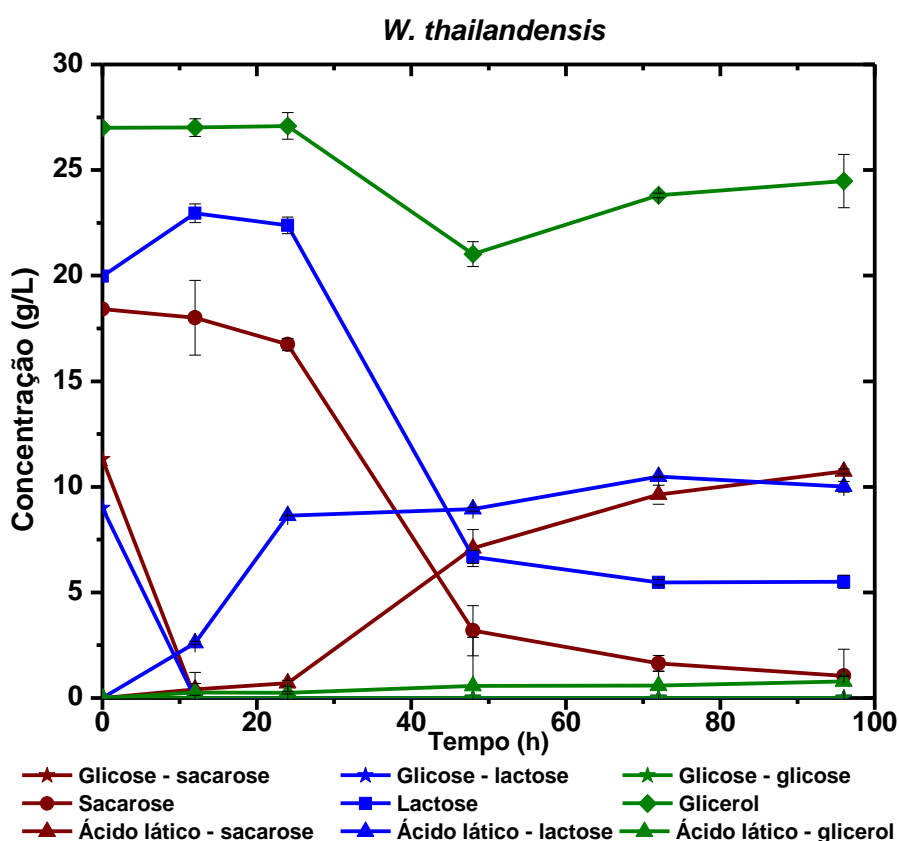


Figura 25 - Produção de ácido láctico com *W. thailandensis* para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.

A bactéria *W. thailandensis* apresentou uma melhora significativa quando comparamos com o experimento com maiores concentrações iniciais de substrato. Para a lactose, o rendimento subiu de 0,16 g/g para 0,74 g/g com menores concentrações iniciais de açúcares. A Produção de ácido láctico subiu de 4,06 g/L para 10,74 g/L e a produtividade de 0,04 g/L·h para 0,13 g/L·h com a diminuição da concentração do substrato em 96 horas de processo.

Para fermentações com menores concentrações iniciais de sacarose, o rendimento subiu de 0,1 g/g para 0,75 g/g. Além disso, a produtividade aumentou

de 0,13 para 0,19 em 96 horas, chegando a produzir 13,05 g/L de ácido láctico ao final da fermentação.

A bactéria *W. thailandensis* consumiu aproximadamente 0,08 g (2 g/L) de glicerol, produzindo apenas 0,02 g (0,78 g/L) de ácido láctico com 0,3 g/g de rendimento. No experimento com associação de glicerol e glicose, a bactéria foi capaz de consumir 0,28 g de glicerol, indicando que a presença do açúcar pode favorecer o consumo de glicerol.

Nagarajan e colaboradores⁴¹ relataram que por meio de fermentações em batelada, utilizando glicose a 40 g/L no meio com algas marinhas hidrolisadas, produziram 17,48 g/L de ácido láctico com *Weissella* sp. e 20 g/L de ácido láctico com *W. paramesenteroides*, consumindo 88% da glicose com rendimento de 0,68 g/g.

Neste experimento, a *W. thailandensis* foi capaz de produzir $13,05 \pm 0,57$ g/L de ácido láctico a partir de 10 g/L de glicose e 20 g/L de sacarose com rendimento de 0,75 g/g, maior que o obtido em fermentações com glicose por Nagarajan e colaboradores⁴¹. Além disso, a bactéria foi capaz de exaurir a glicose e consumir 94,75% da sacarose. Os resultados indicam que a associação destes dois açúcares é uma alternativa para melhorar a bioconversão ao produto de interesse.

Carlosama e colaboradores⁷³ verificaram que alterando parâmetros como temperatura, pH e agitação nas fermentações com *Weissella cibaria*, a produção de ácido láctico aumentou de 14,40 para 44,50 g/L. Sendo assim, a *W. thailandensis* tem potencial de produzir ainda mais ácido láctico com ajustes nos parâmetros da fermentação.

Para os experimentos com concentrações iniciais de substrato menores, a bactéria *L. lactis* consumiu aproximadamente 0,14 g (4 g/L) de lactose, produzindo 0,32 g (10 g/L) de ácido láctico com um rendimento de 0,41 g/g e produtividade de 0,32 g/L·h em 24 horas. A melhor condição para a *L. lactis* foi a fermentação com sacarose como fonte de carbono, produzindo 0,38 g de ácido láctico, alcançando um rendimento de 0,44 g/g e produtividade de 0,35 g/L·h em 24 horas. Em todos os experimentos, houve o consumo de 0,3 g de glicose antes de 12 horas de fermentação. A Tabela 9 mostra a produção de ácido láctico e os valores de rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 9 - Produção de ácido láctico e consumo da fonte de carbono para a bactéria *L. lactis* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL.

<i>L. lactis</i> – 10 g/L glicose + 20 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L-h)
Lactose e glicose	10,58 ± 2,09	0,32	0,41	0,32
Sacarose e glicose	12,57 ± 2,34	0,38	0,44	0,35
Glicerol	0,45 ± 0,04	0,14	0,03	-*

*Valor calculado inferior ao erro.

A Figura 26 indica os perfis de consumo de substrato, bem como a produção de ácido láctico. Pelo gráfico obtido, percebe-se que o consumo das fontes suplementares foi pouco expressivo. Nas primeiras 12 horas de fermentação, com o exaurimento da glicose, nota-se a produção do ácido láctico. Mesmo com 96 horas de experimento, a bactéria não metabolizou a fonte suplementar.

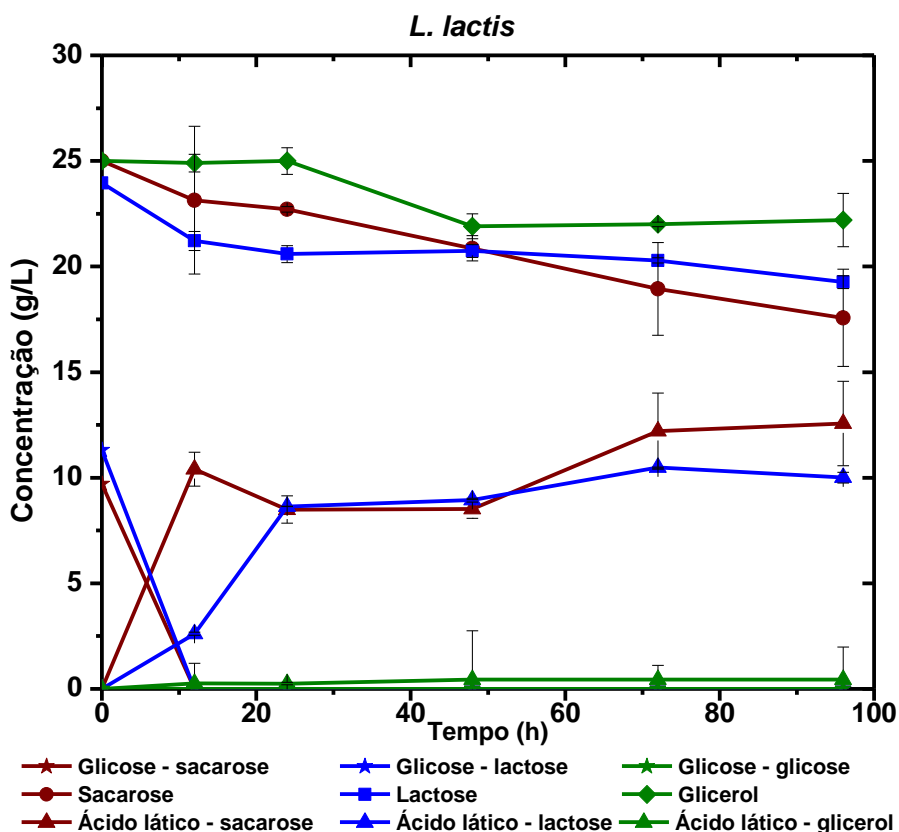


Figura 26 - Produção de ácido láctico com *L. lactis* para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose e 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.

A produção de ácido láctico foi de 12,57 g/L quando reduzimos a quantidade de sacarose e glicose. O rendimento foi 0,44 g/g, sem exaurimento da sacarose. Com maiores concentrações iniciais de fonte de carbono, o rendimento foi maior, alcançando 0,56 g/g.

Nas fermentações com 40 g/L de lactose e 20 g/L de glicose, a produção de ácido láctico chegou a 24,19 g/L com consumo de 0,47 g de lactose e 0,6 g de glicose. Apenas 0,14 g de lactose e 0,3 g de glicose foram consumidos nos experimentos com menores concentrações de substrato, produzindo 10,58 g/L de ácido láctico.

A bactéria *L. lactis* consumiu aproximadamente 0,16 g de glicerol na ausência de glicose, convertendo a 0,45 g/L de ácido láctico. No experimento com glicose, a bactéria foi capaz de metabolizar 0,29 g de glicerol e 0,6 g de glicose, produzindo 17,75 g/L. Neste caso, nota-se que a associação das fontes de carbono favoreceu o consumo do glicerol. Isto pode ser explicado por que em menores concentrações de substrato, a eficiência do metabolismo láctico pode ser favorecida, uma vez que as bactérias conseguem utilizar o açúcar de forma mais eficaz, maximizando a conversão em ácido láctico.

Cock e Stouvenel³⁷ fizeram experimentos com e sem controle de pH e concentrações de glicose variando entre 20 a 110 g/L com *L. lactis subs lactis*. Para o experimento sem controle de pH, a produção máxima de ácido láctico foi de 13,7 g/L utilizando 60 g/L de glicose, quando comparamos com os resultados obtidos neste experimento, resultados próximos foram alcançados, utilizando menos substrato. A associação de glicose com lactose ou sacarose resultaram em produções de 10,58 g/L e 12,57 g/L de ácido láctico, respectivamente.

Souza e colaboradores⁷⁹ também utilizaram a bactéria *L. lactis* e relataram a influência do controle de pH e obtiveram concentrações de ácido láctico semelhantes às apresentadas neste trabalho, eles utilizaram aproximadamente 13 g/L de ácido láctico utilizando 20 g/L de glicose como fonte de carbono em 24 horas de fermentação a 30 °C em biorreator sem o controle de pH, não sendo capaz de exaurir a glicose. Porém, as fermentações nas mesmas condições com controle de pH em 5,0 possibilitaram o consumo total de fonte de carbono, bem como maior produção de ácido láctico (24 g/L).

Para os experimentos com menores concentrações iniciais das fontes de carbono, a bactéria *E. durans* produziu 11,55 ± 0,72 g/L de ácido láctico nas

fermentações com sacarose, alcançando um rendimento de 0,91 g/g e produtividade de 0,18 g/L·h em 48 horas. A melhor condição para a *E. durans* foi a fermentação com lactose como fonte de carbono, produzindo $18,44 \pm 0,62$ g/L de ácido láctico com um rendimento de 0,92 g/g. A Tabela 10 mostra a produção de ácido láctico e os valores de rendimento e produtividade para cada fonte.

Tabela 10 - Produção de ácido láctico e consumo da fonte de carbono para a bactéria *E. durans* em 96 horas de fermentação em tubos de 50 mL

<i>E. durans</i> – 10 g/L glicose + 20 g/L fonte suplementar				
Fonte de carbono	Produção de ácido láctico (g/L)	Produção de ácido láctico (g)	Rendimento Y (g _{AL} /g _{fonte consumida})	Produtividade (g/L·h)
Lactose e glicose	$18,44 \pm 0,62$	0,55	0,92	0,29
Sacarose e glicose	$11,55 \pm 0,72$	0,35	0,90	0,18
Glicerol	$1,10 \pm 0,11$	0,03	0,41	0,02

A Figura 27 mostra os perfis de consumo de ácido láctico, bem como o consumo de substrato. Para a sacarose como fonte de carbono, a bactéria *E. durans* consumiu 0,38 g de sacarose e 0,3 g de glicose, alcançando um rendimento de 0,9 g/g e produtividade de 0,18 g/L·h.

A melhor condição para a *E. durans* foi com lactose como fonte suplementar, sendo capaz de exaurir os açúcares antes de 96 horas de fermentação. Cerca de 0,60 g de lactose e 0,30 g de glicose foram consumidos, com rendimento de 0,92 g/g e produtividade média de 0,29 g/L·h em 48 horas.

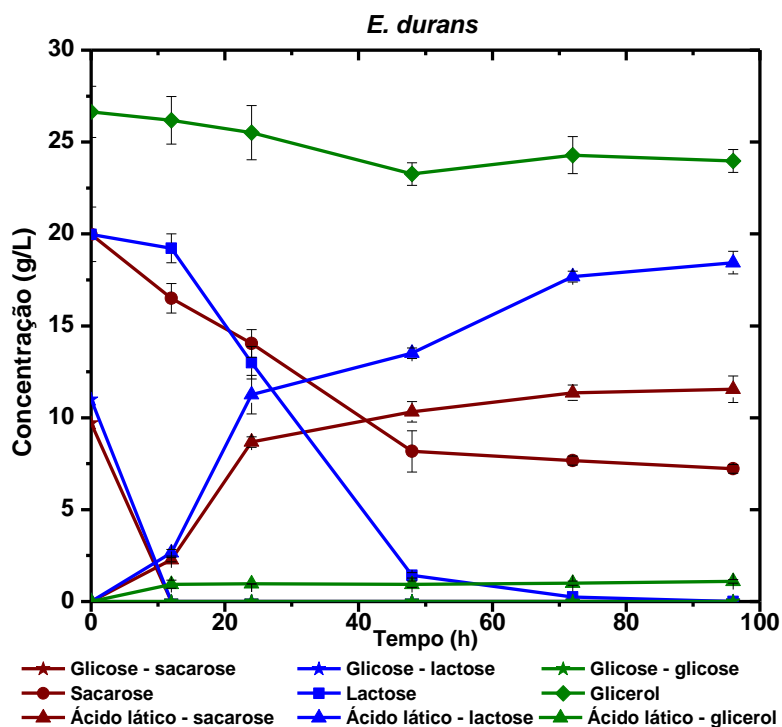


Figura 27 - Produção de ácido láctico com *E. durans* para fermentações com 20 g/L sacarose e 10 g/L glicose, fermentações com 20 g/L lactose 10 g/L glicose e fermentações com 20 g/L de glicerol.

A *E. durans* consumiu aproximadamente 0,8 g de glicerol, produzindo apenas $1,10 \pm 0,11$ g/L de ácido láctico, com rendimento de $0,42$ g/g_{glicerol} e produtividade de $0,02$ g/L·h em 48h. Sem a glicose como fonte de carbono, a bactéria foi capaz de consumir 0,54 g a mais de glicerol do que no experimento com associação das fontes. Além disso, a fermentação utilizando somente glicerol implicou em rendimento maior do que a bioconversão com glicose e glicerol ($0,28$ g/g_{glicose+glicerol}).

Verificou-se uma melhora significativa nas fermentações com *E. durans* e menores concentrações iniciais de fonte de carbono quando comparamos com o experimento com maiores concentrações iniciais de substrato. Para a sacarose, o rendimento foi de $0,17$ g/g para $0,9$ g/g com menores concentrações de substrato inicial. Para a lactose, o rendimento foi de $0,28$ g/g para $0,92$ g/g e a produtividade foi de $0,26$ g/L·h para $0,29$ g/L·h quando a concentração de substrato inicial era menor.

Os resultados obtidos na fermentação com lactose são semelhantes aos relatados por Pessione e colaboradores³⁹, que utilizaram a bactéria *E. faecium* LLAA-1 em fermentações com glicose, produzindo aproximadamente de 18 g/L de ácido láctico, com conversão de aproximadamente 90%.

Com base nos resultados de consumo de lactose e produção de ácido láctico nas fermentações com a *E. durans*, inferiu-se que esta bactéria teria potencial para alcançar maiores produções e rendimentos. A lactose suplementada com glicose seria mantida como fonte de carbono e a *E. durans* foi selecionada como a cepa elite para dar continuidade aos experimentos, com a finalidade de otimizar os parâmetros e produzir o ácido láctico em maiores escalas.

4.1.2.2 Adaptação celular natural com glicerol

Foram realizados 6 ciclos de fermentações com as 4 bactérias com meio MRS modificado suplementado com 20 g/L de glicerol. Os ciclos eram de 96 em 96 horas, os tubos eram centrifugados e o sobrenadante era recolhido para análise. As células eram ressuspensas em um novo meio, com as mesmas concentrações de glicerol. O pH e a biomassa foram medidos ao final de cada ciclo, bem como metabólitos por análises de HPLC, para verificar se havia produção de ácido láctico.

O glicerol não impediu o crescimento das 4 cepas avaliadas, porém, não houve a bioconversão a ácido láctico de maneira significativa. As bactérias *W. thailandensis* e *E. durans* foram as que conseguiram se desenvolver melhor com o glicerol. Apesar de não produzir ácido láctico expressivamente, elas foram capazes de aumentar sua concentração celular.

A maior produção de ácido láctico também foi obtida com a bactéria *E. durans*, alcançando 1,1 g/L em 480 horas de fermentação. O meio tamponado em pH = 7,0 não sofreu acidificação significativa, o que era esperado, devido à baixa produção de ácido láctico.

A bactéria *P. acidilactici* produziu 0,6 g/L de ácido láctico no seu melhor ciclo. Houve crescimento celular no primeiro ciclo, mas se manteve praticamente constante nos outros ciclos. O consumo de glicerol nas primeiras 96 horas de fermentação foi de apenas 0,011 g. A Figura 28 representa os dados obtidos para a *P. acidilactici*.

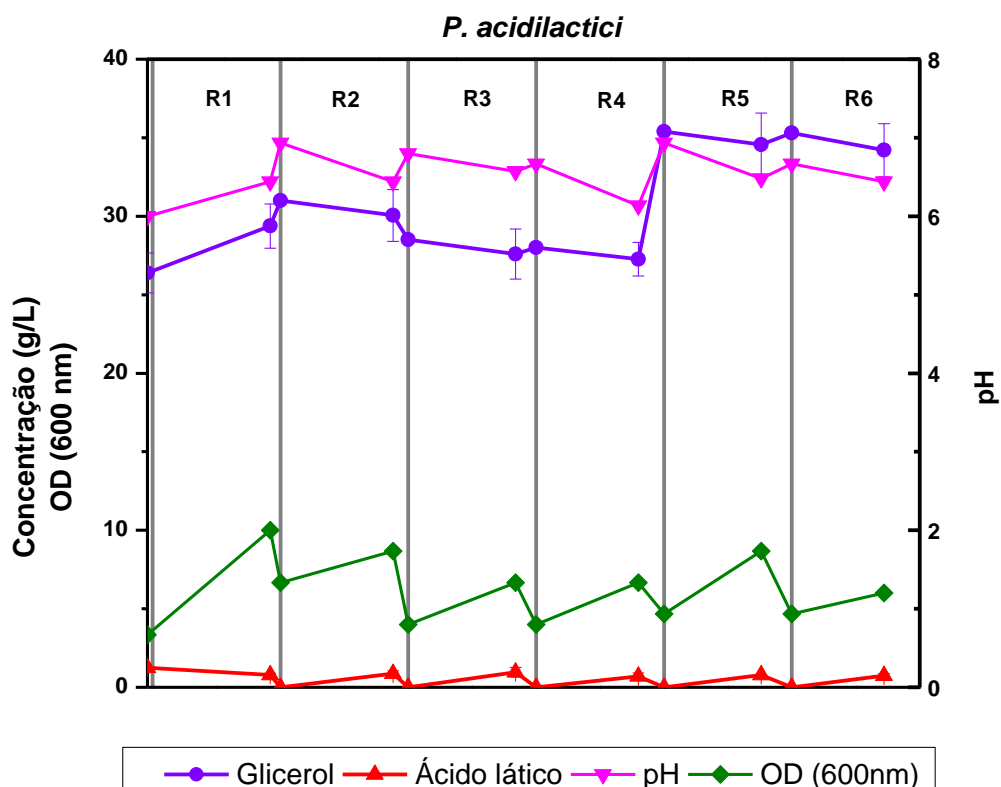


Figura 28 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria *P. acidilactici* em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.

A bactéria *E. durans* teve uma produção de ácido láctico de aproximadamente 1 g/L nos 5 primeiros ciclos e houve crescimento celular. No sexto ciclo, a densidade óptica caiu, assim como a produção de ácido láctico. Ao final do primeiro ciclo, o microrganismo consumiu 0,25 g de glicerol e produziu 0,94 g/L de ácido láctico, assim como representado na Figura 29.

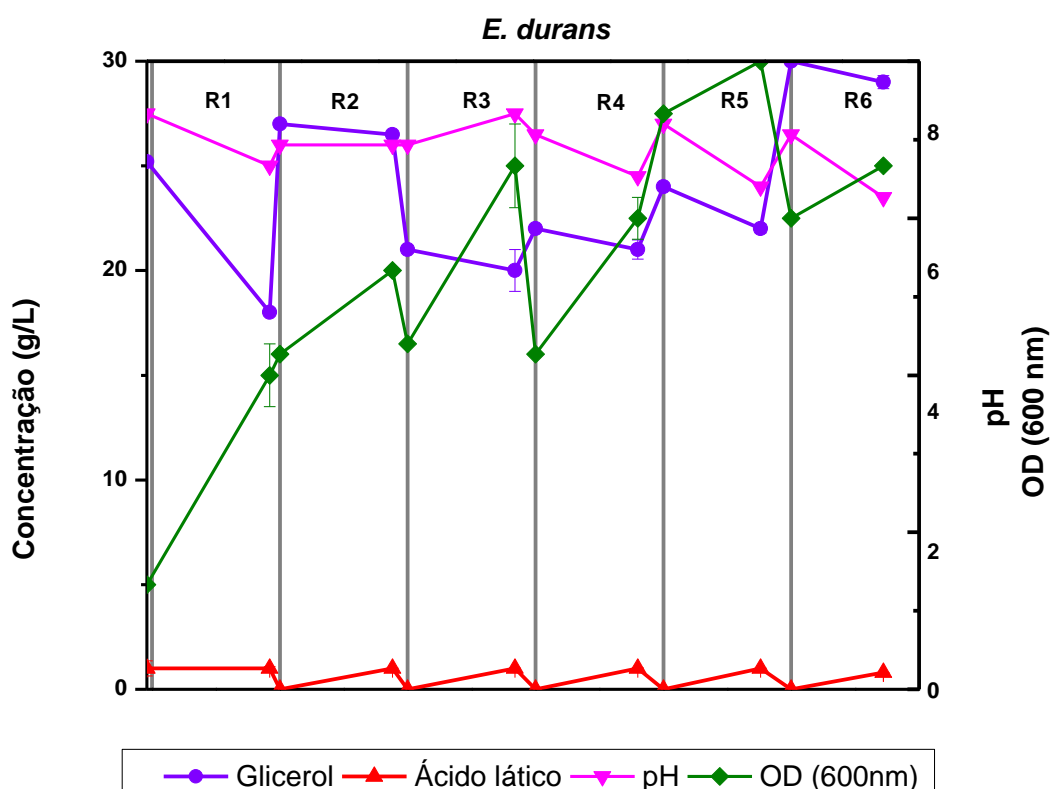


Figura 29 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria *E. durans* em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.

O pH foi minimamente acidificado no decorrer dos ciclos, caindo de 6,76 para 6,57. Dentre as espécies analisadas, a *E. durans* foi a que teve um melhor desempenho na adaptação.

A bactéria *W. thailandensis* teve uma crescente evolução na produção de ácido láctico e no crescimento celular. Ao final do sexto ciclo, ela produziu 0,88 g/L de ácido láctico, mas a partir do quarto ciclo o pH do meio já diminuía. No primeiro ciclo, houve o consumo de 0,041 g de glicerol, produzindo 0,27 g/L de

ácido láctico. Os dados obtidos estão representados na Figura 30.

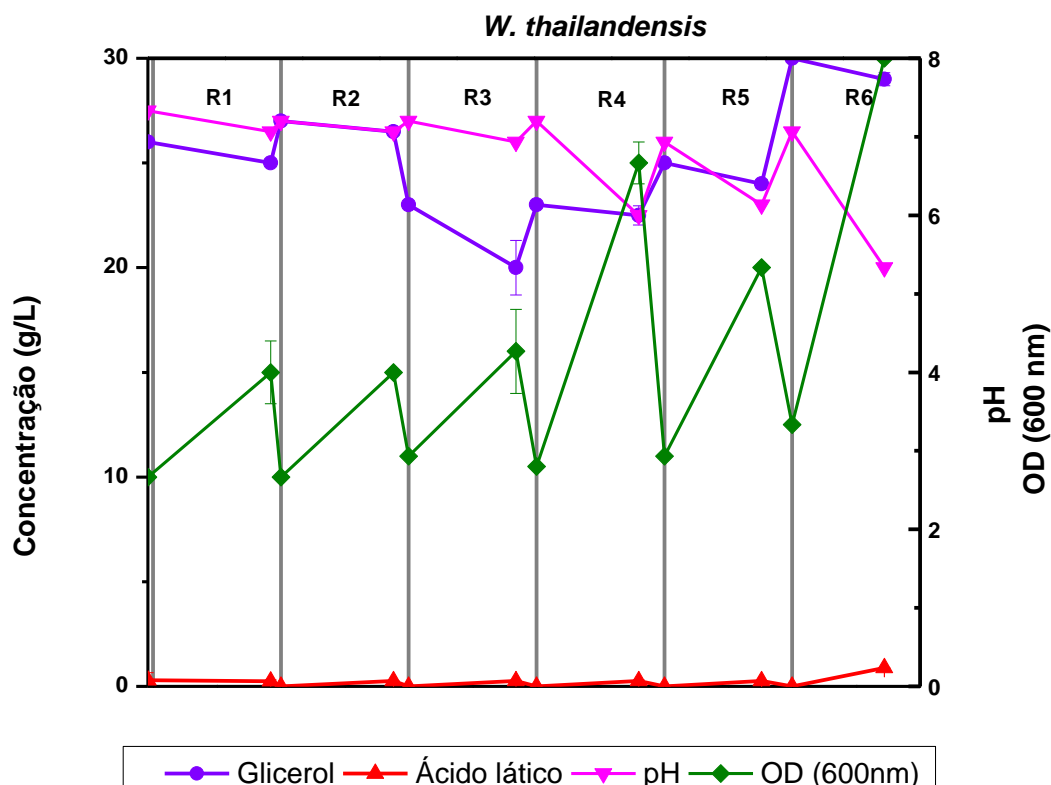


Figura 30 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria *W. thailandensis* em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.

A bactéria *L. lactis* manteve a densidade óptica baixa durante os 6 ciclos. O pH se manteve em torno de 6,7, não sofrendo alterações consideráveis. A maior produção de ácido láctico chegou a 0,6 g/L e o consumo de glicerol foi de 0,028 g. A Figura 31 traz os resultados obtidos.

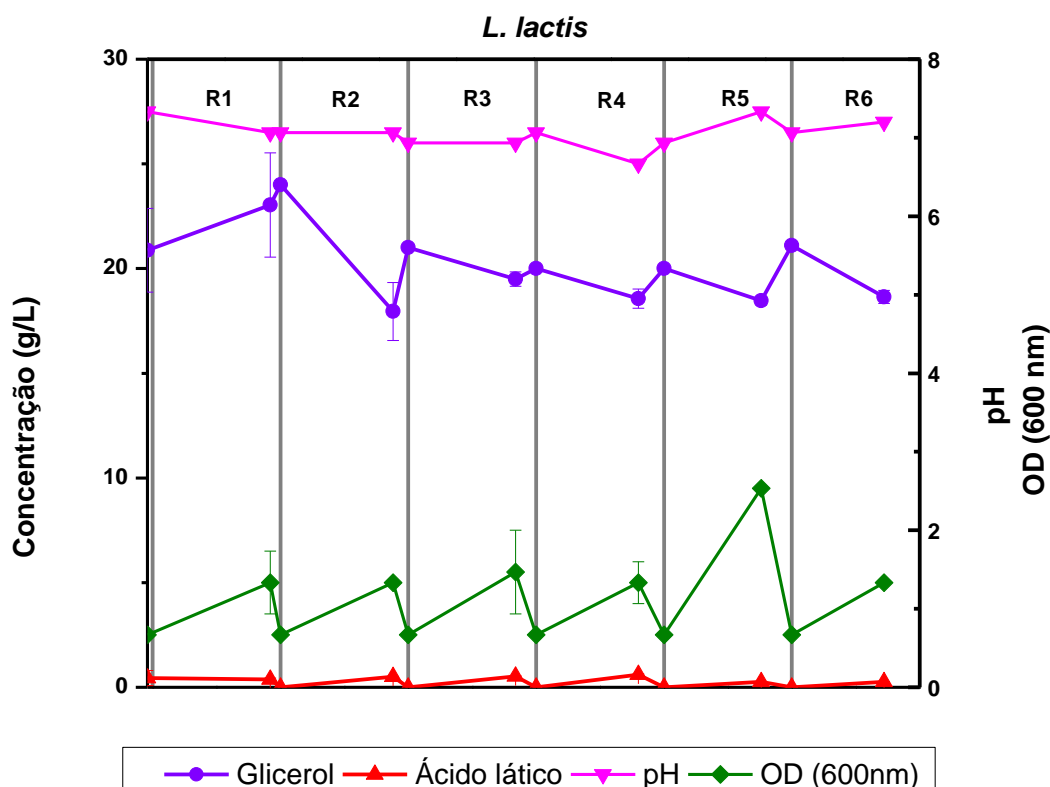


Figura 31 - Produção de ácido láctico, concentração de glicerol, densidade óptica e pH para adaptação celular bactéria *L. lactis* em fermentações de ciclos de 96 horas, representados por R.

Apesar de não ter sido eficiente para a produção de ácido láctico, a adaptação das células resultou em melhoras significativas para o consumo do substrato.

Szymanowska-Powałowska¹¹⁶ estudou o efeito do glicerol no crescimento e no metabolismo da *C. butyricum* DSP1 para produção de 1,3-propanodiol e constatou que as concentrações até 90 g/L para glicerol puro e 70 g/L para glicerol bruto não inibiam a atividade metabólica das células bacterianas. A adaptação da bactéria *C. butyricum* DSP1 para condições de estresse osmótico com elevadas concentrações de substrato foi realizada com cinco ciclos de fermentação, iniciando com 70 g/L de glicerol bruto e seguindo para 90, 110, 130, 150, 170 g/L.

Ainda no estudo de Szymanowska-Powałowska¹¹⁶ utilizando a adaptação em cinco etapas, observou-se que a produção de 1,3-propanodiol melhorou significativamente quando comparada com fermentações com as mesmas concentrações de substrato sem a etapa de adaptação. O glicerol foi

completamente exaurido nos experimentos com 90, 110, 130 e 150 g/L, com produtividades de 1,01, 1,03, 1,09 e 0,74 g/L·h, respectivamente. Para a condição com 150 g/L de glicerol bruto, houve uma produção de 74,2 g/L de 1,3-propanodiol.

4.2 Etapa 2

4.2.1 Avaliação da produção de ácido láctico em diferentes concentrações de lactose com *E. durans* em biorreator

Com base nos resultados obtidos na Etapa 1, verificou-se que a *E. durans* apresentou melhores resultados para produção de ácido láctico, sendo selecionada como a cepa elite para produzir o ácido láctico em maiores escalas e dar continuidade com a Etapa 2.

Este experimento foi realizado em duas condições distintas em duplicata para avaliar a influência da concentração inicial de substrato na produção de ácido láctico e no crescimento celular, sendo a condição 1 10 g/L de glicose e 40 g/L de lactose e a condição 2 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose. A concentração de lactose foi estudada porque, embora a glicose seja o substrato preferencial, o consumo de lactose permitiria que resíduos agroindustriais fossem utilizados como fonte de carbono para produção de ácido láctico.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Para as duas condições, foi observado que a glicose foi praticamente exaurida nas 6 primeiras horas de fermentação (Figura 32). Também foi observado que a densidade ótica se manteve crescente, principalmente nas primeiras 48 horas de fermentação.

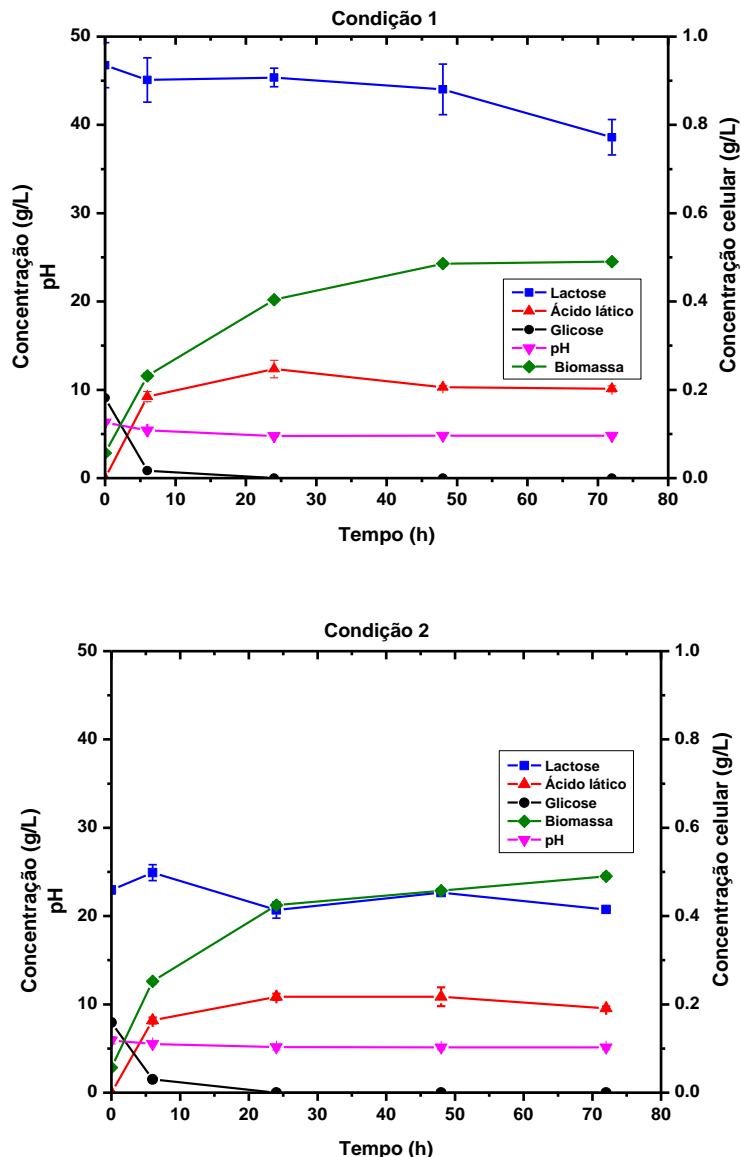


Figura 32 – Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose por *E. durans* em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10 g/L de glicose e 40 g/L de lactose (condição 1) e meio MRS com 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose (Condição 2).

A concentração de ácido láctico teve uma produção acentuada nas primeiras 6 horas de fermentação, coincidindo com o consumo de glicose. O consumo de lactose foi de 4,9 g para a condição 1 e 1,3 g para a condição 2. Comportamento contrário foi observado nas fermentações em tubos, visto que a *E. durans* foi capaz de exaurir a lactose e glicose antes de 96 horas de fermentação no experimento na condição 2.

Ainda na Figura 32, também é possível observar que lactose só começa a ser consumida depois que a glicose é totalmente consumida. Este

comportamento reforça a preferência da bactéria pela glicose.

Conforme indicado na Figura 32, o pH caiu de aproximadamente 6,3 para 5,0 nas primeiras 24 horas de fermentação na condição 1, proporcionalmente à produção de ácido láctico. O perfil do crescimento celular também foi proporcional à produção de ácido láctico.

Para a condição 1, a produtividade média foi de 0,6 g/L.h e rendimento de 0,61 g/g, produzindo $10,11 \pm 0,34$ g/L de ácido láctico ao final da fermentação. O aumento de escala proporcionou uma melhora nos valores de rendimento de produtividade. Os experimentos em escala menor resultaram em rendimento médio de 0,28 g/g e produtividade de 0,12 g/L.h.

Na condição 2, $10,87 \pm 0,36$ g/L de ácido láctico foram produzidos, apresentando rendimento de 0,94 g/g (maior que para a condição 1) e produtividade média de 0,54 g/L.h. Houve uma melhora quando comparamos com as fermentações em menor escala. Nos experimentos realizados em frascos de 50 mL, foi obtido rendimento de 0,92 g/g e produtividade média de 0,24 g/L.h.

A taxa específica de crescimento celular (μ) foi de $0,25 \text{ h}^{-1}$ para a Condição 1 e $0,24 \text{ h}^{-1}$ para a Condição 2. Tal fato pode indicar que a lactose consumida na primeira fermentação foi convertida em crescimento celular, o que justificaria o rendimento menor do que na Condição 2. Jangra e colaboradores¹²⁰ investigaram o efeito das fontes de carbono em μ com *L. plantarum* e descobriram que experimentos com glicose tiveram valores de taxa específica de crescimento mais elevados do que com lactose. Eles encontraram valores de μ de 0,42 para glicose e 0,23 para lactose. Os resultados para lactose foram semelhantes aos alcançados nos estudos descritos nesta tese, corroborando que tal substrato foi utilizado como fonte de carbono para crescimento celular em detrimento da produção do metabólito de interesse.

Com este experimento, verificou-se que maiores rendimentos foram alcançados com menores concentrações iniciais de lactose e glicose e que a bactéria não foi capaz de consumir toda lactose do meio. Observou-se ainda que aproximadamente 20% da lactose inicial foi consumida ao final da fermentação na condição 1 e 10% para a condição 2. Cock e Stouvenel³⁷ relataram o mesmo comportamento para a *L. lactis*. Neste estudo, a cepa de *L. lactis* produziu mais ácido láctico (13,7 g/L) e consumiu mais glicose em concentrações mais baixas

de substrato (20 g/L) alcançando uma produtividade de 0,29 g/L.h. O crescimento celular também estava relacionado à geração de produtos, e o mesmo perfil foi observado no experimento descrito nesta tese.

A associação de glicose e a lactose resultou em produtividade mais expressivas. Experimentos combinando lactose e glicose demonstraram melhor produtividade do que testes preliminares utilizando apenas lactose como fonte de carbono. Isso demonstra a importância de combinar fontes de carbono para o consumo de lactose. Mas e colaboradores apontam que diferentes fontes de carbono podem influenciar o crescimento e a eficiência metabólica de microrganismos, como bactérias lácticas, que são usados na fermentação. A co-utilização de fontes de carbono é uma estratégia que pode ser explorada para uma bioconversão com maior concentração e rendimento.¹²¹

As condições de anaerobiose e reciclo de células foram avaliadas para atestar quais parâmetros devem ser ajustados para maximizar a produção de ácido láctico.

4.2.2 Avaliação da produção de ácido láctico com *E. durans* em condições anaeróbicas em biorreator.

Para avaliar a produção de ácido láctico em condições anaeróbicas, foi realizado um cultivo com injeção de nitrogênio no fermentador. Além disso, como no experimento anterior não houve o total consumo da lactose, optamos por começar com concentrações menores. O meio anaeróbico desfavoreceu o consumo de glicose, que demorou 14 horas a mais para ser exaurida na ausência de oxigênio dissolvido. Pode-se inferir que o oxigênio dissolvido favorece o consumo da fonte de carbono, o crescimento celular e a produção de ácido láctico (Figura 33). O mesmo comportamento foi relatado por Zotta e colaboradores¹²² em que cepas de bactérias lácticas como *L. casei* produziram mais biomassa em cultivos com mais oxigênio dissolvido.

Neste experimento, sugere-se que a ausência de oxigênio levou a inibir a etapa de crescimento das células, direcionando diretamente para o perfil fermentativo. Como resultado, a produção de ácido láctico foi menor do que comparado com os experimentos com fluxo de oxigênio. Isto porque o oxigênio presente no meio nos experimentos sem injeção de N₂ (resultado da agitação)

permite a clivagem da glicose até CO₂ e água com uma maior liberação de energia e, conseqüentemente, maior produção de biomassa.

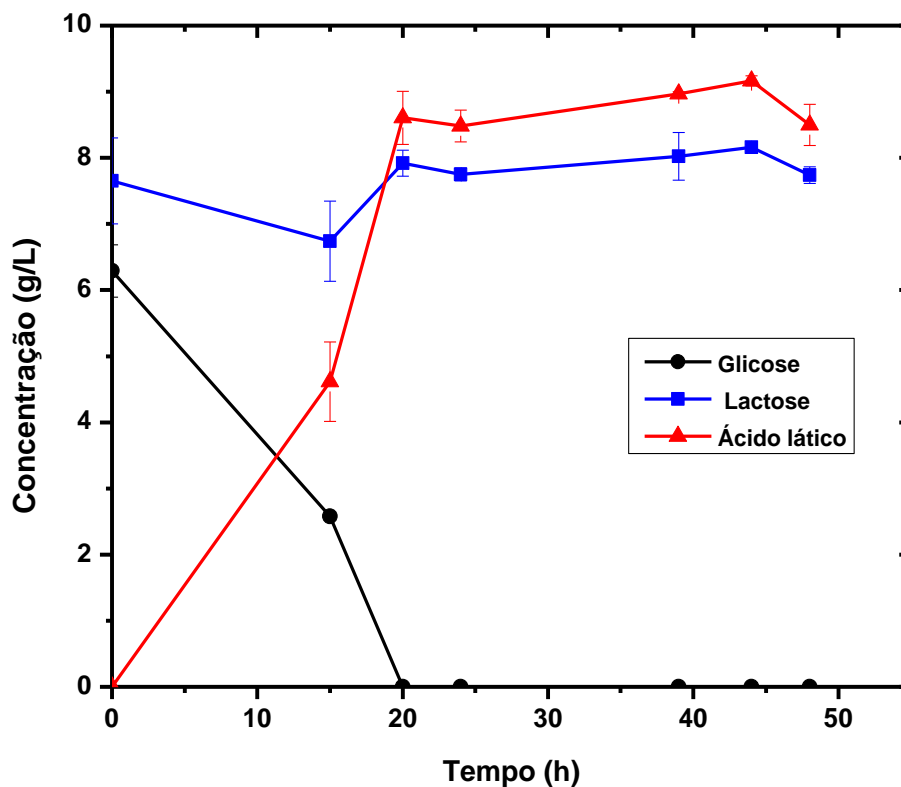


Figura 33 - Produção em condições anaeróbicas de ácido láctico e consumo de lactose e glicose por *E. durans* em fermentações em biorreator de 1 litro com 600 mL de meio MRS suplementado com 10 g/L de glicose e 10 g/L de lactose.

Quando em anaerobiose, a produtividade foi de 0,21 g/L·h e rendimento de 0,69, produzindo $9,17 \pm 0,06$ g/L. Tais valores foram mais baixos que o obtido em condições aeróbicas, evidenciando que a baixa concentração de oxigênio dissolvido prejudicou o desempenho da bactéria. Zotta e colaboradores¹²³ já relataram que condições aeróbicas podem acarretar em aumento na produção metabólitos em bactérias lácticas. Por outro lado, Ge e colaboradores¹²⁴ otimizaram a produção de ácido láctico utilizando a estratégia de suplementação de oxigênio durante a fermentação com cepas recombinantes de *L. casei*. Os autores ainda sugerem que esta estratégia aumenta a produção de ácidos orgânicos de outras cepas, ao regular o fluxo metabólico com o suprimento de oxigênio. Os dados aqui obtidos com *E. durans* estão alinhados com as

constatações de Ge e colaboradores.

A densidade óptica (OD 600 nm) aumentou de 2,15 para 5,1 em 20 horas de fermentação, como representado na Figura 34. O Oxigênio dissolvido (%DO) foi menor que 0,3% durante toda a fermentação, devido a adição de gás nitrogênio ao meio. O pH do meio fermentativo cai de 6,43 para 4,80 em 20 horas de fermentação, se mantendo constante até o final das 48 horas. Tanto a acidificação do pH quanto o crescimento celular se correlacionam com a produção de ácido láctico. Nas 20 primeiras horas de fermentação pH diminuiu e a densidade óptica aumentou com a produção de ácido láctico.

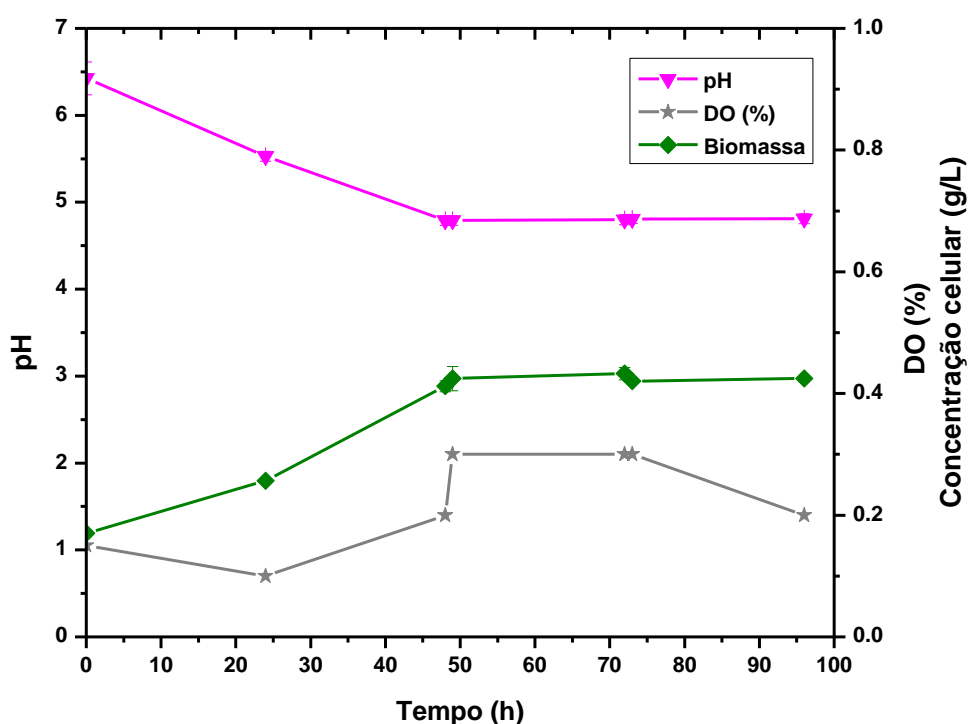


Figura 34 – Correlação entre pH, densidade óptica (OD) e oxigênio dissolvido para *E. durans* em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10g/L de glicose e 10 g/L de lactose em anaerobiose.

A taxa de crescimento específico foi de $0,11 \text{ h}^{-1}$. Como resultado da baixa concentração de oxigênio no meio, o μ foi menor que do experimento sem adição de nitrogênio, assim como a produção de ácido láctico e concentração celular. Tal fato enfatiza que a disponibilidade de oxigênio é um fator limitante para o crescimento da bactéria estudada. Isso reforça a consistência dos resultados, mostrando que diferentes cepas de bactérias lácticas podem responder de maneira similar à variação na disponibilidade de oxigênio, como o relatado por

Zotta e colaboradores ¹²² em que cepas de bactérias lácticas obtiveram melhores performances em meios aeróbicos.

4.2.3 Avaliação da produção de ácido láctico com *E. durans* com reciclo de células em biorreator

Observou-se que os experimentos realizados com células adaptadas produziam mais ácido láctico. Neste experimento, foi utilizando como inóculo para a segunda batelada de fermentação as células remanescentes da primeira fermentação. Como o sistema sem adição de nitrogênio se mostrou mais eficiente, optou-se por não injetar nitrogênio no meio fermentativo. Foram realizadas fermentações com 10 g/L de glicose e 20 g/L de lactose, o inóculo foi realizado com uma densidade óptica (OD) de 3,5 para a primeira fermentação e 4,6 para a segunda. O inóculo da segunda fermentação utilizou as células da bactéria crescida na primeira com um novo meio com 20 g/L de lactose.

Nas primeiras 24 horas de fermentação a glicose já foi completamente consumida. A densidade óptica aumentou durante toda a fermentação e mesmo ao final da fermentação, com um pH 3,5, a bactéria não sofreu inibição pelo ácido láctico produzido. Após as 72 horas de fermentação houve uma maior taxa de consumo de lactose. A produtividade foi de 0,17 g/L·h e um rendimento de 0,87 g/g na primeira batelada. A Figura 35 mostra os resultados obtidos nas duas bateladas.

A Figura 35 mostra a correlação da produção de ácido láctico com o crescimento celular, pela densidade óptica para a primeira batelada. É possível verificar que a produção de ácido láctico aumenta proporcionalmente com o aumento de células no meio fermentativo, reforçando a tendência observada nos experimentos anteriores. No primeiro ciclo, a glicose foi adicionada ao meio para promover o crescimento celular e lactose para iniciar a adaptação celular. Depois da adaptação no primeiro ciclo, apenas a lactose foi empregada como fonte de carbono para o segundo ciclo, e observou-se aumento no crescimento celular. A lactose foi exaurida no segundo ciclo, maximizando a conversão de lactose em ácido láctico. O segundo ciclo resultou ainda em uma maior concentração celular, visto que as células adaptadas do ciclo anterior foram utilizadas no processo. Uma vez alcançada a assimilação da lactose, espera-se que o soro de leite seja uma fonte de carbono alternativa promissora para produção de ácido láctico *com*

E. durans. Tal resíduo já foi utilizado em fermentações por Joulak e colaboradores como única fonte de carbono.¹²⁵

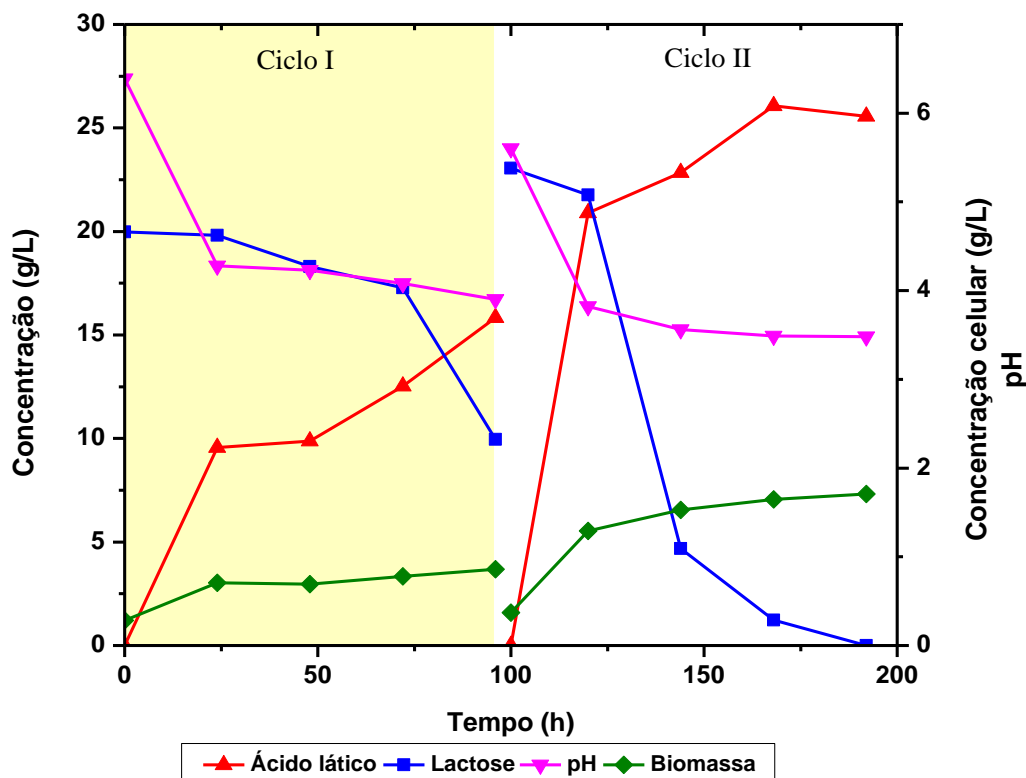


Figura 35 - Produção de ácido láctico, consumo de lactose, pH e densidade óptica para a bactéria *E. durans* em fermentações com reciclo de células obtidas da fermentação em biorreator de 1 litro. Cada ciclo de 96 horas.

Quando comparamos com a primeira batelada, percebemos que o microrganismo adaptado favoreceu o consumo de lactose. Em 48 horas da segunda fermentação 80% da lactose já havia sido consumida. Na primeira batelada 8,4% da lactose foi consumida em 48h. Em 96 horas da segunda fermentação, a fonte de carbono foi exaurida. A produtividade foi de 0,36 g/L·h em 72 h e com rendimento de 0,80 g/g na segunda fermentação.

A taxa específica de crescimento foi de 0,12 h⁻¹ para o primeiro ciclo e de 0,93 h⁻¹ para o segundo. O uso de células adaptadas resultou no aumento da produção de ácido láctico. Embora o valor do segundo ciclo tenha sido inferior ao valor encontrado na literatura para *Lactococcus lactis* NZ133 com lactose (1,10 h⁻¹),¹²⁶ o aumento significativo entre os ciclos destaca o potencial da bactéria após adaptação.

Com o reciclo de células, a produção de ácido láctico chegou a 26,07 g/L. Isto significa que em fermentações com as mesmas condições, utilizando células adaptadas, a produção aumentou 10 g/L e a produtividade foi de 0,17 g/L·h para 0,36 g/L·h.

Neste experimento, verificou-se que o reciclo de células já ambientadas com a lactose produziram mais ácido láctico. Tal comportamento também foi observado por Aso e colaboradores (2019) em fermentações com *E. coli* modificadas, em que produziram 0,6 g/L de ácido láctico em batelada simples e 5 g/L com reciclo de células.⁵⁰

4.2.4 Avaliação da produção de ácido láctico com *E. durans* com alimentação com pulso e controle de pH em biorreator

A literatura reporta vários trabalhos onde o controle de pH foi fundamental para o aumento da produção de ácido láctico, neste sentido este experimento foi conduzido para avaliar a influência desta variável nas fermentações com a *E. durans*. O controle de pH em 5,0 otimizou o crescimento celular e a densidade óptica alcançou os maiores valores para a *E. durans* neste experimento, chegando a 12. Com 24 horas de fermentação, a glicose foi totalmente consumida e a bactéria passou a consumir a lactose.

Em 48 horas, a lactose já havia sido exaurida e foi suplementado 60 mL de solução estoque de 100 g/L (6 gramas de lactose) até atingir uma concentração de aproximadamente 10 g/L. O mesmo aconteceu em 72 horas de fermentação. Assim, percebeu-se que na ausência de glicose, a bactéria foi induzida a consumir mais lactose em pH controlado em 5,0. As Figuras 36 e 37 mostram os resultados obtidos.

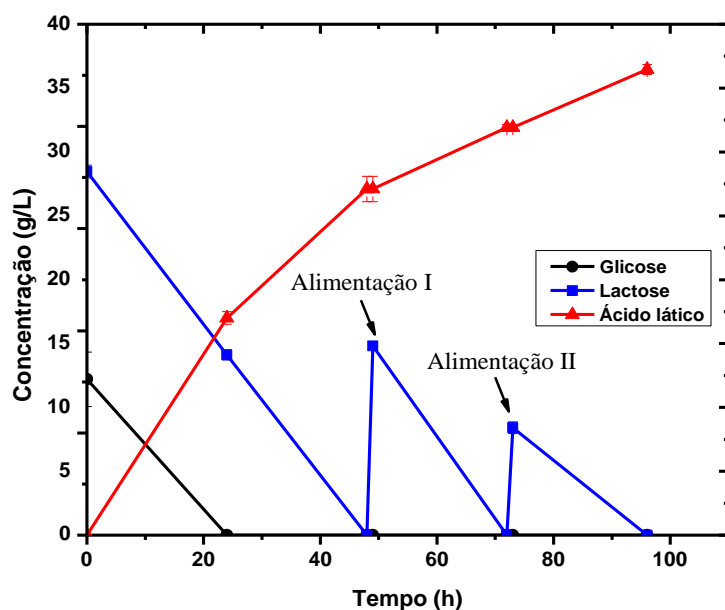


Figura 36 - Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose para a bactéria *E. durans* em fermentações com controle de pH = 5,0 em biorreator de 1 litro.

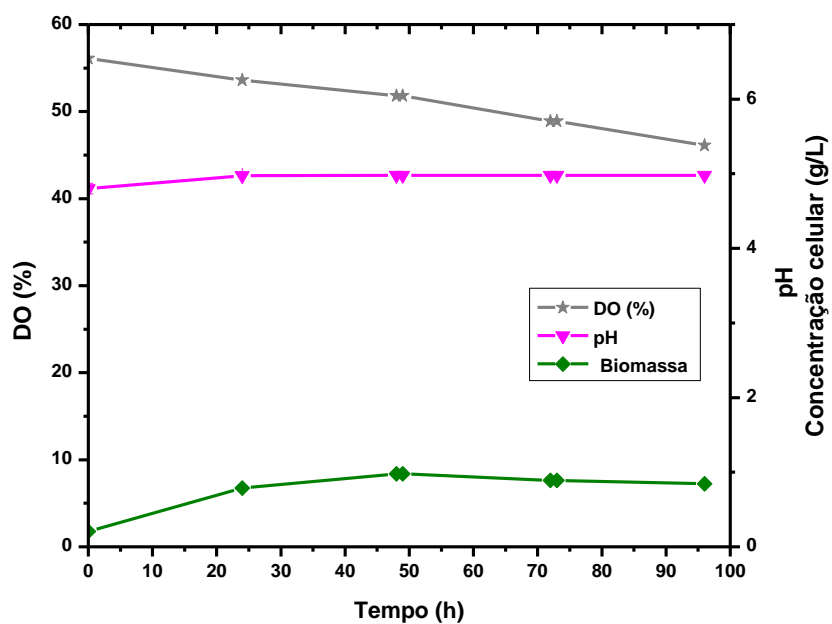


Figura 37 - Correlação entre pH, densidade óptica (OD) e oxigênio dissolvido para *E. durans* em fermentações em biorreator de 1 litro com meio MRS com 10 g/L de glicose e 10 g/L de lactose.

Assim como foi relatado por Cock e Stouvenel (2006)³⁷, a adição de soluções básicas (KOH 2 M) para que o pH se mantenha na melhor faixa de

operação permitiu a obtenção maiores concentrações de ácido láctico do que as obtidas sem esse controle.

A produção de biomassa, por sua vez, foi semelhante ao experimento sem controle de pH em 48 horas. Porém, o controle de pH permitiu que uma mesma concentração celular produzisse mais ácido láctico em pH 5,0. Ao analisar o ponto de 24 horas (antes da suplementação de lactose), podemos considerar uma fermentação em batelada. É importante notar que as bactérias produziram aproximadamente 8,5 g/L a mais de ácido láctico durante o mesmo período de fermentação com controle de pH do que no mesmo período sem controle.

Com o controle de pH, houve um acréscimo de aproximadamente 10 g/L da produção de ácido láctico. Além disso, o consumo da fonte de carbono também foi favorecido e todo açúcar consumido ao final da fermentação. A produtividade média foi de 0,38 g/L·h e também foi maior que os experimentos anteriores sem o controle de pH. O rendimento foi de aproximadamente 0,57 g_{AL}/g_{açúcar}.

O controle de pH alcançou maiores valores de produtividade quando comparado com a adaptação celular. Porém, o reciclo de células possibilitou um melhor consumo de lactose e melhor rendimento. A Tabela 11 apresenta os valores de produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para cada experimento em biorreator de 1 litro.

Tabela 11 – Comparação dos valores de produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para cada experimento em biorreator de 1 litro.

Modo de operação	Ácido láctico (g/L)	Rendimento (g·g ⁻¹)	Produtividade (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Batelada	10,87	0,94	0,54
Batelada em Anaerobiose	9,17	0,69	0,21
Reciclo de células	26,07	0,82	0,36
Batelada com pulso e controle de pH	36,47	0,57	0,38

Hassan e colaboradores⁶⁶ relataram que produziram ácido láctico a partir da fermentação com *E. durans* usando cascas de banana como substrato, chegando a 28,8 g/L. Neste trabalho, obtivemos melhores produções com o mesmo microrganismo, alcançando 36,47 g/L de ácido láctico utilizando lactose e glicose como fonte de carbono e controle de pH em 5,0.

4.2.5 Avaliação da produção de ácido láctico com *E. durans* em biorreator de 5 Litros com múltiplos pulsos de alimentação

Para verificar se o processo manteria as condições de produção de ácido láctico e consumo de lactose em escalas maiores, foi também utilizado um biorreator de fermentação em 5 litros. Com o intuito de alcançar maiores concentrações na produção de ácido láctico, foi realizada uma batelada com múltiplos pulso de alimentação da fonte de carbono. O reciclo de células ter se mostrado uma técnica com rendimentos e produtividades maiores para a produção de ácido láctico, mas os múltiplos pulsos de alimentação proporcionariam maiores concentrações finais de ácido láctico produzido.

O pH foi mantido em 5,0 com adição de KOH 5M no meio e valores de densidade óptica mais expressivos foram alcançados, chegando a 21 em 78 horas de experimento. Com 7 horas de fermentação, a glicose já tinha sido praticamente exaurida e a bactéria passou a metabolizar a lactose.

As alimentações foram realizadas de forma que a concentração de lactose no meio fermentativo fosse aproximadamente 20 g/L durante todo o processo. Com 31 horas de fermentação, 160 mL de solução estoque de 150 g/L de lactose foram adicionados ao meio (24 gramas de lactose) até atingir uma concentração de aproximadamente 23 g/L. O mesmo aconteceu em 53, 78 e 96 horas de fermentação. A bactéria foi capaz de esgotar a fonte de carbono ao final das 144 horas de fermentação. As Figuras 38 e 39 mostram os resultados obtidos.

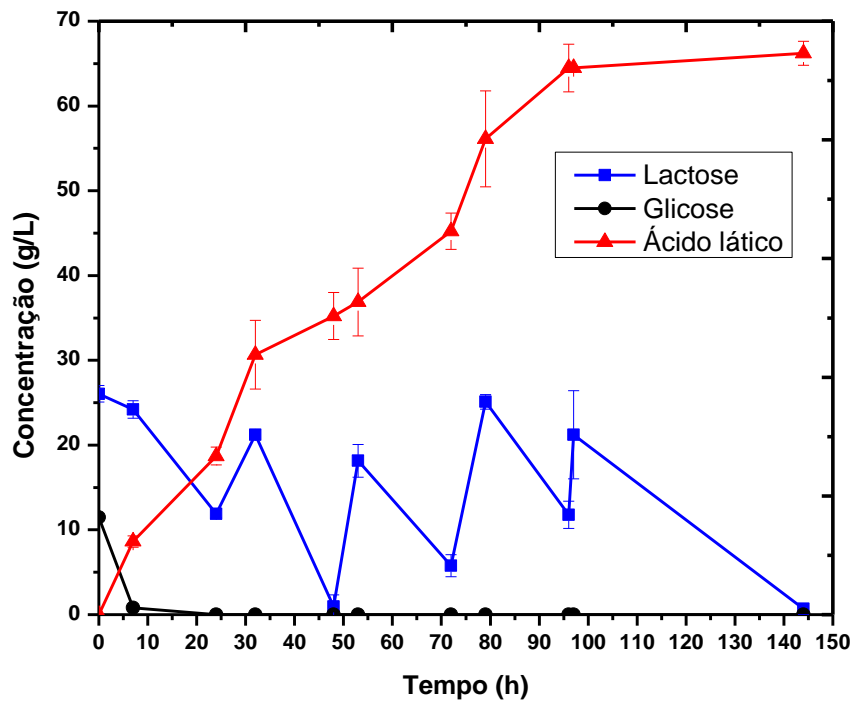


Figura 38 - Produção de ácido láctico e consumo de lactose e glicose para a bactéria *E. durans* em fermentações com controle de pH = 5,0 em biorreator de 5 litros e alimentação em pulsos.

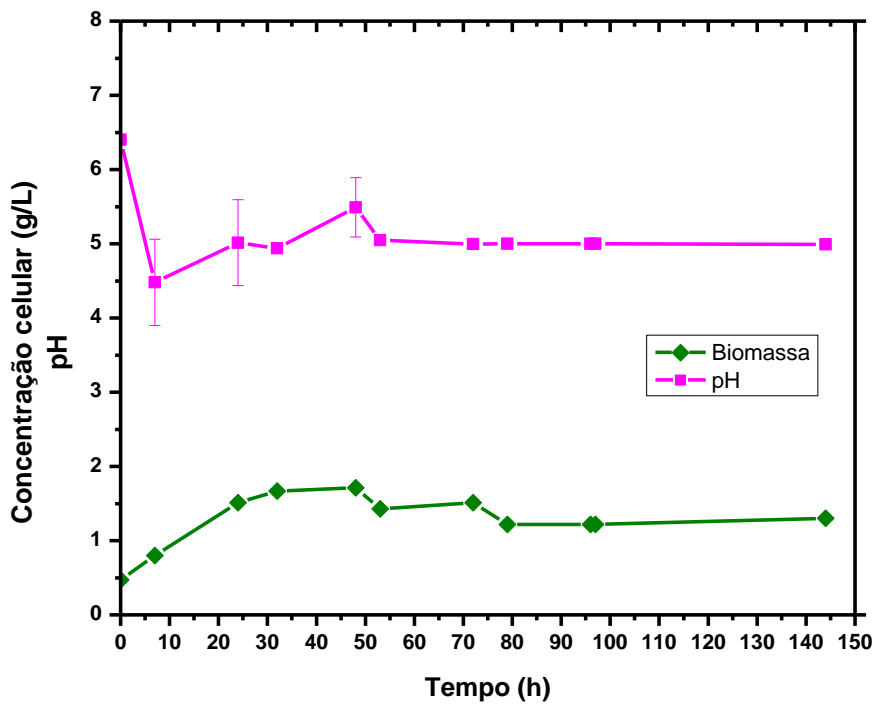


Figura 39 - Correlação entre pH e biomassa para *E. durans* em fermentações em biorreator de 5 litros.

Ao analisar o ponto de 24 horas (antes da suplementação de lactose), verifica-se que a produção de ácido láctico e de biomassa foi semelhante ao experimento de múltiplos pulsos de alimentação em biorreatores de 1 litro. O aumento de volume não impactou negativamente a fermentação.

A produtividade foi de 0,46 g/L·h ao final da fermentação e de 1,23 g/L·h em 7 h de processo. O rendimento foi de aproximadamente 0,21 g_{AL}/g_{açúcar}. O aumento de escala possibilitou uma produção de aproximadamente 8 litros de meio fermentativo com 66,23 ± 0,67 g/L de ácido láctico após somar os volumes das duplicatas.

Alfano e colaboradores¹²⁷, por sua vez, demonstraram que o soro do leite de búfala é um resíduo rico em lactose. Os autores testaram tal efluente como substrato de fermentações com cepas de *L. fermentum*, obtendo 10 g/L de ácido láctico a partir de 16,4 g /L de açúcar. Após o tratamento do soro, foi obtido um pó que continha 44% de lactose (m/v), que foi utilizada como fonte de carbono. Uma vez que a *E. durans* foi isolada do leite de búfala, há indícios que esse resíduo tem potencial para ser utilizado como fonte de carbono. Espera-se que resultados semelhantes sejam alcançados ao utilizar a lactose proveniente do soro do leite ou a lactose comercial.

4.2.6 Purificação do ácido láctico obtido por processo fermentativo

Após a etapa de concentração, o meio concentrado foi submetido a dois métodos de purificação diferentes. Para o método de precipitação com carbonato de cálcio, a maior recuperação do ácido láctico (84,48 %) precipitado como lactato de cálcio na condição em que o carbonato de cálcio foi de 5 mols para 1 de ácido láctico no meio. Porém, para a condição (5:1) a pureza do ácido láctico foi a menor (16,95%) devido a formação de gesso. Ainda nest método, com a proporção de 3:1 de carbonato de cálcio, 47,03% do ácido láctico foi recuperado no precipitado, com uma pureza de 46,78%. Enquanto uma maior proporção de carbonato de cálcio aumenta a recuperação do ácido láctico, também aumenta a precipitação de impurezas com o gesso, reduzindo assim a pureza do produto. Por outro lado, uma menor proporção de carbonato de cálcio resulta em uma maior pureza do ácido láctico, mesmo que a recuperação seja menor. Tal fato ilustra a complexidade envolvida na purificação do ácido láctico.

A purificação usando o método de precipitação com etanol foi alterada, pois o contato do carvão com o meio fermentativo para remoção de pigmentos resultou na adsorção de aproximadamente 72,88% do ácido láctico no carvão ativo. Assim, a etapa de clarificação com carvão ativo não foi realizada nos testes posteriores.

Para a precipitação com etanol sem correção de pH, 50,07% do ácido láctico foi recuperado no precipitado, obtendo o maior valor de pureza (94,04%) entre os testes realizados. Com este método, valores altos de pureza foram alcançados, que é a condição ideal para utilização deste produto na síntese de polímeros. A precipitação com etanol com correção de pH obteve desempenho pior, com 39,97% de recuperação do ácido láctico e pureza de 4,85%. A Tabela 12 traz os resultados de recuperação e pureza obtidos nos experimentos testados.

Tabela 12 - Resultados de pureza e recuperação do ácido láctico para os métodos de precipitação com carbonato de cálcio, com etanol e carvão ativo.

Condição	Precipitado			Sobrenadante	
	Peso médio ácido láctico (g)	Pureza do ácido láctico (%)	Recuperação ácido láctico (%)	Peso médio ácido láctico (g)	Recuperação ácido láctico (%)
(CaCO ₃ 5: AL 1)	0,4954	16,95	84,48	0,0910	15,52
(CaCO ₃ 3: AL 1)	0,2449	46,78	47,03	0,3106	52,97
Precipitação com etanol	0,3026	94,04	50,07	0,2838	49,93
Precipitação com etanol e correção de pH	0,2264	4,85	39,97	0,3400	60,03
Carvão ativo	0,4274	*	72,88	0,1590	27,12

*Valor não calculado

O método de purificação de ácido láctico por precipitação com etanol apresentou percentual de recuperação um pouco menor do que o relatado por Alvarado-Morales e colaboradores⁹¹, que utilizaram nanofiltração e obtiveram uma recuperação de 65,0% do ácido láctico.

Os resultados obtidos pelas técnicas de precipitação com etanol, com carbonato de cálcio e carvão ativo ainda são menores quando comparados aos resultados com resinas de troca iônica. Por exemplo, Ahmad e colaboradores⁹⁶ utilizaram as resinas Amberlite IRI-67 e IR-120 para recuperar ácido láctico com

capacidade máxima de adsorção de 150 mg/g com a resina aniônica com 91% de recuperação de ácido láctico e 94,6% de pureza óptica.

Para os ensaios de purificação com troca iônica, foram testadas duas resinas amplamente utilizadas para purificação de ácidos orgânicos. Nos ensaios com a Resina Amberlite IR-120 H⁺, que é catiônica, foram testaram 2 condições de concentração inicial de ácido láctico na solução de carregamento (30 e 90 g/L). Nenhum eluente foi utilizado neste método, pois o ácido láctico não se adsorve na resina. A Amberlite IR- 120 é uma resina de troca catiônica fortemente ácida que contém grupos funcionais de ácido sulfônico. Os íons hidrogênio (H⁺) que estão ligados ao grupo funcional da resina se ligam ao lactato, convertendo-o a ácido láctico na solução. Ao mesmo tempo, o cátion de o sal de lactato será transferido para a resina de troca catiônica e transformado através da reação: $P-H^+ + \text{cátion}^+ \text{-lactato}^- \rightarrow P\text{-cátion}^+ + H^+ \text{-lactato}^-$, onde P é a matriz polimérica da resina.⁹⁷ Os resultados do experimento estão de acordo com o relatado por Zaini e colaboradores. A recuperação do ácido láctico se manteve alta em todas as condições, chegando a 97,95%, conforme indicado na Tabela 13. A pureza máxima de 73,18% foi alcançada para as condições 33,36 g/L de ácido láctico no carregamento e uma vazão de 2,5 mL/min na coluna de vidro.

Para a resina de base fraca Amberlite IRA-67 (Cl⁻), de acordo com Bayazit e colaboradores¹²⁸, ocorre uma reação de neutralização durante a adsorção de um ácido orgânico sobre o acrílico Amberlite IRA-67, no qual se forma um complexo ácido-amina, $n(R-N) + AH_n \leftrightarrow R-(NH^+)_nA^{n-}$: onde n é o número de grupos ionizáveis da molécula de ácido AH_n, R-N é a amina terciária Amberlite IRA-67 e $(R - NH^+)_nA^{n-}$ significa o complexo ácido-amina.

Como já era conhecido a capacidade de adsorção máxima de 134,2 mg/g⁹⁸, optamos por trabalhar com valores abaixo da capacidade máxima para não saturar os sítios.

Tabela 13 – Experimentos de Troca iônica com as Resinas comerciais Amberlite IR-120 H⁺ e IRA-67 Cl⁻ e suas respectivas recuperações e purezas.

Método	Pureza (%)	Recuperação (%)
--------	------------	-----------------

Resina IR-120 H ⁺	3mL de carregamento a 92,4 g/L. Coluna fixa a 2,5 mL/min	62,19	89,85
Resina IR-120 H⁺	46 mL de carregamento a 33,36 g/L. Coluna fixa a 2,5 mL/min	73,18	97,95
Resina IR-120 H ⁺	50 mL de carregamento a 28,89 g/L. Coluna fixa a 2,5 mL/min	64,17	92,15
Resina IRA-67 Cl ⁻	34 mL de carregamento a 39,01 g/L. 8 mL/min no carregamento e 2,5 mL/min eluição.	76,33	66,25
Resina IRA-67 Cl ⁻	37 mL de carregamento a 22,53 g/L . 9 mL/min no carregamento e eluição.	87,47 (início) 85,03 (meio) 35,48 (fim)	87,02
Resina IRA-67 Cl ⁻	34 mL de carregamento a 39,01 g/L e 20 min no béquer	81,37	57,19
Resina IRA-67 Cl ⁻	27 mL de carregamento a 34,63 g/L e 40 min no béquer	74,51	99,22
Resina IRA-67 Cl ⁻	37 mL de carregamento a 22,53 g/L e 10 min no béquer	27,42 (início) 87,9 (meio) 69,24 (fim)	93,88
Resina IRA-67 Cl ⁻	35 mL de carregamento a 12,22 g/L e 20 min no béquer	76,74	44,34
Resina IRA-67 Cl ⁻	35 mL de carregamento a 14,05 g/L e 20 min no béquer	87,19	24,20
Resina IRA-67 Cl⁻	35 mL de carregamento a 14,05 g/L e 20 min no béquer	94,59	23,86
Resina IR-120 H ⁺ associada a IRA-67 Cl ⁻	3 mL a 92,4 g/L na IR-120 H ⁺ e 120 mL de carregamento a 2,06 g/L na IRA-67 Cl ⁻ . Coluna fixa a 2,5 mL/min	75,38	85,98
Resina IR-120 H⁺ associada a IRA-67 Cl⁻	50 mL a 56,14 g/L na IR-120 H⁺ e 127 mL de carregamento a 9,82 g/L na IRA-67 Cl⁻. Coluna fixa a 2,5 mL/min	84,53	75,37
Resina IRA-67 Cl ⁻ associada a IR-120 H ⁺	30 mL de carregamento a 46,54 g/L na IRA-67 Cl ⁻ e 142 mL a 9,67 g/L na IR-120 H ⁺ . Coluna fixa a 2,5 mL/min	60,33	83,02
Resina IRA-67 Cl⁻ associada a IR-120 H⁺	30 mL de carregamento a 55,42 g/L na IRA-67 Cl⁻ e 16 mL a 38,95 g/L na IR-120 H⁺. Coluna fixa a 2,5 mL/min	91,42	94,60
Resina IRA-67 Cl ⁻ associada a IR-120 H ⁺	37 mL de carregamento a 42,62 g/L na IRA-67 Cl ⁻ e 16 mL a 41,17 g/L na IR-120 H ⁺ . Coluna fixa a 2,5 mL/min	64,35	99,19
Resina IRA-67 Cl ⁻ associada a IR-120 H ⁺	36 mL de carregamento a 45,19 g/L na IRA-67 Cl ⁻ e 17 mL a 62,03 g/L na IR-120 H ⁺ . Coluna fixa a 2,5 mL/min	75,02	82,13
Resina IRA-67 Cl ⁻ associada a IR-120 H ⁺	36 mL de carregamento a 45,19 g/L na IRA-67 Cl ⁻ em 4 h no béquer e 16 mL a 20,73 g/L na IR-120 H ⁺ a 2,5 mL/min	76,23	43,61

O ácido clorídrico foi amplamente estudado com eluente para purificação de ácido láctico com a resina IRA-67 (Cl⁻)⁹⁷. Contudo, sabe-se que tal ácido tem alto poder de degradar a matriz da resina. Sendo assim, outras soluções são

estudadas para tal finalidade, visando minimizar danos à resina. como Gao e colaboradores ¹²⁹ que avaliaram NaOH, NH₄OH e Na₂CO₃ como eluentes em diferentes concentrações para a mesma finalidade. A eluição com bicarbonato de amônio alcançou resultados promissores. Nós optamos por utilizar o bicarbonato de amônio como eluente, pois estudos com este eluente apresentaram elevadas purzas para ácidos carboxílicos como o 2,5-piridinodicarboxílico (2,5-PDCA).

A Tabela 13 sintetiza as condições de operação de troca iônica relacionadas com as respectivas recuperações e purzas, em que foram avaliados diferentes fluxos e métodos de carregamento, bem como diferentes concentrações iniciais de ácido láctico no meio fermentativo para 2 resinas comerciais: Amberlite IR-120 H⁺ e IRA-67 Cl⁻.

Para a resina IRA-67Cl⁻, foi observado que o ácido láctico foi completamente recuperado para eluições mais lentas (2,5 mL/min). Porém, a maior pureza foi obtida com eluições mais rápidas (9 mL/min) alcançando 87,47% de pureza e 87,02 % de recuperação. Tal constatação pode ser relacionado ao fato de que, em fluxos de eluição mais baixos, mais impurezas são adsorvidas. Um fluxo mais rápido reduz o tempo de contato do meio fermentativo com a resina, resultando em menor interação dos contaminantes com a matriz.

O carregamento no béquer, por sua vez, possibilitou purzas mais elevadas, porém, a recuperação foi mais baixa, uma vez que o ácido láctico se adsorve mais fortemente a resina e o eluente não foi capaz de fazer a dessorção completa. Uma pureza de 94,59% foi alcançada usando a técnica de carregamento por 20 min em béquer, seguido por eluição em coluna de vidro.

Quando associadas, o melhor resultado alcançado foi de 91,42% de pureza e 94,60% de recuperação do ácido láctico. O meio fermentativo de 39,95 g/L passou primeiramente pela IRA-67 Cl⁻ seguindo para IR-120 H⁺ a uma vazão constante de 2,5mL/min. Zaini e colaboradores ⁹⁷ já haviam explorado as duas resinas em conjunto, porém utilizando primeiro a 120 H⁺ como uma etapa de acidificação. A pureza do ácido láctico obtido por Zaini foi de 91,8 % com 80,4% de recuperação, similar ao obtido com a ordem inversa. Entretanto, obtivemos uma recuperação maior ao alternar a ordem das colunas utilizadas.

Gao e colaboradores¹²⁹ demonstraram que independente da concentração ácido láctico, a adsorção foi por difusão intrapartícula. Com o objetivo de avaliar o perfil de dessorção, a eluição foi dividida em 3 partes, coletando alíquotas no início, no meio e no fim da eluição e avaliando a pureza em cada parte separadamente. Para os experimentos com carregamento em coluna de vidro, a pureza no início da eluição foi de 87,47%, caindo para 85,03% no meio e 35,48% no fim. Tal comportamento reforça que, neste método de carregamento, a interação do ácido láctico com a resina é mais superficial, sendo facilmente eluído logo no início da eluição. Em contrapartida, para os experimentos com carregamento em béquer, a pureza foi de 27,42% no início, 87,9% no meio e 69,24% no fim. Este comportamento indica que o carregamento em béquer aumenta a interação do ácido láctico com a resina, e a eluição do ácido láctico ocorre após passar uma quantidade maior de eluente.

A Figura 40 mostra o perfil de eluição do ácido láctico com NH_4HCO_3 para o experimento com carregamento em coluna de vidro com 34 mL de meio fermentativo no carregamento a 39,01 g/L de ácido láctico. As amostras foram coletadas a cada 2 mL, resultando no perfil da Figura 40. O mesmo perfil foi verificado em todas as eluições.

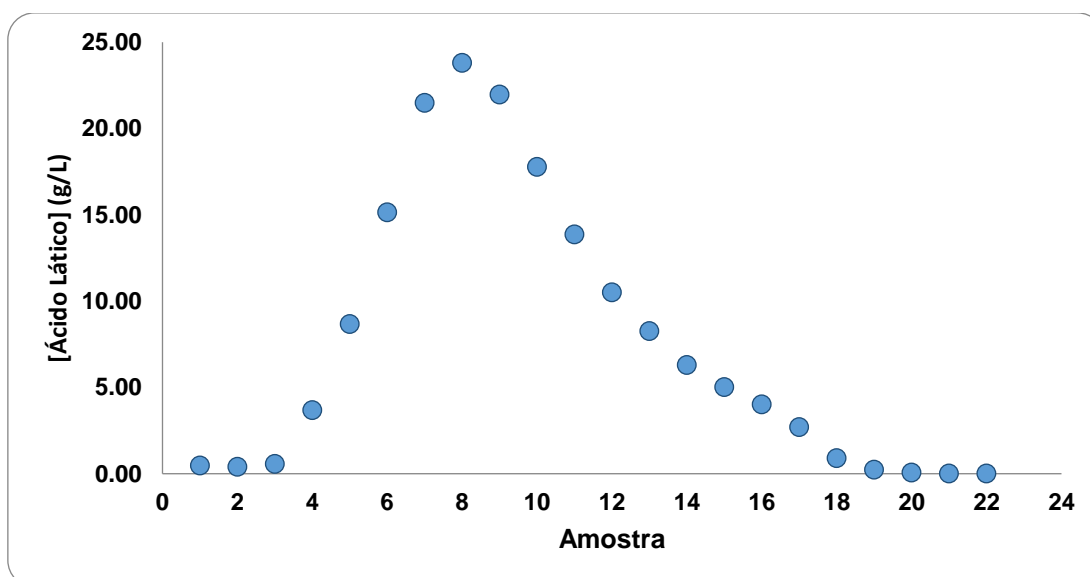


Figura 40 - Curva obtida na etapa de eluição do ácido láctico com NH_4HCO_3 .

Moldes¹³⁰ e colaboradores também utilizaram a resina de base fraca Amberlite IRA-67 (Cl-) para a recuperação de ácido láctico da sacarificação e fermentação simultâneas de madeira de eucalipto em pH 4,4 e obtiveram um

perfil semelhante. Os autores alcançaram uma recuperação de ácido láctico >99% usando a resina em quatro ciclos em operação de coluna fixa. Tal constatação indica que a resina tem potencial de ser reutilizada.

4.3 Etapa 3

4.3.1 Esterificação seletiva do ácido láctico purificado com ácido acrílico

Com o ácido láctico purificado obtido na Etapa 2 e com grau de pureza maior que 85%, foram realizadas esterificações com o ácido acrílico. Para efeitos de comparação, o ácido láctico comercial também foi submetido às mesmas condições de esterificação e acompanhada em tempo real com a sonda de FTIR ReactIR-15 acoplada ao sistema experimental para avaliar melhor o decorrer das reações. Por uma limitação do equipamento, apenas o ácido láctico comercial foi submetido a análise *in situ*, visto que a sonda deve estar totalmente imersa no meio reacional. O meio reacional com ácido láctico purificado não era suficiente para imergir o equipamento.

A Figura 41 A representa o arranjo temporal de espectros de infravermelho adquiridos a cada 30 s. Os espectros 2D comparando o início e final de cada reação se encontram na Figura 41B. Já os perfis de tendência de formação do ácido láctico modificado e o consumo dos reagentes estão representados na Figura 41C.

No início da aquisição, a temperatura do meio reacional era de 100 °C e todos os reagentes foram adicionados ao balão de fundo redondo. Após a aquisição do primeiro espectro, o ácido metanossulfônico foi adicionado ao meio reacional, catalisando a reação. De acordo com a Figura 41C, é possível verificar que em 10 minutos de reação, o produto começava a ser formado, indicado pela linha vermelha. Foi fixado o pico 1096 cm^{-1} para monitorar a tendência da formação deste pico característico de estiramento C-O, evidenciando a formação do éster desejado. Em 1179 cm^{-1} também surge um sinal referente a este estiramento.

Em 1755 cm^{-1} é possível verificar o sinal característico de estiramento da dupla referente a carbonila de éster alifático ao final da reação. No início da reação, este pico estava em 1698 cm^{-1} , característico de estiramento de C=O de

carbonila de ácido carboxílico, sendo mais um indicativo da esterificação. Outra evidência que indica a produção do éster de interesse é a diminuição significativa dos sinais de intensidade média em 1239 e 1292 cm^{-1} característicos de estiramento C-O de ácido carboxílico. A dupla ligação entre os carbonos pode ser verificada nos sinais em 1613, 1635 cm^{-1} (estiramento C=C) e 976 cm^{-1} (deformação angular fora do plano =CH₂) presentes nos espectros do início e do final da reação. Tal fato era desejado, já que estes sítios serão polimerizados.

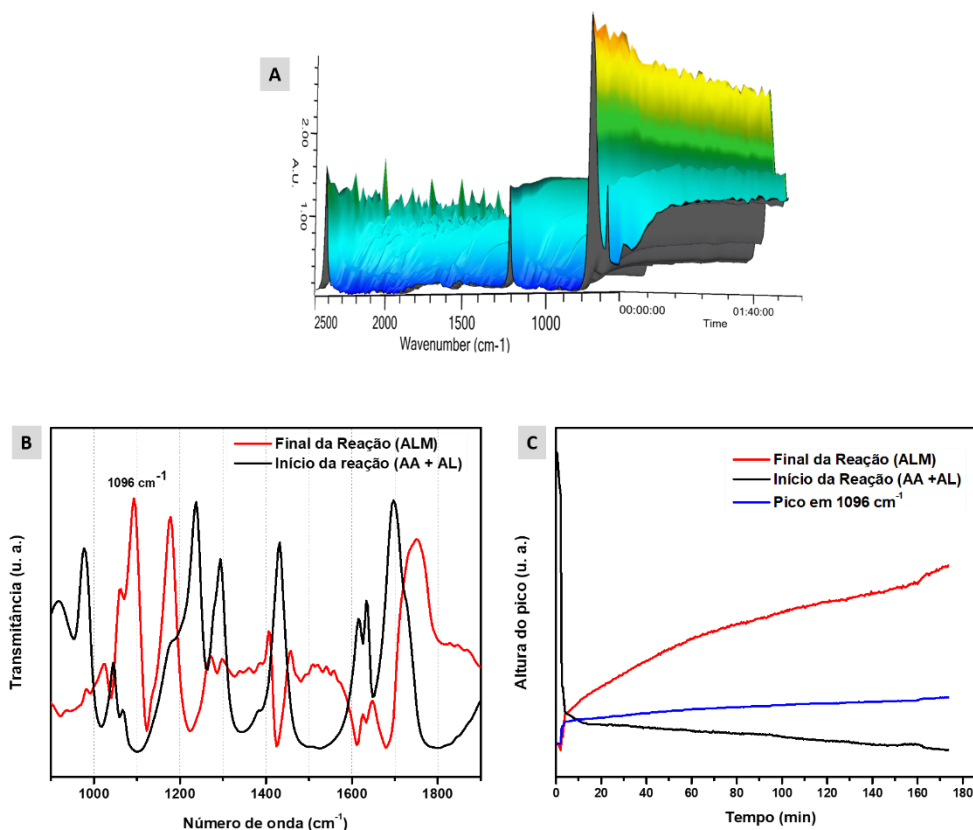


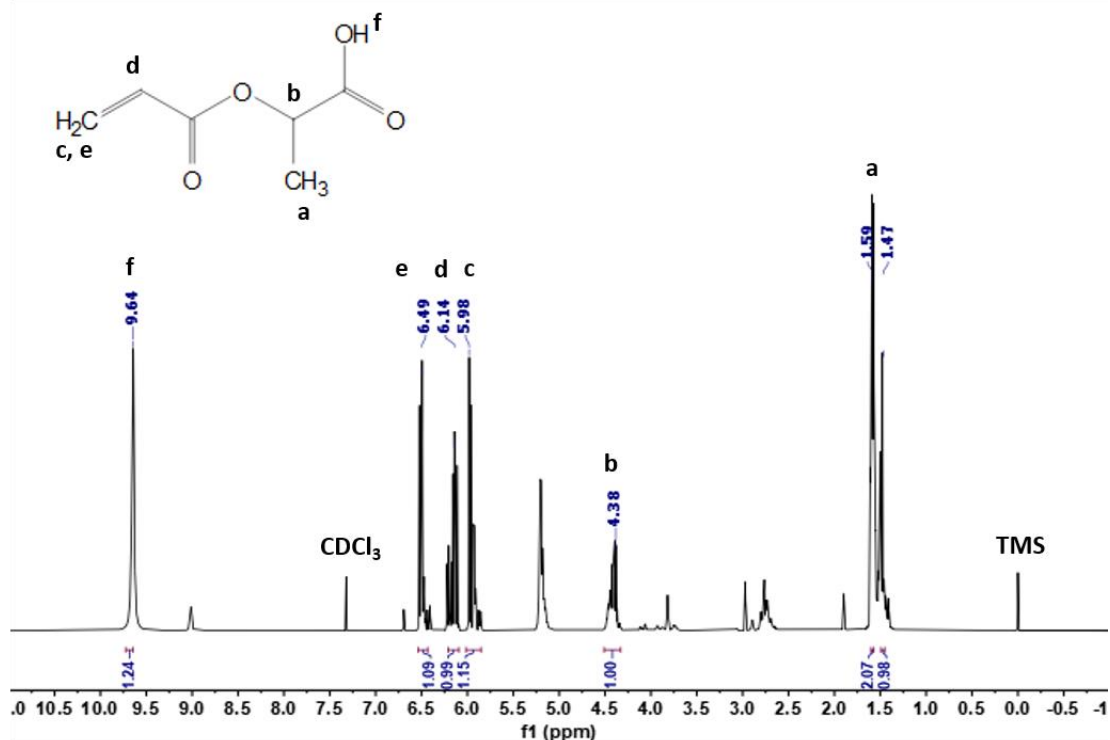
Figura 41 - Gráficos da análise FTIR *in situ* da reação de esterificação entre o ácido lático comercial e ácido acrílico: (A) espectro FTIR 3D, (B) espectro FTIR 2D e (C) perfil da altura do pico em função do tempo.

Outro método de caracterização do monômero formado foi a Ressonância Magnética Nuclear de Protões (RMN ¹H) tanto para a esterificação com ácido lático comercial quanto para o purificado. A Figura 42 representa os espectros dos ésteres obtidos a partir do ácido lático comercial e do ácido lático purificado na Etapa 2 deste trabalho.

Principais sinais de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) para a esterificação seletiva do ácido lático comercial: δ (ppm) 1,59 (d, 2 H), 1,47 (d, 1 H), 4,38 (m, 1 H), 5,98 (dd, 1 H), 6,14 (dd, 1 H), 6,49 (dd, 1 H), 9,64 (s, 1 H).

Principais sinais RMN ^1H (600 MHz, D_2O) para a esterificação seletiva do ácido láctico purificado: δ (ppm) 1,33 (d, 2 H), 1,40 (d, 1 H), 4,78 (m, 1 H), 5,88 (dd, 1 H), 6,14 (dd, 1 H), 6,26 (dd, 1 H), 9,64 (s, 1 H).

Esterificação ácido láctico Comercial



Esterificação ácido láctico Purificado

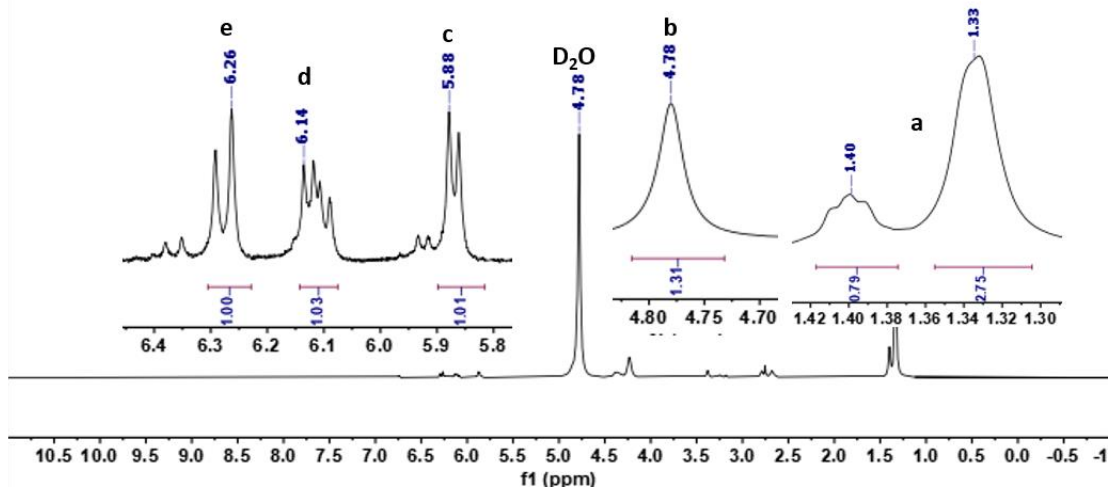


Figura 42 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico. Espectro 1 – Ácido láctico comercial. Espectro 2 – Ácido láctico purificado.

Diferentemente do éster obtido pelo AL comercial, a análise do éster proveniente do AL purificado foi realizada em água deuterada. Isto porque o produto não foi totalmente solúvel em clorofórmio. Para não prejudicar a análise

de RMN, que deve ser realizada em solução homogênea, optou-se por usar o mesmo solvente das fermentações.

Primeiramente, vale destacar que os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios do grupo funcional acrilato, provenientes do ácido acrílico, estão presentes em ambos espectros, indicados pelos picos em 6,49 e 6,26 ppm (e, =CH₂), 6,14 ppm (d, =CH) e 5,98 e 5,88 ppm (e, =CH₂). É importante que as duplas se mantenham no produto final, uma vez que a polimerização do monômero ocorrerá por poliadição via radicais livres.

O Chem21 Metrics Toolkit é uma ferramenta computacional projetada para avaliar a sustentabilidade e a eficiência de processos químicos com auxílio de uma ferramenta computacional que mensura automaticamente as métricas de sustentabilidade do processo.¹³¹ Parâmetros como rendimento da reação, eficiência atômica, consumo de solvente e energia bem como segurança e toxicidade são avaliados para verificar o grau de sustentabilidade e eficiência da síntese, ajudando a identificar áreas para melhorias no processo e alcançar um desenvolvimento mais sustentável de novos compostos químicos. De maneira geral, a esterificação seletiva do ácido láctico atende os requisitos de bandeira verde em muitos de seus parâmetros. Entre eles podemos destacar a ausência de solvente na reação, a eficiência atômica que permite utilizar reagentes na proporção 1:1. A temperatura do meio reacional a 100 °C é um indicativo de bandeira amarela, mas que não tira o grau de sustentabilidade do processo.

4.3.2 Modificação do ácido láctico via esterificação de Steglich

O ácido láctico comercial foi submetido a reação de esterificação de Steglich e acompanhada em tempo real com a sonda de FTIR ReactIR-15 acoplada ao sistema experimental. Apenas o ácido láctico comercial foi submetido a análise *in situ*, uma vez que a reação de Steglich é mais sensível a impurezas.

O clorofórmio foi utilizado como solvente da reação para solubilizar o ácido acrílico e o DCC (que atuaria como agente de acoplamento). A presença de solvente no meio reacional diminuiu a intensidade dos sinais do espectro conforme indicado na Figura 43. Porém, com a ajuda do software, foi possível monitorar o surgimento do sinal em 1096 cm⁻¹ e verificou um aumento deste sinal ao longo da reação, indicando que houve a formação do éster de interesse. Além disso, o sinal em 1177 cm⁻¹ referente também ao estiramento de C-O de éster

foi observado. Na Figura 43A, observa-se o espectro 3D de FTIR, em que o tempo é correlacionado com o comprimento de onda, sendo possível verificar o aumento destes sinais.

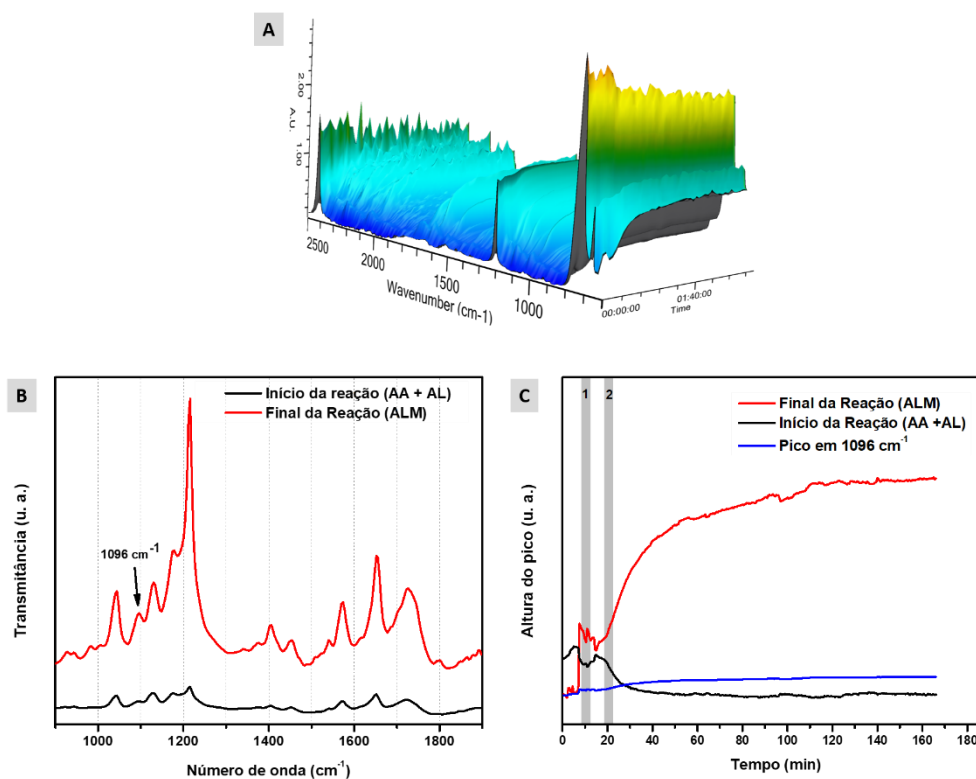


Figura 43 - Gráficos da análise FTIR *in situ* da reação de esterificação entre o ácido láctico comercial e ácido acrílico via Reação de Steglich: (A) espectro FTIR 3D, (B) espectro FTIR 2D e (C) perfil da altura do pico em função do tempo.

Como o DCU só foi retirado do sistema após filtração, não foi possível obter um espectro específico para o produto de interesse, diferentemente da esterificação seletiva. Pela Figura 43B, verifica-se a formação do DCU pelo surgimento dos sinais em 1652 cm^{-1} (estiramento C-O de amida), 1580 cm^{-1} (dobramento N-H) e 1409 cm^{-1} (estiramento C-N), sendo um forte indicativo de que a reação de Steglich aconteceu.

A faixa 1 da Figura 43C indica a solubilização do AA e do DCC. Após 20 minutos de reação, o ácido láctico (nucleófilo) e o DMAP (catalisador) foram adicionados ao meio reacional. A faixa 2 da Figura 43C, representa o início da reação. O perfil indicado pela linha vermelha indica a formação dos produtos ácido láctico modificado e DCU. A Figura 44 representa as duas etapas da esterificação de Steglich, em que o AA e DCC reagem entre si na etapa de

acoplamento, seguido do ataque da hidroxila do AL para a formação do éster de interesse e do DCU.

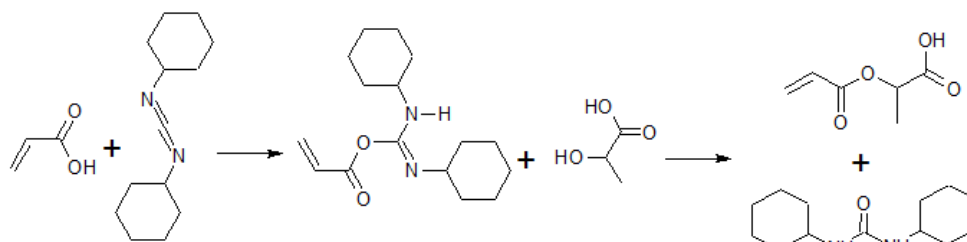


Figura 44 – Proposta de Esterificação de Steglich entre o ácido acrílico e ácido láctico.

Além do FTIR, o produto obtido foi caracterizado por RMN de ^1H . A Figura 45 indica o espectro obtido. Principais sinais de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) para a esterificação de Steglich do ácido láctico comercial: δ (ppm) 1,50 (d, 2 H), 1,56 (d, 1 H), 1,71-1,95 (m, 19 H), 2,69 (m, 1H), 4,43 (m, 1 H), 5,74 (dd, 1 H), 6,14 (dd, 1 H), 6,47 (dd, 1 H), 8,07 (s, 1 H).

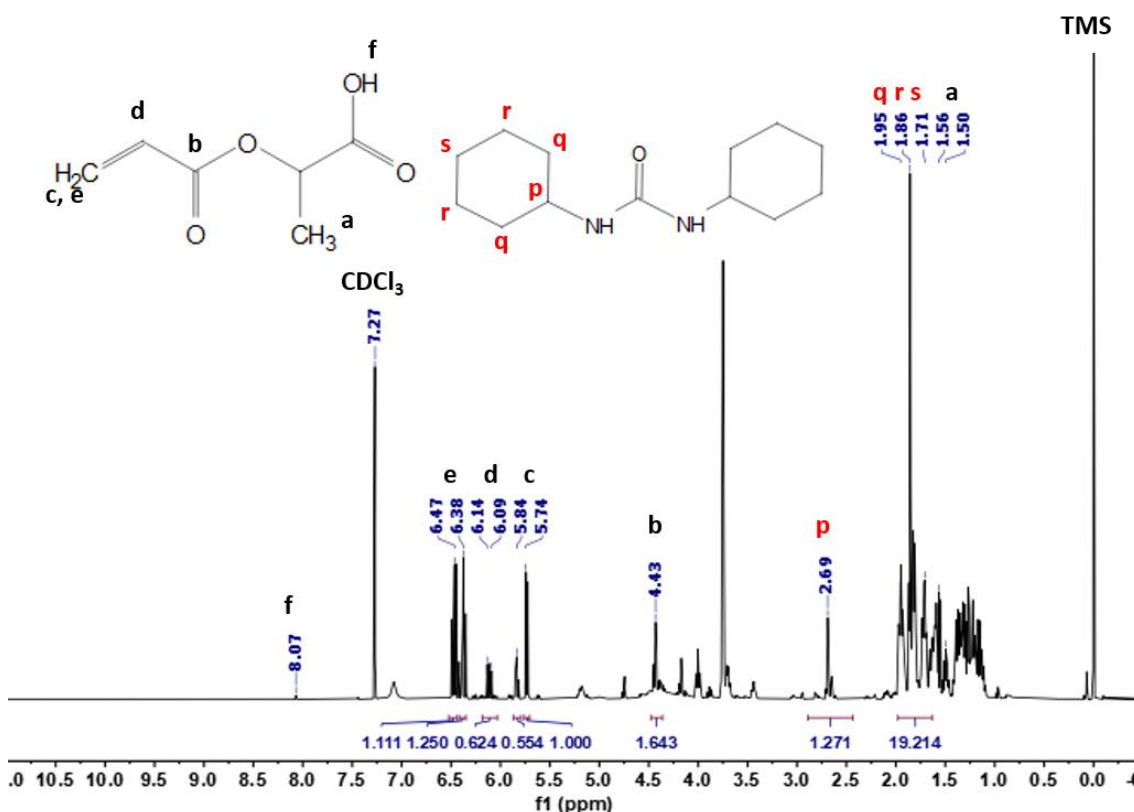


Figura 45 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico.

Apesar de utilizar o clorofórmio como solvente, que é uma bandeira vermelha para avaliação dos parâmetros com base na Chem21 Metrics Toolkit¹³¹, a reação de Steglich tem muitos parâmetros que se enquadram na

bandeira verde para o processo como um todo. Além disso, o clorofórmio utilizado na síntese pode ser recuperado e utilizado novamente, uma vez que o produto pode ser recuperado com rotaevaporador. A reação ocorre em temperatura ambiente e respeita a proporção de 1:1 dos reagentes, que são enquadrados na bandeira verde e desejáveis para a sustentabilidade do processo. Porém, quando comparada com a esterificação seletiva, ainda possui uma etapa de filtração e lavagem para recuperação do produto, além de gerar um produto secundário (DCU). Sendo assim, a esterificação seletiva tem mais parâmetros sustentáveis quando analisamos o processo como todo.

4.4 Etapa 4

4.4.1 Reação de copolimerização em miniemulsão com metacrilato de isobornila

A copolimerização em miniemulsão foi empregada como um método sustentável e eficiente para especificar o tamanho de partículas e produzir cadeias poliméricas com elevadas massas molares médias.¹⁰⁰

A mistura pré-polimerização se manteve estável e homogênea com coloração branca antes e depois da polimerização. Após secagem do polímero, o produto formado foi um sólido branco para o polímero com AL comercial e um sólido com coloração castanho com AL purificado. Ao serem macerados, os polímeros possuem aspecto de talco, resultando num pó fino e branco.

Com os AL modificados obtidos na Etapa 3 via esterificação seletiva, foram realizadas copolimerizações com 95 % de metacrilato de isobornila (IBMA). O IBMA é um monômero de origem renovável, que pode ser obtido a partir da resina de pinho. Isto é alternativa promissora para aumentar a sustentabilidade da produção final, utilizando monômeros bioderivados e ácido lático obtido via fermentação.

Allasia e colaboradores avaliaram o IBMA e o acrilato de 2-octila como monômeros de base biológica para reagir por polimerização radicalar livre em meio disperso em água. Nesse sentido, monômeros de base biológica têm sido usados para substituir monômeros à base de petróleo, como ésteres de ácido acrílico (MMA), na síntese de revestimentos, acabamentos interiores em madeira e adesivos sensíveis à pressão.¹³²

Barroso e colaboradores¹⁰¹ já sintetizaram copolímeros em meio aquoso com MMA e ácido láctico modificado e este trabalho será utilizado como comparativo entre os copolímeros.

O polímero obtido com IBMA e AL comercial apresentou uma conversão de 94%¹⁰¹, enquanto com o AL purificado foi de 92%. Isto indica que as impurezas presentes no AL recuperado por troca iônica não afetaram a polimerização em miniemulsão radicalar.

Além disso, o copolímero de MMA e ALC apresentou uma conversão de 96%. Apesar disso, conversões mais elevadas poderiam ser obtidas se maiores concentrações de iniciador fossem usadas na miniemulsão com IBMA.

Ambas miniemulsões de IBMA e AL foram estáveis, com diâmetros médios (D_p) de 199,9 nm para o AL comercial e 182 nm para o AL purificado. Baixos índices de polidispersão (Pdl) foram alcançados para as duas condições, ou seja, as partículas possuíam uniformidade de diâmetro, como observado na Tabela 14. O uso do AL purificado não representou mudanças significativas nos parâmetros do copolímero, indicando a possibilidade de utilizá-lo para tal finalidade em substituição do AL comercial.

Para o copolímero de MMA obtido nas mesmas condições, obteve-se 78,4 nm de diâmetro médio. Como a concentração do emulsificante foi a mesma para todas as copolimerizações, tal aumento se deve ao fato do IBMA apresentar viscosidade maior quando comparada com o MMA, o que reflete numa maior dificuldade na quebra das gotas durante o processo de sonicação.¹⁰¹

Um fenômeno interessante foi que o tamanho médio das partículas diminuiu após a polimerização para os copolímeros de IBMA. Para o AL purificado, o D_p foi para 272,1 nm e para o AL comercial para 289,3 nm. O Pdl foi de 0,057 e 0,039, respectivamente. Tal fato pode ser justificado pela nucleação homogênea, uma vez que um iniciador hidrossolúvel foi utilizado. O mesmo comportamento foi observado por Barroso e colaboradores em copolímeros de MMA e AL, mostrando coerência no resultado.¹⁰¹

Tabela 14 - Dados experimentais de tamanho médio de partículas (D_p), índice de polidispersão do tamanho de partícula (Pdl), massa molar média em massa (M_w), massa molar média em número (M_n) e a dispersão da massa molar ($D_M =$

Mw/ Mn) e temperatura de transição vítrea (T_g) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.

Amostra	Dp (nm)	Pdl	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	\bar{D}_M	T_g (°C)
MMA e ALM 5% ¹⁰¹	78,4	0,169	294771	154174	1,80	105
IBMA e ALCM 5%	199,9	0,110	1137498	270869	4,19	116
IBMA e ALPM 5%	182,8	0,140	842608	276380	3,05	111

Os valores de massas molares médias obtidas por cromatografia de permeação em gel indicam que o AL comercial obteve polímero com maior valor de Mw do que o AL purificado. Isto pode ser justificado pelo fato de que as impurezas remanescentes interferiram no processo de polimerização. Porém, quando comparado com o copolímero de MMA, os dois copolímeros de IBMA apresentaram maiores valores de Mw. A Figura 46 indica as distribuições de massa molar dos copolímeros IBMA/AL. O perfil foi semelhante, independente do AL utilizado, reforçando que o processo de purificação foi efetivo para substituir o AL comercial na síntese do copolímero.

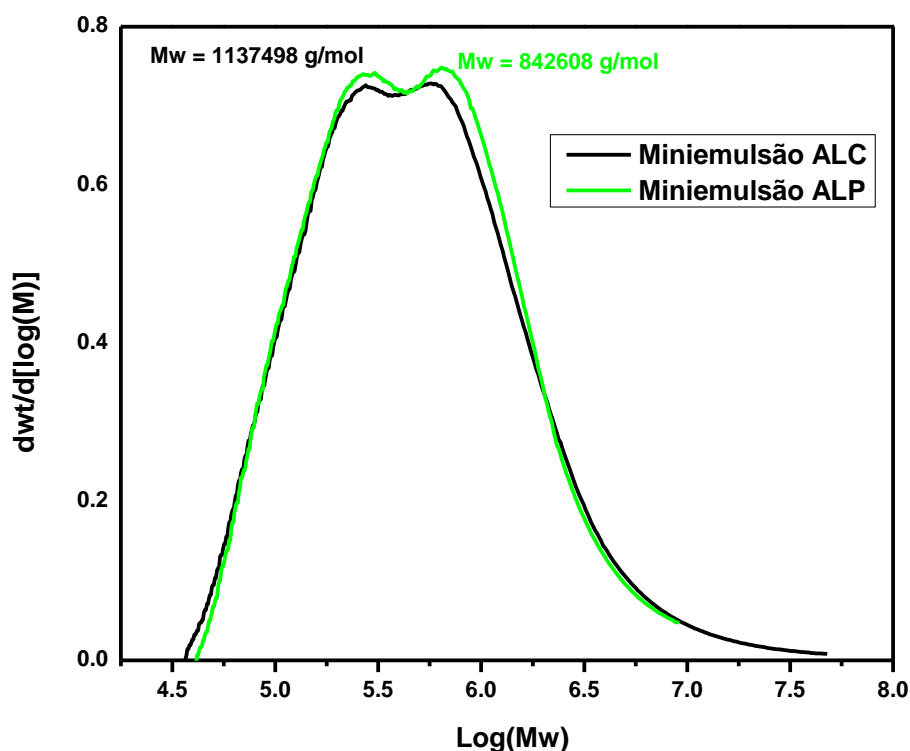


Figura 46 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros IBMA/ALM.

O copolímero obtido com o IBMA possui T_g próxima do copolímero com MMA (Figura 46 e Tabela 14), indicando que ambos podem ter propriedades semelhantes. Tal fato é mais um indicativo que o IBMA pode ser usado como

monômero para produção de polímeros com propriedades próximas ao PMMA. Os resultados ainda indicam que não houve diferença significativa na T_g do copolímero de IBMA, independentemente do AL utilizado. Ou seja, a utilização do AL purificado não afetou significativamente as propriedades finais do copolímero.

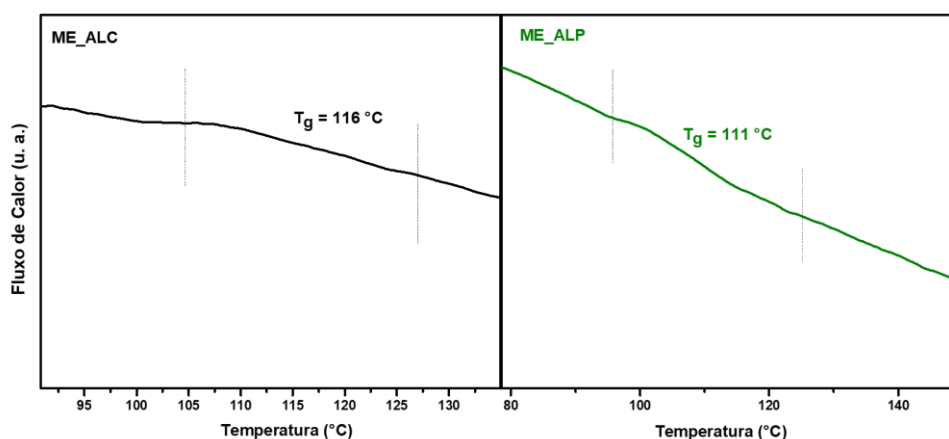


Figura 47 - Curvas de DSC dos polímeros IBMA-ALC e IBMA-ALP.

Pelo perfil da curva obtida por DSC, observa-se que as curvas são características de polímeros amorfos, o que era esperado devido aos monômeros com grupos oriundos do ácido acrílico. A presença do AL na estrutura do copolímero diminuiu a T_g com relação ao homopolímero de IBMA, que possui T_g entre 140 e 195 $^\circ\text{C}$. Os polímeros sintetizados com AL podem ter gerado cadeias poliméricas de maior mobilidade, e conseqüentemente, menor T_g , exemplificando o efeito do AL mesmo em pequena fração de 5%. Entretanto, uma T_g entre 110 $^\circ\text{C}$ permite uma boa faixa de aplicações deste material termoplástico de natureza amorfa, especialmente aquelas que requerem uma combinação de rigidez e certa flexibilidade a temperaturas elevadas. A diminuição da T_g possibilita ao material uma característica plastificante de melhor processabilidade.¹³³

A estabilidade térmica dos copolímeros foi analisada por termogravimetria. A Figura 48 apresenta as curvas termogravimétricas com suas respectivas derivadas (DTG) para os polímeros de IBMA com AL.

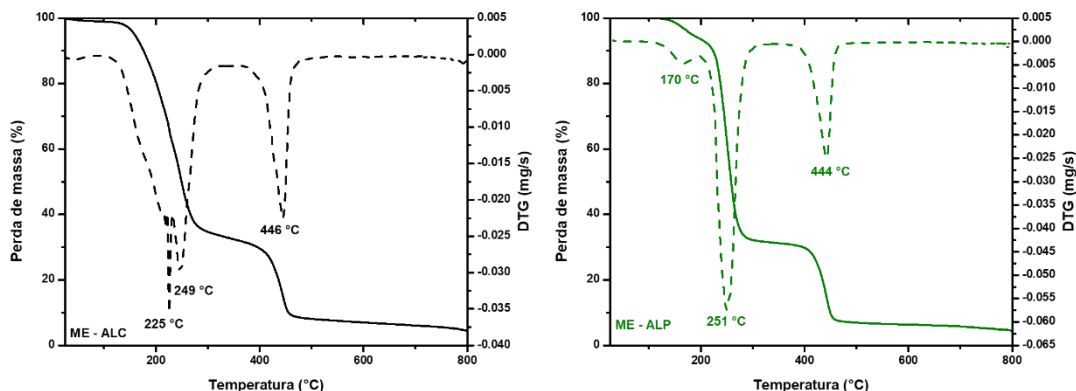


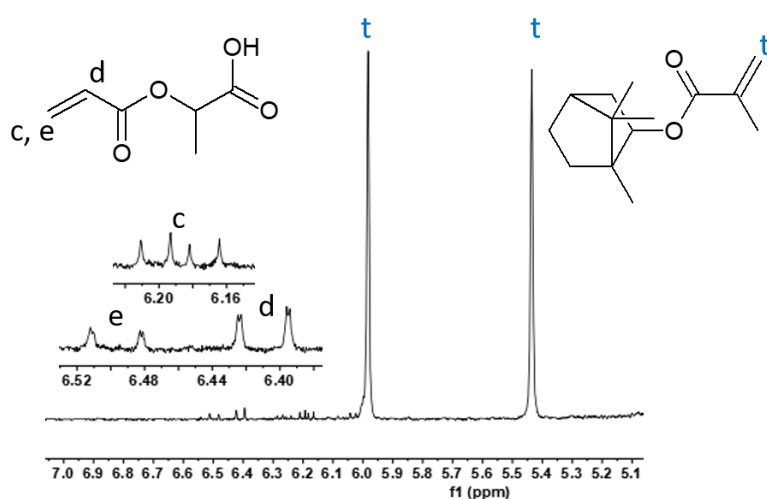
Figura 48 - Curvas termogravimétricas (TG/DTG) dos polímeros IBMA-ALC e IBMA-ALP.

A DTG indicou três estágios de perda de massa, caracterizando três eventos distintos. O início da decomposição ocorreu em temperaturas maiores para o polímero com AL comercial (225 °C) do que para o AL purificado (170 °C). Este evento observado para o AL purificado pode estar relacionado a cadeias poliméricas de menor massa molar e representam aproximadamente 20% da massa total do polímero. A variação da temperatura inicial de decomposição pode se dar ao fato de que a massa molar média em massa (M_w) do copolímero de IBMA com AL comercial é relativamente maior que a observada no copolímero sintetizado com AL purificado, conferindo ao material a base de AL comercial uma maior resistência térmica para iniciar a sua decomposição, embora ambos os copolímeros apresentem uma massa molar média em número similar (Tabela 14). Tal fato é corroborado pelo valor de T_g do material proveniente do AL comercial ser mais alto que o AL purificado, indicando que as cadeias poliméricas possuem menor mobilidade para o material proveniente do AL purificado. As impurezas presentes no AL purificado podem ter impactado nas reações de transferência de cadeia, culminando na formação de cadeias poliméricas de menos tamanho.

Já os próximos eventos térmicos ocorreram em temperaturas semelhantes para os dois copolímeros, em aproximadamente 250 e 445 °C. Tal fato é um forte indicativo de que o material possui semelhanças nas propriedades físicas e possuem um grau de heterogeneidade, relacionado ao fato de ser com copolímero com 2 monômeros distintos.

A partir do espectro de RMN, foi possível verificar que a polimerização aconteceu, visto que os sinais referentes aos hidrogênios da dupla ligação do ALM foram suprimidos, estando ausente no espectro do copolímero, conforme ilustrado na Figura 49. Além disso, a intensidade dos sinais referentes aos hidrogênios da dupla ligação do IBMA ($\delta = 6,09$ e $5,54$ ppm) caiu consideravelmente, indicando que parte do IBMA foi copolimerizado. Para o AL comercial, é possível verificar 2 picos para cada hidrogênio do carbono insaturado (indicado por c, d e e), referentes aos isômeros L e D, visto que o AL comercial é composto pela mistura racêmica dos enantiômeros.

Monômeros ALM e IBMA



Copolímero IBMA-ALM

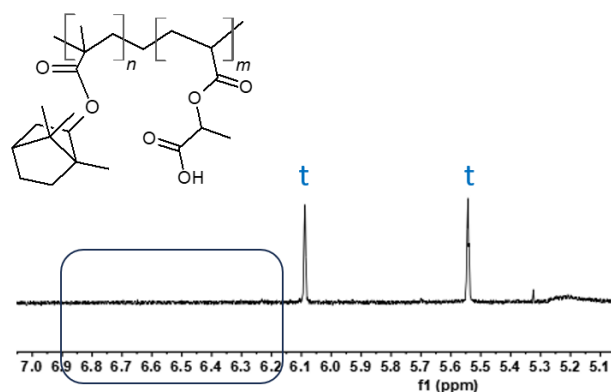


Figura 49 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de copolimerização entre o ácido láctico comercial modificado e o IBMA.

O mesmo comportamento foi verificado para o copolímero de IBMA com AL purificado. O espectro obtido para este copolímero está representado na Figura 50.

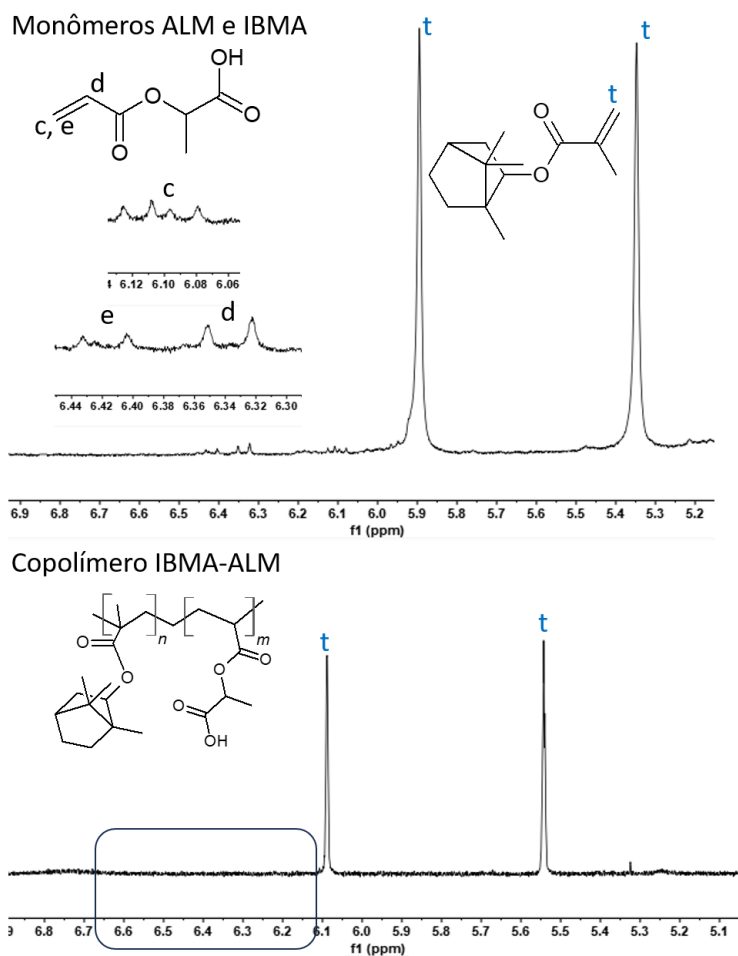


Figura 50 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de copolimerização entre o ácido láctico comercial modificado e o IBMA.

Nos espectros obtidos após 2 horas de polimerização, verificou-se que o ALM foi totalmente polimerizado e que a composição não foi afetada ao usar o AL purificado como monômero. Tal fato é corroborado pelas demais análises.

Tendo como base os parâmetros da Chem21 Metrics Toolkit¹³¹, verifica-se que a miniemulsão é um processo que se enquadra em um alto nível de sustentabilidade. Além disso, a possibilidade de utilizar o AL purificado aumenta o grau de insumos biobaseados, agregando ainda mais viabilidade ao processo.

4.4.2 Reação de polimerização do ácido láctico modificado via RAFT

A Transferência de Cadeia Reversível por Adição-Fragmentação (RAFT) é um método de polimerização radicalar que utiliza um agente de transferência de cadeia, conhecido como agente RAFT. Nesse processo, há uma reação reversível entre cadeias de polímero ativas e inativas. O mecanismo envolve uma série de reações de adição e fragmentação. A polimerização começa com

a iniciação, onde um iniciador gera radicais primários. Esses radicais iniciam a propagação, adicionando monômeros e formando uma cadeia em crescimento que interage com o agente RAFT.^{9,110,134}

A polimerização RAFT foi selecionada para polimerizar monômero a base de ácido láctico pensando na sua capacidade de produzir polímeros com um controle preciso sobre a estrutura e propriedades do produto final. Esta técnica permite um controle preciso na distribuição do tamanho das cadeias do polímero e a arquitetura do polímero comparado com outros métodos de polimerização radicalar. Além disso, a polimerização RAFT possibilita a síntese de materiais com diferentes arquiteturas, como blocos, podendo ajustar propriedades como biodegradabilidade, rigidez ou flexibilidade do polímero final. Sendo assim, o monômero obtido a partir da esterificação seletiva do AA e AL (comercial e purificada) foi submetido essa polimerização para verificar a viabilidade da utilização do monômero baseado em ácido láctico na produção de um macroRAFT. A Figura 51 indica um esquema que representa o processo envolvido. Uma vez obtido, o macroRAFT poderá ser na síntese de inéditos polímeros em bloco.

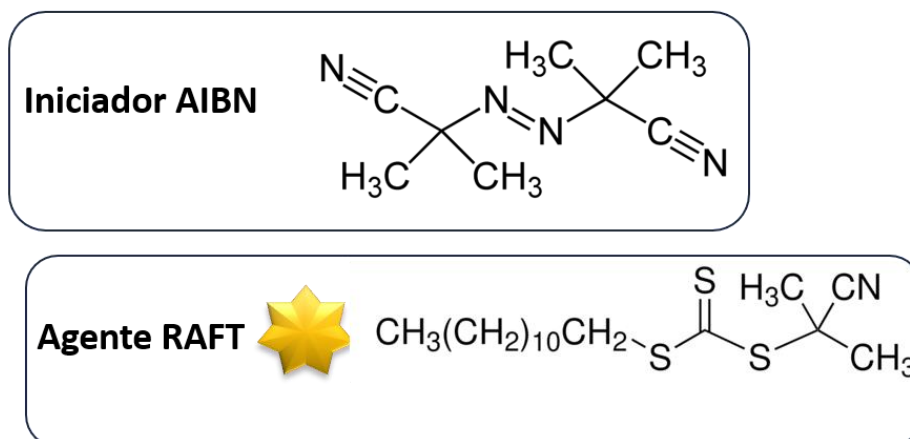
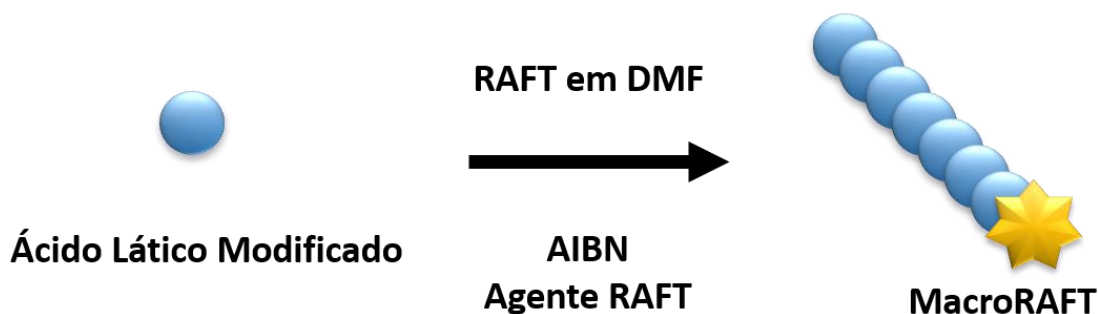


Figura 51 - Síntese das partículas de macroRAFT obtido via polimerização RAFT.

Para ambos experimentos de síntese do homopolímero de AL modificado via RAFT foram utilizadas as razões entre monômero e agente de 30, e agente RAFT e iniciador em 10, visando a obtenção do homopolímero com massa molar de 5000 Da.

Para o AL purificado, obteve-se uma conversão de 44,75%. Primeiramente, vale ressaltar que a polimerização via RAFT é muito sensível a impurezas. Para o AL comercial, a conversão foi de 62,19%, ou seja, um valor também baixo. Isto indica que mais tempo de polimerização poderia resultar em conversões maiores, mas as impurezas provenientes do AL purificado impactaram para conversões ainda menores.

Observou-se que, macroscopicamente, o polímero obtido a partir do AL comercial foi mais homogêneo que o proveniente do AL purificado. A natureza das impurezas foi um fator determinante para o processo, visto que, visivelmente, os homopolímeros obtidos com esta técnica foram bem diferentes quando usamos o AL purificado em comparação com o comercial.

O polímero obtido a partir do AL purificado não foi solúvel em THF. Tal fato não foi observado para o comercial, possivelmente porque o ácido láctico comercial apresenta-se como uma mistura racêmica dos isômeros L e D. Sendo assim, não foi possível realizar análises de CPG para este material polimérico, por exemplo. Isso pode ser correlacionado com o fato de que a cadeia polimérica deve ter estrutura reticulada. A Figura 52 representa a distribuição de massa molar do ALM sintetizado a partir do AL comercial. Um M_w de 2868 g/mol foi alcançado para o macroRAFT. A meta de 5000 g/mol não foi alcançada, indicando que a polimerização poderia ter seguido além das 6 horas. Percebe-se pelo gráfico um perfil bimodal, com uma pequena contribuição para massas molares mais baixas. Tal característica pode estar correlacionada com a presença de oligômeros.

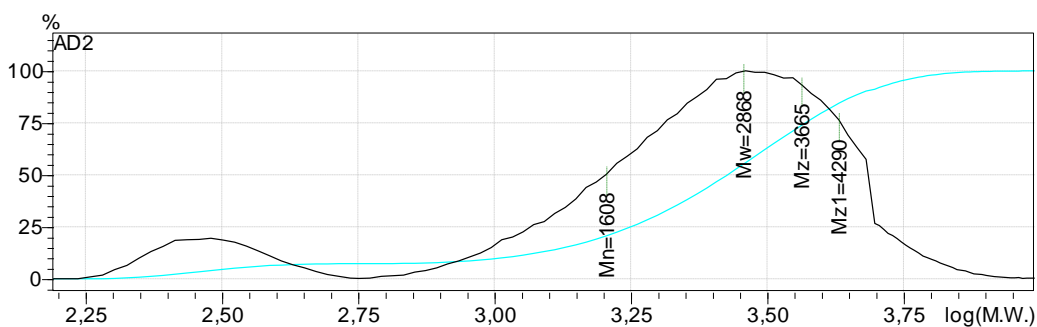


Figura 52 - Distribuições de massa molar (DMM) do homopolímero de ALM proveniente de AL comercial.

A reticulação também do homopolímero do AL purificado foi corroborada com o resultado do DSC, que não foi possível verificar a T_g do polímero proveniente do ácido láctico purificado. As curvas de DSC não revelaram claramente nenhum evento endotérmico associado à temperatura vítrea. Assim, o teste foi inconclusivo devido às condições de análise e à baixa sensibilidade do equipamento para identificar a T_g desse polímero.

A Figura 53 indica a T_g do ALM proveniente de AL comercial. Tipicamente, a T_g do PLA é entre 50 e 80 °C.¹³⁵ O valor obtido para o homopolímero sintetizado via RAFT está próximo do PLA convencional, indicando que a síntese é viável para a produção de materiais com características muito próximas ao PLA. Ou seja, a utilização do ALM como monômero resultou em polímeros com características semelhantes ao AL.

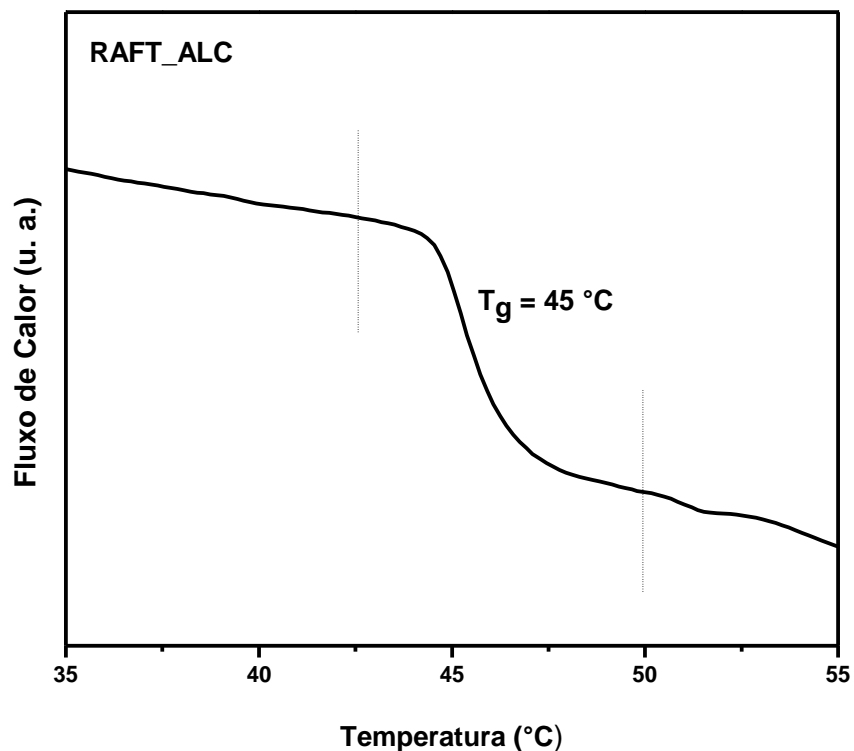


Figura 53 - Curvas de DSC do homopolímero de ALM proveniente do AL comercial.

A estabilidade térmica dos copolímeros foi analisada por termogravimetria. A Figura 54 apresenta as curvas termogravimétricas com suas respectivas derivadas (DTG) para os homopolímeros de ALM comercial e purificado.

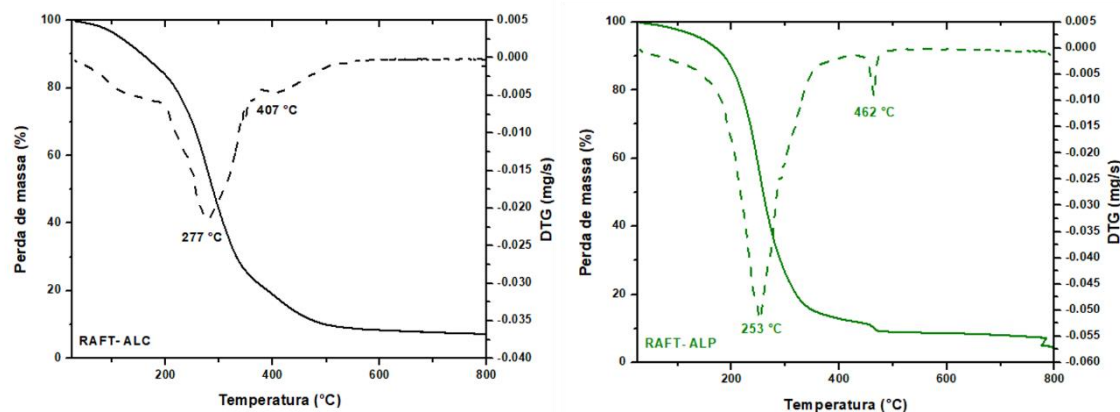


Figura 54 - Curvas termogravimétricas (TG/DTG) dos homopolímeros de ALC e ALP.

Os dados de DTG, que indicam os estágios de perda de massa, indicam que o homopolímero produzido por RAFT com AL tem perda de massa significativa em 277 °C e uma segunda perda em 407 °C, mas em menor intensidade. Para o AL purificado, foi possível observar dois estágios: um em 253 e um em 468 °C. Ou seja, apesar das diferenças, os homopolímeros possuem perfis semelhantes de perdas de massas. Por mais que a troca iônica tenha fornecido um AL com 90% de pureza, talvez a natureza das impurezas tenha interferido negativamente na polimerização RAFT.

Para verificar se a polimerização ocorreu, foram coletadas alíquotas de 20 µL do meio reacional antes e ao final do processo. A mesma quantidade de solução foi submetida a análise de RMN. A Figura 55 mostra os espectros obtidos para os monômeros de ALC e ALP modificados, bem como para a mistura de monômero de homopolímero obtido após 6 horas de reação.

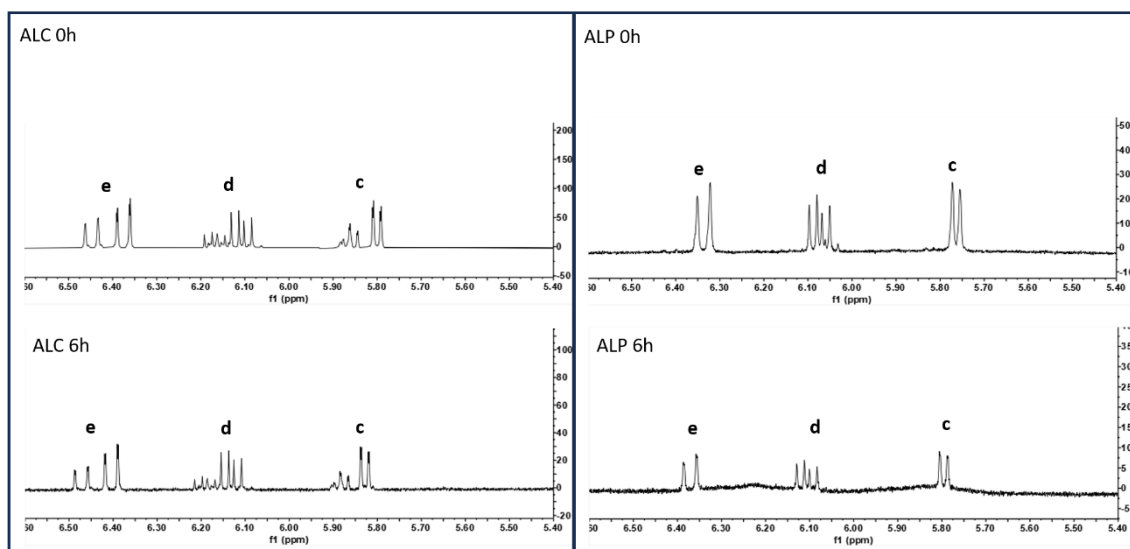
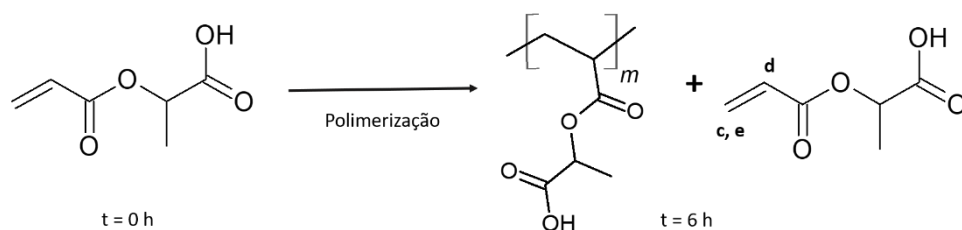


Figura 55 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da polimerização RAFT do ALC e ALP modificados.

Pode-se observar que as intensidades dos sinais da dupla ligação presente no monômero de AL diminuiu nas duas condições. Já era esperado que houvesse monômero residual, já que a conversão foi de 44,79 % para o AL purificado e 62,19% e para o AL comercial. Entretanto, a diminuição da

intensidade dos sinais evidencia a polimerização, já que esta reação acontece neste grupo funcional.

Outro fato interessante que pode ser observado é que no espectro do monômero de AL comercial, os picos c, d e e referentes aos hidrogênios da dupla ligação aparecem duplicados, já que o AL comercial é uma mistura racêmica dos isômeros L e D. Isto não é observado no espectro do AL purificado, já que a bactéria produz apenas o enantiômero L-(+)-ácido lático. A utilização do AL purificado viabilizou a produção de um polímero com propriedades distintas. Sendo assim, se uma segunda etapa de purificação for empregada, além de um maior tempo reacional, possivelmente maiores conversões poderiam ser alcançadas.

5 – Conclusões

Pela seleção da bactéria apresentada neste trabalho, concluiu-se que a *Enterococcus durans* e *Lactococcus lactis* apresentaram maiores produções de ácido láctico em tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL. Os resultados mostram que todas as bactérias estudadas foram capazes de produzir o L-(+)-ácido láctico, que foi produzido com pureza óptica, o que é interessante para a produção de polímeros.

Todas as cepas foram capazes de realizar bioconversão do glicerol para crescimento celular, porém a adaptação natural não induziu a produção de ácido láctico.

Por apresentar a capacidade de exaurir a fonte de carbono, bem como apresentar maiores produções de ácido láctico, a *Enterococcus durans* foi selecionada para avaliar as fermentações em fermentadores de 1 litro. Verificou-se que o excesso de açúcar no meio não implica em maior produção de ácido láctico. O meio contendo 20 g/L de lactose e 10 g/L de glicose foi suficiente para produções de até 36,47 g/L de ácido láctico, com alimentação de lactose e controle de pH do meio em 5,0.

Os estudos de avaliação da produção de ácido láctico em ambiente anaeróbico indicaram que baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio não favoreceu a produção de ácido láctico. Com injeção de nitrogênio e DO% máxima de 0,3%, a produção de ácido láctico foi 8,5 g/L. A fermentação com as mesmas condições sem adição de nitrogênio ao meio produziu 10,87 g/L.

Com os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram a reutilização de células, foi possível concluir que o reciclo aumentou 10 g/L na produção de ácido láctico, chegando a 26,07 g/L. Fermentações com a *E. durans* nas mesmas condições produziram mais ácido láctico com células adaptadas.

Conclui-se também que, o controle de pH, com a adição de KOH 2 M ao meio para manter o pH em 5,0 possibilitou uma produção de 36,47 g/L de ácido láctico, melhorando de maneira significativa quando comparamos com fermentações sem controle de pH (10,87 g/L).

Objetivo de maximizar a produção de ácido láctico foi obtida com o aumento de escala em fermentadores de 5 L e com alimentação de lactose em

pulsos, produzindo 66,23 g/L de ácido láctico. Tal meio fermentativo foi submetido a técnicas de purificação para a recuperação da molécula de interesse.

A troca iônica com resinas Amberlite IR-120 H⁺ e IRA-67 Cl⁻ foi uma técnica que aprimorou a purificação do ácido láctico, chegando a 91% de pureza com 94 % de recuperação, quando utilizadas em associação. Tal resultado possibilitou a utilização da molécula purificada para modificação química.

Foi possível utilizar o ácido láctico purificado nas reações de esterificação, sendo viável a modificação deste composto esterificando-o com o ácido acrílico. Este ácido láctico modificado foi incorporado em reações de copolimerização com metacrilato de isobornila, produzindo um polímero com propriedades interessantes para diversas aplicações. Para polimerizações RAFT, acredita-se que a utilização do AL purificado prejudicou a reação, considerando-se que o método foi sensível aos contaminantes presentes.

6 - Referências

1. Lactic Acid Market by Application (Biodegradable Polymers, Food & Beverages, Pharmaceutical Products), Form, and Region, Polylactic Acid Market, by Application (Packaging, Fiber & Fabrics, Agriculture), Form, and Region - Global Forecast to 2025. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/> (2022).
2. Komesu, A., Allan Rocha de Oliveira, J., Helena da Silva Martins, L., Regina Wolf Maciel, M. & Maciel Filho, R. *Lactic Acid Manufacture. BioResources* **12** (2017).
3. Rebanho Bubalinos (Búfalos) - Tamanho do rebanho (Cabeças) - IBGE. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos/br> (2024).
4. Ribeiro, J. L. *Potencial tecnológico, probiótico e antagonista da microbiota láctica de leite de búfalos. Dissertação de mestrado em saúde animal. Brasília-DF.*
5. López-Garzón, C. S. & Straathof, A. J. J. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnology Advances* **32** 873–904 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.002> (2014).
6. Esmaeili, N., Jahandideh, A., Muthukumarappan, K., Åkesson, D. & Skrifvars, M. Synthesis and characterization of methacrylated star-shaped poly(lactic acid) employing core molecules with different hydroxyl groups. *Journal of Applied Polymer Science* **134**, (2017).
7. Gupta, B., Revagade, N. & Hilborn, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **32** 455–482 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005> (2007).
8. Portal Comex Stat. <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/52193> (2022).
9. Opiyo, G. & Jin, J. Recent progress in switchable RAFT agents: Design, synthesis and application. *European Polymer Journal* **159** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110713> (2021).
10. Alves De Oliveira, R. *et al.* Current Advances in Separation and Purification of Second-Generation Lactic Acid. *Separation and Purification Reviews* **49** Preprint at <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1590412> (2020).
11. Ouyang, J. *et al.* Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresource Technology* **135**, 475–480 (2013).
12. Lactic Acid Market Worth \$5.02 Billion By 2028 _ CAGR_ 8.0%. <https://www.grandviewresearch.com/> (2021).
13. Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M. & Tomás-Pejó, E. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **12** Preprint at <https://doi.org/10.1002/bbb.1852> (2018).
14. Gayer, C. *et al.* Development of a solvent-free polylactide/calcium carbonate composite for selective laser sintering of bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering C* **101**, (2019).
15. Carus, M., Dammer, L., Raschka, A. & Skoczinski, P. Renewable carbon: Key to a sustainable and future-oriented chemical and plastic industry: Definition, strategy, measures and potential. *Greenhouse Gases: Science and Technology* **10**, (2020).

16. Jariyasakoolroj, P., Leelaphiwat, P. & Harnkarnsujarit, N. Advances in research and development of bioplastic for food packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100** Preprint at <https://doi.org/10.1002/jsfa.9497> (2020).
17. Jiang, H. *et al.* Supertough Poly(lactic acid) and Sustainable Elastomer Blends Compatibilized by PLLA-b-PMMA Block Copolymers as Effective A-b-C-Type Compatibilizers. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **59**, (2020).
18. Gong, M., Zhao, Q., Dai, L., Li, Y. & Jiang, T. Fabrication of polylactic acid/hydroxyapatite/graphene oxide composite and their thermal stability, hydrophobic and mechanical properties. *Journal of Asian Ceramic Societies* **5**, (2017).
19. Auras, R. A., Harte, B., Selke, S. & Hernandez, R. Mechanical, physical, and barrier properties of poly(lactide) films. *Journal of Plastic Film and Sheeting* **19**, (2003).
20. Teixeira, S., Eblagon, K. M., Miranda, F., R. Pereira, M. F. & Figueiredo, J. L. Towards Controlled Degradation of Poly(lactic) Acid in Technical Applications. *C (Basel)* **7**, 42 (2021).
21. Ilyas, R. A. *et al.* Polylactic acid (Pla) biocomposite: Processing, additive manufacturing and advanced applications. *Polymers* **13** Preprint at <https://doi.org/10.3390/polym13081326> (2021).
22. Ghadamyari, M. *et al.* One-step synthesis of stereo-pure L,L lactide from L-lactic acid. *Catalysis Communications* **114**, (2018).
23. Ali, F. B. & Ismail, N. Polymerization methods and characterizations for poly(lactic acid) (PLA) based polymers. in *Multifaceted Protocol in Biotechnology* (2019). doi:10.1007/978-981-13-2257-0_12.
24. Gitari, B., Chang, B. P., Misra, M., Navabi, A. & Mohanty, A. K. A comparative study on the mechanical, thermal, and water barrier properties of PLA nanocomposite films prepared with bacterial nanocellulose and cellulose nanofibrils. *Bioresources* **14**, (2019).
25. Tappa, K. *et al.* 3D printing custom bioactive and absorbable surgical screws, pins, and bone plates for localized drug delivery. *Journal of Functional Biomaterials* **10**, (2019).
26. Li, Y. & Cui, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. in *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy* 211–228 (Springer Netherlands, 2010). doi:10.1007/978-90-481-3295-9_11.
27. Quince Market Insights. Global Lactic Acid Market is Projected to Register a CAGR Of 12.4% Over the Forecast Period from 2021 to 2030. <https://www.globenewswire.com/> (2021).
28. Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M. & Desobry, S. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**, (2010).
29. Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. & Srivastava, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* **7** Preprint at <https://doi.org/10.2225/vol7-issue2-fulltext-7> (2004).
30. Razali, N. & Abdullah, A. Z. Production of lactic acid from glycerol via chemical conversion using solid catalyst: A review. *Applied Catalysis A:*

- General* **543** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.07.002> (2017).
31. Rodrigues, A. K. O., Maia, D. L. H. & Fernandes, F. A. N. Production of lactic acid from glycerol by applying an alkaline hydrothermal process using homogeneous catalysts and high glycerol concentration. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **32**, (2015).
 32. Torres, S., Palacio, R. & López, D. Support effect in Co₃O₄-based catalysts for selective partial oxidation of glycerol to lactic acid. *Applied Catalysis A: General* **621**, (2021).
 33. Nelson, D. L. , C. M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. (2014).
 34. Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, (2000).
 35. Stephen J. Forsythe. *Microbiologia Da Segurança Dos Alimentos*. (2002).
 36. Tango, M. S. A. & Ghaly, A. E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass Bioenergy* **16**, (1999).
 37. Cock, L. S. & De Stouvenel, A. R. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**, (2006).
 38. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J. & Kosseva, M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **53**, (2010).
 39. Pessione, A. *et al.* Enantioselective lactic acid production by an *Enterococcus faecium* strain showing potential in agro-industrial waste bioconversion: Physiological and proteomic studies. *Journal of Biotechnology* **173**, (2014).
 40. Verma, D. & Subudhi, S. 'Lactobacillus sp. strain TERI-D3', as microbial cell factory for fermentative production of lactic acid'. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* **4**, (2021).
 41. Nagarajan, D. *et al.* Fermentative lactic acid production from seaweed hydrolysate using *Lactobacillus* sp. And *Weissella* sp. *Bioresource Technology* **344**, (2022).
 42. Wischral, D., Arias, J. M., Modesto, L. F., de França Passos, D. & Pereira, N. Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by *Lactobacillus pentosus*: Integrating xylose and glucose fermentation. *Biotechnology Progress* **35**, (2019).
 43. de Oliveira, P. Z., Vandenberghe, L. P. de S. & Soccol, C. R. Lactic Acid Production Using Sugarcane Juice as an Alternative Substrate and Purification through Ion-Exchange Resins. *Fermentation* **9**, (2023).
 44. Saavedra, S. *et al.* Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* strain hui1 in a medium containing sugar cane molasses. *Agronomía Colombiana* **39**, (2021).
 45. de Oliveira, P. M. *et al.* Production of l (+) lactic acid by *Lactobacillus casei* ke11: Fed batch fermentation strategies. *Fermentation* **7**, (2021).
 46. Vidra, A., Tóth, A. J. & Németh, Á. Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery* **2**, (2017).
 47. Alves, W. R., da Silva, T. A., Zandoná Filho, A. & Pereira Ramos, L. Lactic Acid Production from Steam-Exploded Sugarcane Bagasse Using *Bacillus coagulans* DSM2314. *Fermentation* **9**, (2023).

48. Radosavljević, M. *et al.* Brewers' spent grain and thin stillage as raw materials in l-(+)-lactic acid fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* **124**, (2018).
49. Melo, N. T. M. *et al.* Evaluation of product distribution in chemostat and batch fermentation in lactic acid-producing *Komagataella phaffii* strains utilizing glycerol as substrate. *Microorganisms* **8**, (2020).
50. Aso, Y. *et al.* Continuous production of D-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using β -glucosidase-displaying *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **127**, (2019).
51. da Silva, G. P., Mack, M. & Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* **27** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006> (2009).
52. Umpierre, A. P. & Machado, F. Gliceriquímica e Valorização do Glicerol. *Revista Virtual de Química* **5**, (2013).
53. Yazdani, S. S. & Gonzalez, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology* **18** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.002> (2007).
54. Lobo, I. P., Ferreira, S. L. C. & Cruz, R. S. da. Biodiesel: Quality parameters and analytical methods. *Química Nova* **32**, (2009).
55. George, F. *et al.* Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology* **9** Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899> (2018).
56. Mokoena, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* **22** Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules22081255> (2017).
57. Wang, Y. *et al.* Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9** Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285> (2021).
58. Kuley, E. *et al.* The role of selected lactic acid bacteria on organic acid accumulation during wet and spray-dried fish-based silages. Contributions to the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability. *Microorganisms* **8**, (2020).
59. Park, S. Y., Do, J. R., Kim, Y. J., Kim, K. S. & Lim, S. D. Physiological characteristics and production of folic acid of *Lactobacillus plantarum* JA71 isolated from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **34**, (2014).
60. Liu, Y., van Bennekom, E. O., Zhang, Y., Abee, T. & Smid, E. J. Long-chain vitamin K2 production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism. *Microbial Cell Factories* **18**, (2019).
61. Giraffa, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 26 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00094-3) (2002).
62. Gomes, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology* **25**, (2008).

63. Murakami, N. *et al.* L-Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **121**, 89–95 (2016).
64. Yuan, S. F. *et al.* Production of optically pure l(+)-lactic acid from waste plywood chips using an isolated thermotolerant *Enterococcus faecalis* SI at a pilot scale. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **45**, (2018).
65. Ćirić, J. *et al.* Production of lactic acid by *Enterococcus faecalis* on waste glycerol from biodiesel production. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **26**, 151–156 (2020).
66. Hassan, S. E. D., Abdel-Rahman, M. A., Roushdy, M. M., Azab, M. S. & Gaber, M. A. Effective biorefinery approach for lactic acid production based on co-fermentation of mixed organic wastes by *Enterococcus durans* BP130. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **20**, (2019).
67. Hayat, Z. *et al.* Production of Antifungal Gelatinase by *Enterococcus durans* S2C and its Potential Role in the Biological Control. *International Journal of Agriculture and Biology* **25**, (2021).
68. Fusco, V. *et al.* The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology* **6** Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155> (2015).
69. Teixeira, C. G. *et al.* O gênero *Weissella* na indústria de alimentos: Uma revisão. *Research, Society and Development* **10**, (2021).
70. Kariyawasam, K. M. G. M. M., Jeewanthi, R. K. C., Lee, N. K. & Paik, H. D. Characterization of cottage cheese using *Weissella cibaria* D30: Physicochemical, antioxidant, and antilisterial properties. *Journal of Dairy Science* **102**, (2019).
71. Teixeira, C. G. *et al.* Biodiversity and technological features of *Weissella* isolates obtained from Brazilian artisanal cheese-producing regions. *LWT* **147**, (2021).
72. Li, W., Chen, Y. & Wang, T. Cadmium biosorption by lactic acid bacteria *Weissella viridescens* ZY-6. *Food Control* **123**, (2021).
73. Carlosama Adriana, M., Rodríguez Misael, C., Londoño Guillermo, C., Sánchez Fernando, O. & Cock Liliana, S. Optimization of the reproduction of *Weissella cibaria* in a fermentation substrate formulated with agroindustrial waste. *Biotechnology Reports* **32**, (2021).
74. Ahn, B. K. *et al.* Isolation of lactic acid bacteria with anti-MRSA bacteriocin activity and characterization of the bacteriocin product. *Microbiology and Biotechnology Letters* **49**, (2021).
75. Schleifer, K. H. *et al.* Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**, (1985).
76. Casalta, E. & Montel, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**, (2008).
77. Rodríguez, N., Salgado, J. M., Cortés, S. & Domínguez, J. M. Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* **51**, (2010).

78. Bolocan, A. S. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *Journal of Applied Microbiology* **122**, (2017).
79. Souza, E. C., de Azevedo, P. O. de S., Domínguez, J. M., Converti, A. & Oliveira, R. P. de S. Influencia de la temperatura y pH en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CYTA - Journal of Food* **15**, (2017).
80. el Mecherfi, K. E. *et al.* Fermentation of Gluten by *Lactococcus lactis* LLGKC18 Reduces its Antigenicity and Allergenicity. *Probiotics Antimicrob Proteins* doi:10.1007/s12602-021-09808-1. (2021).
81. Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M. & Oliveira, R. P. S. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances* **35** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004> (2017).
82. Juodeikiene, G. *et al.* Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. strains. *International Journal of Food Science & Technology* **51**, (2016).
83. Othman, M., Ariff, A. B., Kapri, M. R., Rios-Solis, L. & Halim, M. Growth Enhancement of Probiotic *Pediococcus acidilactici* by Extractive Fermentation of Lactic Acid Exploiting Anion-Exchange Resin. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
84. Zhang, Z., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M. & Angelidaki, I. Bio-augmentation to improve lactic acid production from source-sorted organic household waste. *Journal of Cleaner Production* **279**, (2021).
85. Das, S., Mandal, V. & Mandal, N. C. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of *Pediococcus acidilactici* LAB001 against food spoilage and toxigenic bacteria and fungi. *Journal of Food Processing and Preservation* **45**, (2021).
86. Qiu, Z., Gao, Q. & Bao, J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology* **249**, (2018).
87. Campos, J., Bao, J. & Lidén, G. Optically pure lactic acid production from softwood-derived mannose by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Biotechnology* **335**, (2021).
88. Lunelli, B. H. *et al.* Production of lactic acid from sucrose: Strain selection, fermentation, and kinetic modeling. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **161**, (2010).
89. Li, Y. & Shahbazi, A. Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes. in *Applied Biochemistry and Biotechnology* **132** (2006).
90. Pal, P., Sikder, J., Roy, S. & Giorno, L. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **48**, (2009).
91. Alvarado-Morales, M., Kuglarz, M., Tsapekos, P. & Angelidaki, I. Municipal biopulp as substrate for lactic acid production focusing on downstream processing. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **9**, (2021).
92. Thygesen, A., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M. & Angelidaki, I. Valorization of municipal organic waste into purified lactic acid. *Bioresource Technology* **342** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125933> (2021).

93. Anbreen, A., Ramzan, N. & Faheem, M. A Heat-Integrated Reactive Distillation Process for Methyl Lactate Hydrolysis. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **170**, (2022).
94. Liu, H., Valdehuesa, K. N. G., Nisola, G. M., Ramos, K. R. M. & Chung, W. J. High yield production of d-xylonic acid from d-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* **115**, 244–248 (2012).
95. Coelho, L. F., Sass, D. C., Avila Neto, P. M. & Contiero, J. Evaluation of a new method for (L+) lactic acid purification, using ethyl ether. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **26**, (2020).
96. Ahmad, A., Othman, I., Taher, H. & Banat, F. Lactic acid recovery from date pulp waste fermentation broth by ions exchange resins. *Environmental Technology & Innovation* **22**, (2021).
97. Zaini, N. A. M., Chatzifragkou, A., Tverezovskiy, V. & Charalampopoulos, D. Purification and polymerisation of microbial D-lactic acid from DDGS hydrolysates fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **150**, (2019).
98. 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 (Philadelphia)* **54**, (2019).
99. Marin, P. Remoção do corante azul reativo 5G em coluna de leito fixo empacotada com adsorvente comercial DOWEX Optipore SD-2. Mestrado em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, (2013).
100. Crespy, D. & Landfester, K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **6**, (2010).
101. Barroso, R. G. M. R., Gonçalves, S. B. & Machado, F. A novel approach for the synthesis of lactic acid-based polymers in an aqueous dispersed medium. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **15**, (2020).
102. Jordan, A., Whymark, K. D., Sydenham, J. & Sneddon, H. F. A solvent-reagent selection guide for Steglich-type esterification of carboxylic acids. *Green Chemistry* **23**, (2021).
103. Odian, G. *Principles of Polymerization. Principles of Polymerization* (2004). doi:10.1002/047147875x.
104. Machado, F., Lima, E. L. & Pinto, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. *Polímeros* **17**, (2007).
105. Braun, D., Cherdron, H., Rehahn, M., Ritter, H. & Voit, B. *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments. Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments* (2005). doi:10.1007/b138247.
106. Blackley, D. C. Emulsion polymerization: A mechanistic approach. *Polymer (Guildf)* **38**, (1997).
107. Thickett, S. C. & Gilbert, R. G. Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms. *Polymer* **48** Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.031> (2007).
108. Landfester, K., Bechthold, N., Tiarks, F. & Antonietti, M. Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions. *Macromolecules* **32**, (1999).

109. Bradford, K. G. E. *et al.* Ubiquitous Nature of Rate Retardation in Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **143**, 17769–17777 (2021).
110. Resendiz-Lara, D. A. & Wurm, F. R. Polyphosphonate-Based Macromolecular RAFT-CTA Enables the Synthesis of Well-Defined Block Copolymers Using Vinyl Monomers. *ACS Macro Letters Journal* **10**, 1273–1279 (2021).
111. Pimenta, D. F. N. Efeito da fonte externa de carbono na partida de reator uasb no tratamento de drenagem ácida de minas. Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas-MG, (2014).
112. Haribabu, P. M. & Vijayakrishna, K. Controlled Polymerization of N-Vinyl Imidazole, N-Vinyl Pyrrolidone, and N-Vinyl Carbazole with Dithiocarbamates toward High Molar Mass Polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **225**, (2024).
113. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. v & Clark, D. P. *Brock. Biologia de Los Microorganismos 14ED. Biologia de los microorganismos* **1** (2015).
114. Johanningsmeier, S. D. & McFeeters, R. F. Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations. *Food Microbiology* **35**, (2013).
115. López-Gómez, J. P. *et al.* Organic fraction of municipal solid waste for the production of L-lactic acid with high optical purity. *Journal of Cleaner Production* **247**, (2020).
116. Szymanowska-Powałowska, D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electronic Journal of Biotechnology* **18**, (2015).
117. Bosco, F. *et al.* Pha production from cheese whey and “scotta”: Comparison between a consortium and a pure culture of *leuconostoc mesenteroides*. *Microorganisms* **9**, (2021).
118. García-Depraect, O. & León-Becerril, E. Use of a Highly Specialized Biocatalyst to Produce Lactate or Biohydrogen and Butyrate from Agro-Industrial Resources in a Dual-Phase Dark Fermentation. *Fermentation* **9**, 787 (2023).
119. Dareioti, M. A., Vavouraki, A. I., Tsigkou, K., Zafiri, C. & Kornaros, M. Dark fermentation of sweet sorghum stalks, cheese whey and cow manure mixture: Effect of PH, pretreatment and organic load. *Processes* **9**, (2021).
120. Jangra, M., Belur, P. D., Oriabinska, L. B. & Dugan, O. M. Multistrain probiotic production by co-culture fermentation in a lab-scale bioreactor. *Engineering in Life Sciences* **16**, (2016).
121. Ma, Q. *et al.* Co-utilization of carbon sources in microorganisms for the bioproduction of chemicals. *Biotechnology Advances* vol. 73 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108380> (2024).
122. Zotta, T. *et al.* Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One* **9**, (2014).
123. Zotta, T., Parente, E. & Ricciardi, A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal of Applied Microbiology* **122** Preprint at <https://doi.org/10.1111/jam.13399> (2017).

124. Ge, X. Y., Xu, Y., Chen, X. & Zhang, L. Y. Regulation of metabolic flux in *Lactobacillus casei* for lactic acid production by overexpressed *ldhL* gene with two-stage oxygen supply strategy. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**, (2015).
125. Joulak, I. *et al.* Sustainable use of agro-industrial wastes as potential feedstocks for exopolysaccharide production by selected *Halomonas* strains. *Environmental Science and Pollution Research* **29**, 22043–22055 (2022).
126. Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W. & Rogers, P. L. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: Experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal* **14**, (2003).
127. Alfano, A. *et al.* Concentrated buffalo whey as substrate for probiotic cultures and as source of bioactive ingredients: A local circular economy approach towards reuse of wastewaters. *Fermentation* **7**, (2021).
128. Bayazit, Ş. S., Inci, I. & Uslu, H. Adsorption of lactic acid from model fermentation broth onto activated carbon and amberlite IRA-67. *Journal of Chemical & Engineering Data* **56**, (2011).
129. Gao, Q. *et al.* The role of lactic acid adsorption by ion exchange chromatography. *PLoS One* **5**, (2010).
130. Moldes, A. B., Alonso, J. L. & Parajó, J. C. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **25**, (2003).
131. McElroy, C. R., Constantinou, A., Jones, L. C., Summerton, L. & Clark, J. H. Towards a holistic approach to metrics for the 21st century pharmaceutical industry. *Green Chemistry* **17**, (2015).
132. Allasia, M., Aguirre, M., Gugliotta, L. M., Minari, R. J. & Leiza, J. R. High biobased content waterborne latexes stabilized with casein. *Progress in Organic Coatings* **168**, (2022).
133. Llorente, O., Barquero, A., Paulis, M. & Leiza, J. R. Challenges to incorporate high contents of bio-based isobornyl methacrylate (IBOMA) into waterborne coatings. *Progress in Organic Coatings* **172**, (2022).
134. Cunningham, V. J. *et al.* Poly(glycerol monomethacrylate)-poly(benzyl methacrylate) diblock copolymer nanoparticles via RAFT emulsion polymerization: Synthesis, characterization, and interfacial activity. *Macromolecules* **47**, 5613–5623 (2014).
135. Auras, R., Harte, B. & Selke, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience* **4** Preprint at <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043> (2004).

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 06 de novembro de 2024.

Programa: Programa de Pós-graduação em Química

Nome completo: Raissa Gabriela Martins Reis Barroso

Título do Trabalho: Produção de ácido lático: seleção de bactérias, purificação e síntese de novos polímeros renováveis

Nível: () Mestrado (x) Doutorado

Orientador/a: Fabricio Machado Silva

Assinatura do/a discente: *Raissa Gabriele Martins Reis Barroso.*