

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MATHEUS LOPES HARTH

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO: VIABILIDADE
ECONÔMICA E AVALIAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS**

São Carlos – SP

2022

Matheus Lopes Harth

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO: VIABILIDADE
ECONÔMICA E AVALIAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS**

Tese apresentado a banca examinadora da
Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Doutor
em Engenharia Química.

Orientador: Dr. Antonio Carlos Luperni
Horta

Co-orientador: Dr. Felipe Fernando Furlan

São Carlos – SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Matheus Lopes Harth, realizada em 28/10/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano (UFSCar)

Prof. Dr. Gilson Campani Júnior (UFLA)

Prof. Dr. Andrew Milli Elias (EMBRAPA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Ilza, ao meu pai, Paulo (*in memoriam*) e ao meu irmão, Rafael pelo apoio e suporte incondicional. Vocês foram essenciais nesta minha caminhada no mundo acadêmico.

Aos meus orientadores, professores Antonio Carlos Luperni Horta e Felipe Fernando Furlan, pelo acolhimento no PPGEQ/UFSCar, pelos conhecimentos transmitidos e dedicação. Vocês me mostraram um outro lado de Bioprocessos e se tornaram essenciais em minha formação acadêmica.

Aos companheiros de LaDABio 4, María Carlota, Vítor, Eric, Murilo, Letícia, Laiane, Rafael Akira, Rafael de Araújo, Nicole, Valdemir e Davi, pela amizade e tempo dividido durante esta jornada, tornando os dias (e algumas noites) mais divertidos e leves. É uma honra tê-los conhecidos e poder chamá-los de amigos.

Aos colegas do grupo de cultivos, Vanessa, Thiago, Carol, Juliana, Daniel, Josivan (*in memoriam*), Richard e Cíntia, pelo companheirismo e conhecimentos trocados, dentro e fora das reuniões.

Aos demais amigos e colegas da “AP 35”, Manu, Thaís Milessi, Felipe (*in memoriam*), Ediane, pelas conversas de corredor, algumas descontraídas, outras com ensinamentos e conhecimentos valiosos.

Aos amigos da UEM, Eugênia e Tiago, que, mesmo com a distância, sempre estiveram presentes ao longo dos anos.

A Larissa, uma grande amiga que tem as melhores indicações de livros. Desde que nos conhecemos em 2007, sempre tivemos uma conexão ímpar, que se tornou muito importante e querida por mim.

Às técnicas Thais e Alyne, que sempre me atenderam e me ajudaram com cordialidade e paciência. A ajuda e conhecimentos delas foram imprescindíveis para as análises cromatográficas.

A todos membros e membras de banca de acompanhamento, qualificação e defesa, por aceitarem os convites, pela disponibilidade e dedicação, que fizeram contribuições que melhoraram a qualidade desta tese.

A empresa Kerry, pela doação da peptona de soja utilizada nos ensaios experimentais.

A todas outras pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma neste trabalho que não foram citadas nominalmente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (FAPESP) – Proc. 2016/10636-8.

RESUMO

Ácido hialurônico é um biopolímero com propriedades estruturais e reológicas únicas, que, inicialmente, era produzido através de sua extração de tecidos animais, em especial a crista de galo. No entanto, o uso de solventes agressivos ao meio ambiente (clorofórmio) e altos custos de purificação para remover contaminantes da crista do galo motivou sua produção através do cultivo de bactérias *Streptococcus zooepidemicus*. Diante disto, este trabalho propôs realizar uma análise técnico-econômica-ambiental da produção de ácido hialurônico microbiano usando *S. zooepidemicus* incorporado a uma biorrefinaria de bioetanol de primeira geração. A análise técnico-econômica foi conduzida em EMSO, enquanto a análise ambiental foi feita através da Análise de Ciclo de Vida (ACV) com a abordagem portão-ao-portão. Inicialmente, testou-se usar o caldo de açúcar extraído da cana como fonte de carbono e o vapor e energia elétrica requeridos eram gerados pela usina atingindo um Valor Presente Líquido (VPL) de US\$ 18,43 milhões com uma taxa retorno sobre o investimento de 12,5%. Tal viabilidade pode aumentar ainda mais ao se aproveitar mais outras frações da biorrefinaria, como o excedente de leveduras para produção de extrato de levedura e suprimindo adição de sais ao meio de cultivo, aumentando o VPL em 37,1% e 11,6%, respectivamente. Do ponto de vista ambiental, a ACV mostrou que uma das etapas com mais impacto ambiental é a etapa de Produção, em especial o consumo de hidróxido de sódio, que é consumido tanto para as limpezas como para controle de pH do biorreator, representando 78% do total para o Potencial de Aquecimento Global. Como não é possível suprimir a etapa de limpeza por normas de agências reguladores, testou-se não controlar o pH do cultivo, através da redução da conversão de sacarose para 50%, e analisar o impacto econômico que haveria. Tal mudança inviabilizou economicamente o empreendimento. A influência do pH foi testada em ensaios experimentais em frascos agitados, que mostraram que o controle de pH possui um grande efeito em cultivos de *S. zooepidemicus*, em especial no aspecto do crescimento celular.

Palavras-chave: ácido hialurônico, avaliação técnico-econômica, análise de ciclo de vida, avaliação técnico-econômica-ambiental, AH, *Streptococcus zooepidemicus*.

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a biopolymer with unique structural and rheological properties, that, initially, was produced by extraction from animal tissue, from rooster comb. However, it used non-ecofriendly solvents (chloroform) and high purification costs to remove contaminants from the rooster comb motivated its manufacture from *Streptococcus zooepidemicus* bacteria cultivation. Considering this, our study proposed to do a techno-economic-environmental analysis of microbial hyaluronic acid production incorporated to a bioethanol biorefinery with *S. zooepidemicus*. The techno-economic analysis was conducted in EMSO, while the environmental analysis was done via Life Cycle Analysis, with the approach of gate-to-gate. At first, sugarcane juice was evaluated as carbon source and the required steam and electricity were provided from the sugarcane factory, which resulted in a net present value (NPV) of US\$ 18.43 million with a return-on-investment rate of 12.5%. Economic feasibility can enhance further by utilizing more fractions from the biorefinery, such as yeast surplus for yeast extract production and not adding the salts to the cultivation medium, which increase NPV in 37.1% and 11.6%, respectively. From the environmental point-of-view, the Life Cycle Analysis showed the step with more environmental impact was the Production, especially the sodium hydroxide consumption for the cleaning-in-place and pH control, representing 78% of the total impact for Global Warming Potential. As the cleaning-in-place cannot be suppressed due to rules of regulatory agencies, we assessed the effect of not controlling the cultivation pH and assess its impact by reducing sucrose conversion to 50%. Such change made the process economically unfeasible, confirming what the shaken flasks cultivation showed: pH control has a significant effect on the cultivation of *S. zooepidemicus*, especially in the growth aspect of it.

Keywords: hyaluronic acid, techno-economic analysis, life cycle assessment, techno-economic-environmental analysis, HA, *Streptococcus zooepidemicus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1. Interesse do (a) público leigo obtido no Google Trends e (b) da comunidade acadêmica medido pelo número de artigos publicados no Web of Science e SCOPUS.18
- Figura 2.2. Representação (a) linear e (b) tridimensional do monômero do ácido hialurônico.19
- Figura 2.3. Projeção do volume de mercado mundial do ácido hialurônico de 2019 a 2027.21
- Figura 2.4. Quantidade de procedimentos com toxina botulínica, ácido hialurônico, hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-L-lático realizados no mundo entre 2021 e 2014 por cirurgias plásticas.22
- Figura 2.5. Valor arrecado com procedimentos estéticos não-cirúrgicos com injeção de toxina botulínica, ácido hialurônico, hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-L-lático nos Estados Unidos entre 2019 e 2012.23
- Figura 2.6. Projeção do volume do mercado dos Estados Unidos de ácido hialurônico como preenchimento facial estético.....24
- Figura 2.7. Projeção do volume do mercado dos Estados Unidos de ácido hialurônico usado para viscosuplementação em pacientes com osteoartrite.....26
- Figura 2.8. Via de biossíntese do ácido hialurônico em *Streptococcus zooepidemicus*, utilizando glicose como principal fonte de carbono.29
- Figura 2.9. Comportamento da (a) concentração e (b) massa molar de ácido hialurônico em relação a concentração de oxigênio dissolvido (COD) em cultivos submersos de *Streptococcus zooepidemicus*.....42
- Figura 2.10. Estrutura da Análise de Ciclo de Vida.....47
- Figura 3.1 (a) Perfil de crescimento celular (C_X), (b) variação da velocidade máxima de crescimento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) em função da concentração inicial de glicose ($C_{glicose}$) e (c) perfil do pH de cultivos de *S. zooepidemicus* em frascos agitados a 200 rpm em diferentes concentrações iniciais de glicose (0 a 60 g L⁻¹) com concentração de peptona (40 g L⁻¹), temperatura de 37 C. 62
- Figura 3.2. Influência de cultivo em temperatura mais baixa (27 °C) e do uso de MOPS em duas concentrações diferentes (21 e 32,5 g L⁻¹) no (A) perfil de crescimento e (B) concentração final de *Streptococcus zooepidemicus* em meio glicose (20 g L⁻¹) e

	peptona de soja (40 g L ⁻¹) em frascos agitados a 200 rpm, com cultivos feitos em duplicata em paralelo.	64
Figura 3.3.	pH final de cultivos de <i>S. zooepidemicus</i> em diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e concentrações de MOPS (21 e 32,5 g L ⁻¹) em meio glicose (20 g L ⁻¹) e peptona de soja (40 g L ⁻¹) em frascos agitados a 200 rpm, conduzidos em duplicata em paralelo.	65
Figura 3.4.	Efeitos do cultivo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> em frascos agitados a 200 rpm sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) no (A) perfil de crescimento e (B) concentração de ácido hialurônico final em meio glicose (20 g L ⁻¹), peptona de soja (40 g L ⁻¹) e MOPS (32,5 g L ⁻¹), com cultivos conduzidos em duplicata em paralelo.	66
Figura 3.5.	pH final dos cultivos de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> em frascos agitados a 200 rpm sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) em meio glicose (20 g L ⁻¹), peptona de soja (40 g L ⁻¹) e MOPS (32,5 g L ⁻¹), conduzidos em duplicata em paralelo.	66
Figura 3.6.	Efeitos do cultivo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) em meio peptona de soja (40 g L ⁻¹) e MOPS (32,5 g L ⁻¹) na (A) concentração celular, (B) de ácido hialurônico e (C) pH final, sendo os cultivos conduzidos em duplicata em paralelo.	67
Figura 4.1.	Perfil de concentração de (a) <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , (b) ácido hialurônico, (c) fontes de carbono e (d) pH de cultivos em duplicata usando sacarose, xilose e glicerol como fontes de carbono em frascos agitados a 37 °C e 200 rpm com pH 7 inicial.	73
Figura 4.2.	Fluxogramas de (a) Ferreira et al. (2021) e (b) Rangaswamy e Jain (2008) utilizados para produção de ácido hialurônico microbiano em escala industrial.	76
Figura 5.1.	Representação simplificada do fluxograma adotado para a análise técnico-econômica-ambiental.	84
Figura 5.2.	Gráfico de ocupação de equipamentos para a produção de ácido hialurônico. As barras indicam o tempo total de operação do equipamento, incluindo tempos de carga, descarga, operação, limpeza e esterilização, quando necessário.	99

Figura 5.3.	Diagramas (a) T-x-y e (b) de composição do equilíbrio líquido-vapor para mistura isopropanol-água a 2,04 atm usando o modelo de Wilson de acordo com os parâmetros de Farajnezhad et al. (2016). Ambos os diagramas utilizam fração molar.	92
Figura 5.4.	Fluxo de caixa de uma indústria de produção de ácido hialurônico industrial com preço de venda de US\$ 1300/kg, taxa mínima de atratividade de 6,90% e investimento capital de US\$ 42,31 milhões.	102
Figura 5.5.	Distribuição dos custos capitais de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.	103
Figura 5.6.	Custos dos equipamentos de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas separados por seções para o ano de 2021.	104
Figura 5.7.	Custos operacionais de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.	105
Figura 5.8.	Efeito do custo do extrato de levedura no (a) Valor Presente Líquido e (b) Preço Mínimo de Venda.	106
Figura 5.9.	Avaliação do impacto ambiental de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas em valores (a) absolutos e (b) relativos separado pelas seções do processo.	107
Figura 5.10.	Avaliação do impacto ambiental de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas em valores (a) absolutos e (b) relativos separados pelos fluxos de cada componente do inventário.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Compilação de microrganismos utilizados para a produção heteróloga de ácido hialurônico com os microrganismos de origem da hialuronato sintase, modo de operação empregado, concentração, massa molar e produtividade volumétrica de AH.....	32
Tabela 2.2.	Compilação das fontes de carbono e nitrogênio, modo de operação do biorreator, concentração, massa molar e produtividades de trabalhos que produziam ácido hialurônico usando microrganismos que o produzem naturalmente.....	33
Tabela 2.3.	Compilação das fontes de carbono e nitrogênio, modo de operação do biorreator, concentração, massa molar e produtividades de trabalhos que produziam ácido hialurônico usando microrganismos que o produzem naturalmente.....	34
Tabela 2.4.	Efeitos do uso de inibidor da glicólise (iodoacetato) e promotor da produção de N-acetilglicosamina-6-fosfato (glutamina) na formação de biomassa e ácido hialurônico.....	38
Tabela 2.5.	Compilação com informações a respeito de fontes de carbono e de nitrogênio, modo de operação, concentração, massa molar e produtividade de ácido hialurônico microbiano produzido através de resíduos e subprodutos industriais.	40
Tabela 2.6.	Comparação de diferentes estratégias de cultivo baseadas no controle de temperatura de biorreatores tipo tanque agitado.....	43
Tabela 4.1.	Concentração em g L^{-1} e massa molar ($\text{g C}\cdot\text{mol}^{-1}$) de glicose, sacarose, glicerol e xilose utilizados nos cultivos.	71
Tabela 4.2.	Valores de concentração celular ($C_{X,\text{final}}$ [g L^{-1}]), concentração de ácido hialurônico ($C_{\text{AH},\text{final}}$ [g L^{-1}]), pH e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h^{-1}]) para diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, glicerol e xilose) utilizados nos cultivos em frascos agitados a 37 °C, 20 rpm e pH inicial 7.	74
Tabela 5.1.	Fórmulas mínimas e massa molecular dos compostos envolvidos na reação estequiométrica de crescimento celular de <i>S. zooepidemicus</i> WSH-24.....	85
Tabela 5.2.	Principais premissas utilizadas para a produção industrial de ácido hialurônico microbiana.	89

Tabela 5.3.	Entradas de matérias-primas, energia elétrica e vapor de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.	98
Tabela 5.4.	Resumo dos parâmetros de dimensionamentos de todos os equipamentos utilizados na indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.....	100
Tabela 5.5.	Resumo dos indicadores econômicos utilizados para analisar uma indústria de produção de ácido hialurônico microbiano: investimento capital, valor presente líquido, custo unitário de produção, preço mínimo de venda, retorno sobre o investimento e tempo de retorno do investimento.....	101
Tabela 5.6.	Principais indicadores econômicos (Valor Presente Anual, Preço Mínimo de Venda e CAPEX) caso não se controle o pH com produção anual de 7,56 e 20 t ano ⁻¹ ;	110

LISTA DE SÍMBOLOS, LETRAS GREGAS, SOBRESCRITO E SUBSCRITOS

SÍMBOLOS

A	Área	(m ²)
a	Raio de sedimentação	(m)
AC	Acidificação	(kg SO ₂ eq)
AD	Esgotamento Abiótico (do inglês, <i>Abiotic Depletion</i>)	(kg Sb eq)
AH	Ácido Hialurônico	
ANOVA	Análise de Variância	
ATCC	American Type Culture Collection	
ATP	Trifosfato de Adenosina	
BHI	Infusão de cérebro de coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)	
C	Concentração	
Ca ²⁺	Íon cálcio	
CaCl ₂	Cloreto de cálcio	
CaCO ₃	Carbonato de cálcio	
CAPEX	Custo Capital (do inglês, <i>Capital Expenditure</i>)	(US\$)
COD	Concentração de Oxigênio Dissolvido	(%)
C _p	Custo Unitário do Equipamento	(US\$)
Cu ²⁺	Íon cobre II	
CuSO ₄	Sulfato de cobre	
D	Diâmetro	(m)
Da	Dalton	
DO ₆₀₀	Densidade Óptica a 600 nm	(-)
DV	Diavolumes	(-)
EMSO	<i>Environment for Modelling, Simulation and Optimization</i>	
EU	Eutrofização	(kg PO ₄ ³⁻ eq)
FC	Fluxo de Caixa	(US\$)
f _c	Fator de correção geométrico	(-)
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)	
Fe ²⁺	Íon ferro II	
FeSO ₄	Sulfato de ferro II	

FWAET	Ecotoxicidade Aquática de Água Doce (do inglês <i>Freshwater Aquatic Ecotoxicity</i>)	(kg 1,4-DB eq)
g	Aceleração da gravidade	(m s ⁻²)
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês <i>Generally Recognized as Safe</i>)	
GWP100	Potencial de Aquecimento Global para 100 anos (do inglês <i>Global Warming Potential over 100 years</i>)	(kg CO ₂ eq)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico	
HT	Ecotoxicidade Humana (do inglês, <i>Human Toxicity</i>)	(kg 1,4-DB eq)
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio	
MAET	Ecotoxicidade Aquática Marinha (do inglês <i>Marine Aquatic Ecotoxicity</i>)	(kg 1,4-DB eq)
Mg ²⁺	Íon magnésio	
MgSO ₄	Sulfato de magnésio	
MM	Massa Molecular	(Da)
Mn ²⁺	Íon manganês	
MnSO ₄	Sulfato de manganês	
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico	
m	Vazão mássica	(kg s ⁻¹)
MS	Índice Marshall & Swift	(-)
N	Velocidade do impelidor	(s ⁻¹)
Na ⁺	Íon sódio	
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico	
NADH/NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo	
P	Potência	(W)
PA	Padrão analítico	
pH	Potencial Hidrogeniônico	(-)
Po	Número de Potência	(-)
PO	Oxidação Fotoquímica (do inglês, <i>Photochemical Oxidation</i>)	(kg C ₂ H ₄ eq)
Pr	Produtividade	(kg ⁻¹ L h ⁻¹)
Q	Vazão volumétrica	(m ³ s ⁻¹)

R_i	Velocidade de reação volumétrica	(mol L ⁻¹ h ⁻¹)
r	Taxa	(-)
s	Fração no sistema transformado	(-)
t	Tempo	(h)
T	Temperatura	(°C)
TET	Ecotoxicidade Terrestre (do inglês <i>Terrestrial Ecotoxicity</i>)	(kg 1,4-DB eq)
TH	Todd-Hewitt	
THY	Todd-Hewitt-Yeast	
V	Volume	(L)
v_g	Velocidade superficial do gás	(m s ⁻¹)
v_s	Velocidade de sedimentação	(m s ⁻¹)
VPL	Valor Presente Líquido	(US\$)
X	Biomassa	
x	Fração na fase líquida	(-)
y	Fração na fase vapor	(-)
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimento de produto em relação a substrato	(g g ⁻¹)
z	Fração	(-)
Zn^{2+}	Íon zinco	
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco	

LETRAS GREGAS

Σ	Fator sigma de centrífugas	(m ²)
ε	Hold-up	(-)
μ	Viscosidade dinâmica	(cP)
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular	(h ⁻¹)
ρ	Massa específica	(kg m ⁻³)
σ	Coefficiente de rejeição da membrana	(-)
τ	Tempo de residência	(h)

SOBRESCRITOS

e	Entrada
R	Retentado
s	Saída
^	Em condição padrão

SOBRESCRITOS

0	Inicial
b	“Bulk”, referente ao meio como um todo
G	Gaseificado
i	<i>i</i> -ésimo componente
NG	Não-gaseificado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.2	ESTRUTURA DO TEXTO	16
1.3	REFERÊNCIAS	17
2	REVISÃO	18
2.1	ESTRUTURA E PROPRIEDADES	19
2.2	APLICAÇÕES	20
2.3	MERCADO	20
2.3.1	Preenchimento cutâneo	21
2.3.2	Viscossuplementação	24
2.4	PRODUÇÃO	26
2.4.1	Produção animal	27
2.4.2	Produção microbiana	28
2.4.2.1	Microrganismos	28
2.4.2.2	Meio de cultivo	35
2.4.2.2.1	<i>Fonte de carbono</i>	35
2.4.2.2.2	<i>Fonte de nitrogênio</i>	37
2.4.2.2.3	<i>Demais componentes</i>	38
2.4.2.2.4	<i>Uso de resíduos e subprodutos</i>	39
2.4.2.3	Aeração e agitação	41
2.4.2.4	Temperatura	42
2.5	ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA	43
2.5.1	Análise técnico-econômica da produção de ácido hialurônico	45
2.6	ANÁLISE DE CICLO VIDA	46
2.7	REFERÊNCIAS	48
3	ESTRATÉGIAS DE CONDUÇÃO DE CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS	58
3.1	INTRODUÇÃO	58
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.2.1	Microrganismo e meios de cultura	58
3.2.2	Cultivos	59
3.2.3	Separação e purificação do ácido hialurônico	59
3.2.4	Métodos analíticos	60
3.3	PROCEDIMENTOS MATEMÁTICOS	60
3.3.1	Cálculo de velocidade específica de crescimento máxima	60
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.4.1	Inibição por glicose	61
3.4.2	Viabilidade do uso de tampão	63
3.4.3	Estratégias para mitigar a queda do pH	65
3.5	CONCLUSÕES	67
3.6	REFERÊNCIAS	68
4	INCORPORANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO À BIORREFINARIAS DE ETANOL: ESCOLHA DA FONTE DE CARBONO E DO FLUXOGRAMA	70

4.1	INTRODUÇÃO	70
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
4.2.1	Microrganismo e meios	71
4.2.2	Cultivos	72
4.2.3	Métodos analíticos, separação e purificação de ácido hialurônico	72
4.2.4	Métodos matemáticos	72
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.3.1	Escolha da fonte de carbono	73
4.3.2	Escolha e desenvolvimento do processo.....	75
4.4	CONCLUSÕES	76
4.5	REFERÊNCIAS	77
5	ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO: UMA ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA-AMBIENTAL DE SUA PRODUÇÃO EM UMA BIORREFINARIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS	81
5.1	INTRODUÇÃO.....	81
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
5.2.1	Descrição do processo.....	82
5.2.1.1	Inóculo e Produção	85
5.2.1.1.1	<i>Estequiometria.....</i>	<i>85</i>
5.2.1.2	Recuperação Primária.....	86
5.2.1.3	Purificação	87
5.2.1.4	Recuperação de Solvente.....	87
5.2.1.5	Tratamento de resíduos biológicos.....	87
5.2.2	Simulação e avaliação técnico-econômica	87
5.2.2.1	Dimensionamento da coluna de destilação.....	92
5.2.2.2	Custos dos equipamentos.....	94
5.2.2.2.1	<i>Ultrafiltração em modo diafiltração</i>	<i>94</i>
5.2.2.2.2	<i>Centrífuga.....</i>	<i>95</i>
5.2.2.2.3	<i>Spray-dryer.....</i>	<i>95</i>
5.2.2.3	Cálculo do volume e potência de agitação do biorreator.....	96
5.2.3	Análise de Ciclo de Vida	96
5.3	RESULTADOS	97
5.3.1	Aspectos de processo	97
5.3.1.1	Destilação e dimensionamentos.....	99
5.3.2	Aspectos econômicos.....	101
5.3.3	Aspectos ambientais	107
5.3.4	Impacto técnico-econômico de cultivos sem controle de pH.....	109
5.4	CONCLUSÕES	110
5.5	REFERÊNCIAS	111
6	CONCLUSÕES.....	115
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
8	APÊNDICE	117
8.1	APÊNDICE A.....	117

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um biopolímero de alta massa molar e viscosidade, que foi inicialmente identificado no humor vítreo bovino (MEYER; PALMER, 1934; MEYER; SMYTH; DAWSON, 1939). As propriedades reológicas deste biopolímero logo atraíram o interesse para sua produção industrial. Inicialmente, ele era extraído de crista de galos jovens. Hoje, estima-se que toda a produção de ácido hialurônico seja feita através de cultivos de bactérias, como *S. zooepidemicus*, uma vez que esta rota oferece maior produtividade e menores custos de purificação (SHIEDLIN et al., 2004).

Este biopolímero tem sido usado nos mais diversos âmbitos da Ciência. Tradicionalmente, por conta de sua alta viscoelasticidade, ele é utilizado em injeções de viscosuplementação em pessoas que sofrem de artrite ou artrose para diminuir as dores inerentes de tais enfermidades e em cirurgias oftalmológicas. Além disso, por conta de sua capacidade de reter água em suas cadeias, o ácido hialurônico tem sido muito utilizado na formulação de diversos produtos cosméticos e em procedimentos de preenchimento cutâneo.

Além disso, este biopolímero se destaca no atual contexto de busca por bioprocessos com baixa produção de resíduos que substituam antigos processos mais agressivos ao meio ambiente, por se tratar de um produto de alto valor – o preço de exportação pode chegar até 50000 \$ kg⁻¹ – que, em apenas 10 anos, sua produção industrial pela via microbiana substituiu a extração de crista de galo (CIRIMINNA; SCURRIA; PAGLIARO, 2021). Este impacto ambiental e o custo de produção, no entanto, podem ser mitigados ainda mais usando fontes de carbono e nitrogênio renováveis, por exemplo, uma biomassa lignocelulósica apropriada proveniente de unidades de biorrefinarias de açúcares de segunda geração (RUSCHONI et al., 2022).

Por conta de sua crescente demanda, as pesquisas de produção de ácido hialurônico têm aumentado, no entanto, a maioria delas foca apenas no aspecto de sua produção, quer sejam através de otimização de técnicas de cultivo, desenvolvimento de novas linhagens ou desenvolvimento de meios. Poucos trabalhos são norteados por análises técnico-econômicas (CERMINATI et al., 2021; FERREIRA et al., 2021; TORRES-ACOSTA et al., 2021) e, dentro da pesquisa conduzida, nenhum trabalho avaliou o impacto ambiental que a produção de ácido hialurônico microbiano possui.

Um outro aspecto a ser considerado na produção de ácido hialurônico é o controle do pH, que é uma variável indispensável em cultivos microbianos, em especial

aqueles que envolvem a produção de ácidos orgânicos, que é o caso deste biopolímero. O pH pode influenciar diferentes etapas do bioprocessamento, como o próprio cultivo (PIRES; SANTANA, 2010), a precipitação do produto (CAVALCANTI et al., 2019; CAVALCANTI; SANTANA, 2019) e a remoção de proteínas por adsorção com carvão ativado (OLIVEIRA, 2018).

1.1 OBJETIVOS

Neste contexto, este trabalho possui como objetivo geral estudar a viabilidade técnico-econômica-ambiental da produção de ácido hialurônico através de cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* acoplado a uma biorrefinaria de biocombustíveis.

Os objetivos específicos são:

- Avaliação da necessidade e técnicas de controle de pH em cultivos de *S. zooepidemicus*;
- Verificar qual fonte de carbono disponível em uma biorrefinaria de biocombustíveis é mais adequada para a produção de ácido hialurônico microbiano;
- Avaliar a viabilidade técnico-econômica de uma indústria de ácido hialurônico;
- Realizar a Análise de Ciclo de Vida desta produção de ácido hialurônico para avaliar os impactos ambientais que ela possui.

1.2 ESTRUTURA DO TEXTO

Esta tese está organizada em 7 capítulos. O primeiro capítulo é esta introdução. O segundo capítulo apresenta uma revisão da literatura sobre ácido hialurônico, suas formas de produção e estudos de análise técnico-econômica.

Os próximos 3 capítulos tratam dos resultados desta tese. O terceiro capítulo traz dados a respeito de viabilidade de cultivos em frascos agitados sem a adição de bases. O quarto capítulo traz dados a respeito da escolha de uma fonte de carbono relacionada a biorrefinarias e a escolha do fluxograma. Já o quinto capítulo mostra o estudo de viabilidade técnico-econômica-ambiental da produção de ácido hialurônico microbiano.

O sexto capítulo traz as conclusões desta tese. Por fim, encerra-se com o sétimo capítulo com sugestões para trabalhos futuros.

1.3 REFERÊNCIAS

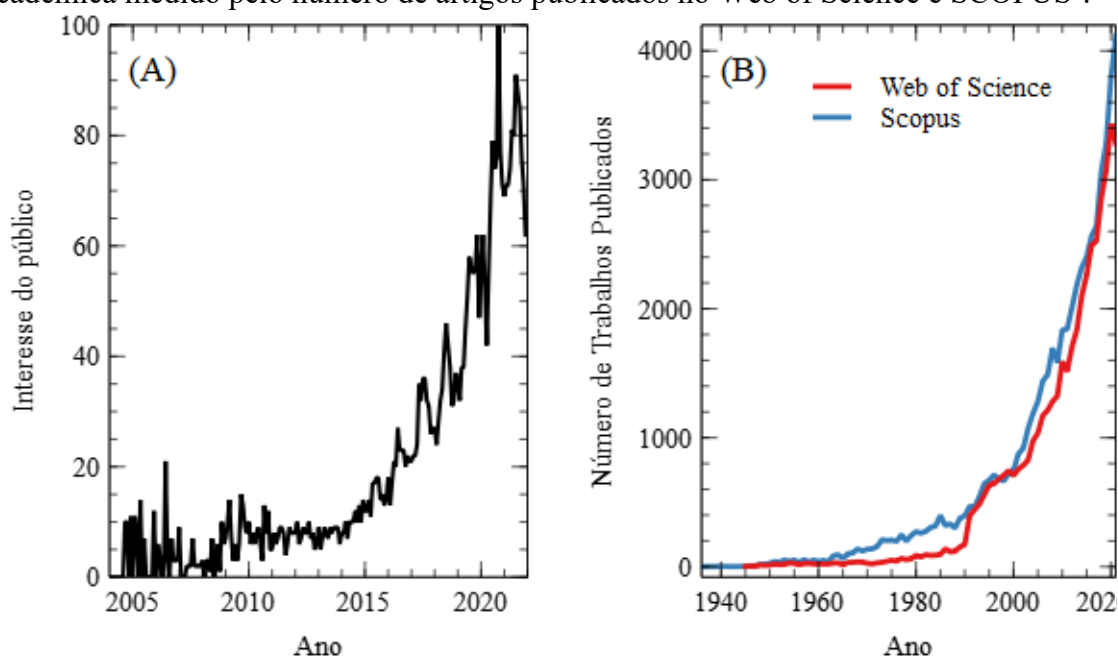
- CAVALCANTI, A. D. D. et al. Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 2, p. 527–539, 2019.
- CAVALCANTI, A. D. D.; SANTANA, M. H. A. Structural and surface properties control the recovery and purity of bio-hyaluronic acid upon precipitation with isopropyl alcohol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 573, p. 112–118, 2019.
- CERMINATI, S. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3075–3086, 2021.
- CIRIMINNA, R.; SCURRIA, A.; PAGLIARO, M. Microbial production of hyaluronic acid: the case of an emergent technology in the bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 6, p. 1604-1610, 2021.
- FERREIRA, R. G. et al. Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation. **Processes**, 2021.
- MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629–634, dez. 1934.
- MEYER, K.; SMYTH, E. M.; DAWSON, M. H. The isolation of a mucopolysaccharide from synovial fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 319–327, abr. 1939.
- OLIVEIRA, R. DE C. **Principais parâmetros de processo para produção microbiana do ácido hialurônico de alta massa molar e a sua purificação em carvão ativado**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2018.
- PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.
- RUSCHONI, U. C. M. et al. Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 9645-9661, 2022.
- SHIEDLIN, A. et al. Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: *Streptococcus zooepidemicus*, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2122–2127, 1 nov. 2004.
- TORRES-ACOSTA, M. A. et al. Comparative Economic Analysis Between Endogenous and Recombinant Production of Hyaluronic Acid. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 659, 2021.

2 REVISÃO

Em 1934, Meyer e Palmer identificaram um polissacarídeo no humor vítreo bovino com alta massa molar e viscosidade. Por conta de sua aparência vítrea e presença de um ácido urônico em sua composição, decidiu-se nomeá-lo como ácido hialurônico: uma união de “ácido urônico” e “hialoide” (do grego, *hyalus*: vítreo).

A estrutura única deste polissacarídeo lhe confere propriedades únicas, indo desde aplicações cosméticas (como preenchimento cutâneo e formulações para produtos de cuidado com a pele) até ao uso em *scaffolds* – estruturas para crescimento de células de organismos superiores. Diante disto, o interesse tanto da comunidade acadêmica, expresso em forma de trabalhos científicos publicados, como da população leiga cresce desde sua descoberta (Figura 2.1).

Figura 2.1. Interesse do (a) público leigo obtido no Google Trends¹ e (b) da comunidade acadêmica medido pelo número de artigos publicados no Web of Science e SCOPUS².



Fonte: Acervo próprio.

¹ Para a confecção deste gráfico, utilizou-se a palavra-chave “ácido hialurônico” na plataforma Google Trends em dezembro/2021.

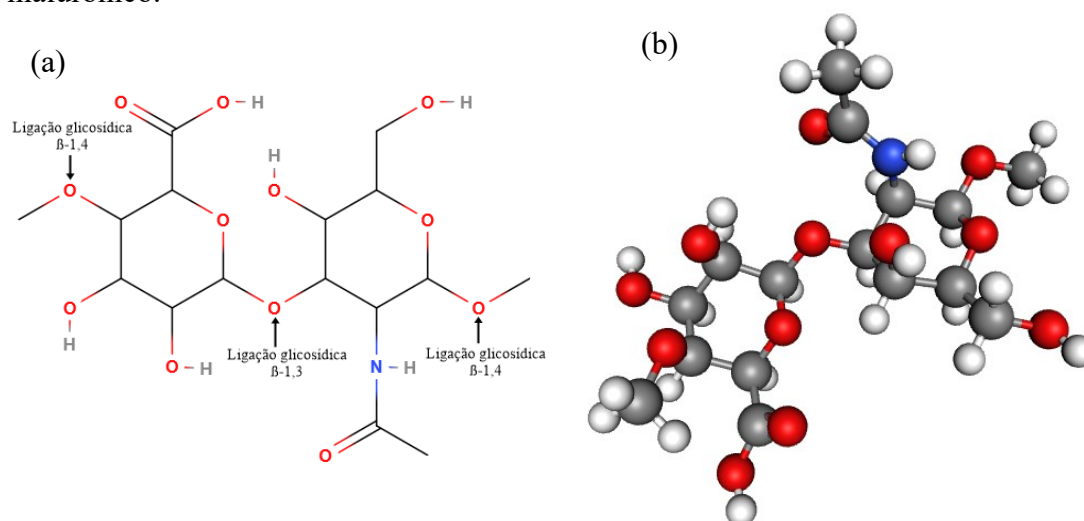
² Para a confecção deste gráfico, utilizou-se os comandos (TITLE-ABS-KEY(“hyaluronic acid” OR “hyaluronan” OR “hyaluronate”)) no SCOPUS e “hyaluronic acid” OR “hyaluronan” OR “hyaluronate” no Web Of Science em dezembro/2021.

2.1 ESTRUTURA E PROPRIEDADES

Inicialmente, acreditava-se que o monômero de ácido hialurônico era composto por um ácido urônico, um amino-açúcar e uma pentose. No entanto, estudos posteriores mostraram não havia uma pentose em sua estrutura, sendo o mesmo composto apenas por uma molécula de ácido d-glicurônico (o ácido urônico) e outra de N-acetilglicosamina (o amino-açúcar) (MEYER; SMYTH; DAWSON, 1939).

Apesar da composição do ácido hialurônico (AH) ter sido elucidada apenas cinco anos após a descoberta, sua estrutura só foi conhecida quase vinte e cinco anos depois. Verificou-se que o ácido d-glicurônico e a N-acetilglicosamina era unidos por meio de uma ligação glicosídica β -1,3, enquanto os monômeros eram unidos por uma ligação glicosídica β -1,4. Além disso, verificou-se que o polímero não é ramificado. A partir destas informações, foi possível construir uma representação gráfica da estrutura do ácido hialurônico, conforme mostra a Figura 2.2 (WEISSMANN; MEYER, 1954).

Figura 2.2. Representação (a) linear e (b) tridimensional do monômero do ácido hialurônico.



Fonte: Adaptado de Weissmann e Meyer (1954).

Por conta da composição do monômero, o ácido hialurônico é classificado como sendo glicosaminoglicano, polissacarídeos compostos por uma hexose e uma N-acetilhexosamina, em geral um ácido urônico. No entanto, o AH difere dos demais glicosaminoglicanos (como a heparina e condroitina) em alguns aspectos como, por exemplo, não ser sulfonado, não possuir nenhum peptídeo em sua estrutura primária e poder ser encontrado com massa molecular altas (da ordem de 10^7 Da) (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997).

2.2 APLICAÇÕES

A grande parte das aplicações do ácido hialurônico concentram-se na Medicina. No final da década de 1970, notou-se que, durante cirurgias de catarata, as células do epitélio eram danificadas e não se regeneravam posteriormente, o que levava a eventual cegueira nos pacientes. Para evitar este resultado, foi verificado que o uso de substâncias viscoelásticas protegiam as células do dano. O primeiro material utilizado foi o Healan[®], que era composto por ácido hialurônico. Por conta disto, o AH se tornou indispensável para condução deste procedimento cirúrgico (ASARI, 2004; BALAZS, 2004).

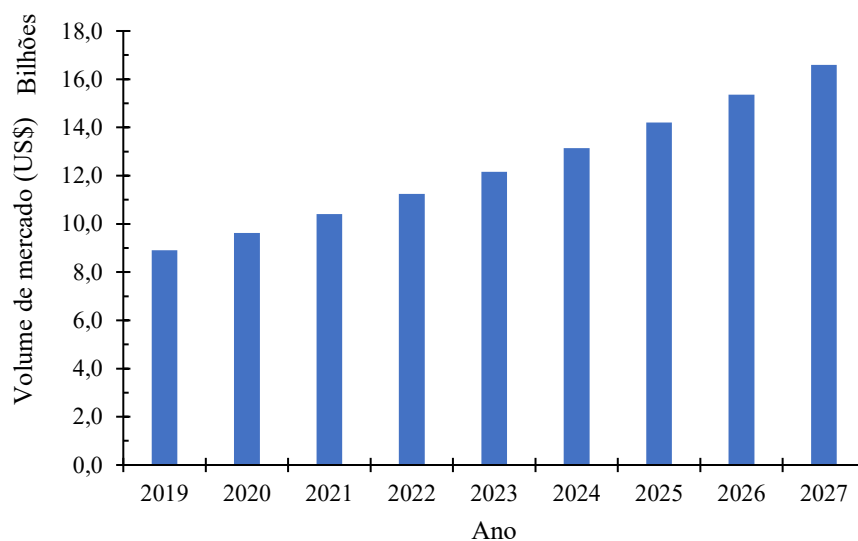
Outra aplicação muito interessante do ácido hialurônico que tem ganhado destaque é o de viscosuplementação em pacientes que sofrem com artrite e artrose. Neste caso, também por conta de suas propriedades viscoelásticas, o AH mitiga a degradação da cartilagem das articulações e normaliza as propriedades, conseguindo reduzir o desconforto do paciente (ASARI, 2004).

Outro campo de aplicação do ácido hialurônico é a substituição do grupo carboxila e hidroxila, o que irá conferir ao biopolímero novas propriedades (SHU; PRESTWICH, 2004). Um ramo da Ciência que é baseado nestas modificações químicas é a Engenharia de Tecido, em especial na formulação de *scaffolds* de ácido hialurônico modificados. Estas estruturas são utilizadas para o crescimento de células animais, como condrócitos (células presentes em tecidos cartilagosos), queratinócitos (células diferenciadas de tecido epitelial) e fibroblastos (células do tecido conjuntivo). No primeiro caso, as células produzem agrecanas e colágeno tipo I, permitindo que todo *scaffold* possa ser utilizado para reparar defeitos em cartilagens. Já nos segundo e terceiro casos, se as células forem cultivadas juntas, é possível formar um equivalente à pele (ASARI, 2004).

2.3 MERCADO

O volume do mercado mundial do ácido hialurônico tem se destacado nos últimos anos. Em 2019, ele foi avaliado no valor de US\$ 8,9 bilhões, projetando-se para atingir o valor de US\$ 16,6 bilhões em 2027, conforme mostra a Figura 2.3 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

Figura 2.3. Projeção do volume de mercado mundial do ácido hialurônico de 2019 a 2027.



Fonte: Grand View Research (2020).

O preço de venda do ácido hialurônico depende de sua pureza e massa molar. Por exemplo, em 2020 na China, o preço de exportação desse biopolímero com grau farmacêutico variou entre 2700 e 50000 \$ kg⁻¹ (CIRIMINNA; SCURRIA; PAGLIARO, 2021). De fato, conforme maior a massa molar, maior é o preço de venda. Acredita-se que tal ocorrência relaciona-se com o fato da alta massa molar ainda ser desafiante e possuir maior custo de produção (FERREIRA et al., 2021).

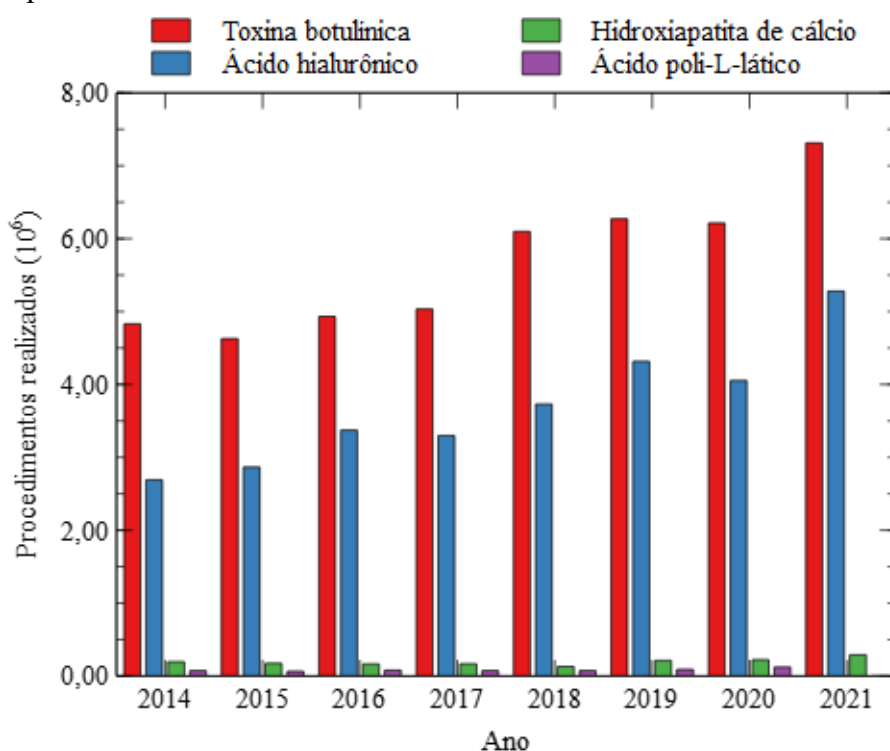
Além disso, a produção industrial de ácido hialurônico pode ser altamente lucrativa: uma fábrica em Jinan, na China, obteve uma taxa de lucro de 34% em 2018, valor este considerado comum para empresas que estão neste mercado hoje (CIRIMINNA; SCURRIA; PAGLIARO, 2021).

2.3.1 Preenchimento cutâneo

A busca por intervenções médicas de cunho cosmético tem se destacado nos últimos anos: estima-se que, em 2018, este mercado movimentou mais de 8 bilhões de dólares nos Estados Unidos e que foram realizadas mais de 22 milhões de procedimentos deste tipo no mundo todo. De modo geral, nos últimos anos, a maioria dos procedimentos realizados são os não-cirúrgicos, provavelmente por conta de serem considerados mais seguros e possuírem menor tempo de recuperação (AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2019; INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2015, 2016, 2017, 2018; SARWER, 2019).

Dentre os procedimentos não-cirúrgicos, os mais realizados são o que utilizam substâncias injetáveis, como a toxina botulínica (Botox[®], Dysport[®] e Xeomin[®]), ácido hialurônico (Juvederm Ultra[®], Ultra Plus[®], Voluma[®], Restylane[®], entre outros), hidroxiapatita de cálcio (Radiesse[®]) e ácido poli-L-lático (Sculptra[®]) (INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019). Na Figura 2.4 encontra-se a quantidade de procedimentos cosméticos com substâncias injetáveis realizados no mundo entre 2018 e 2014.

Figura 2.4. Quantidade de procedimentos com toxina botulínica, ácido hialurônico, hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-L-lático realizados no mundo entre 2021 e 2014 por cirurgiões plásticos.



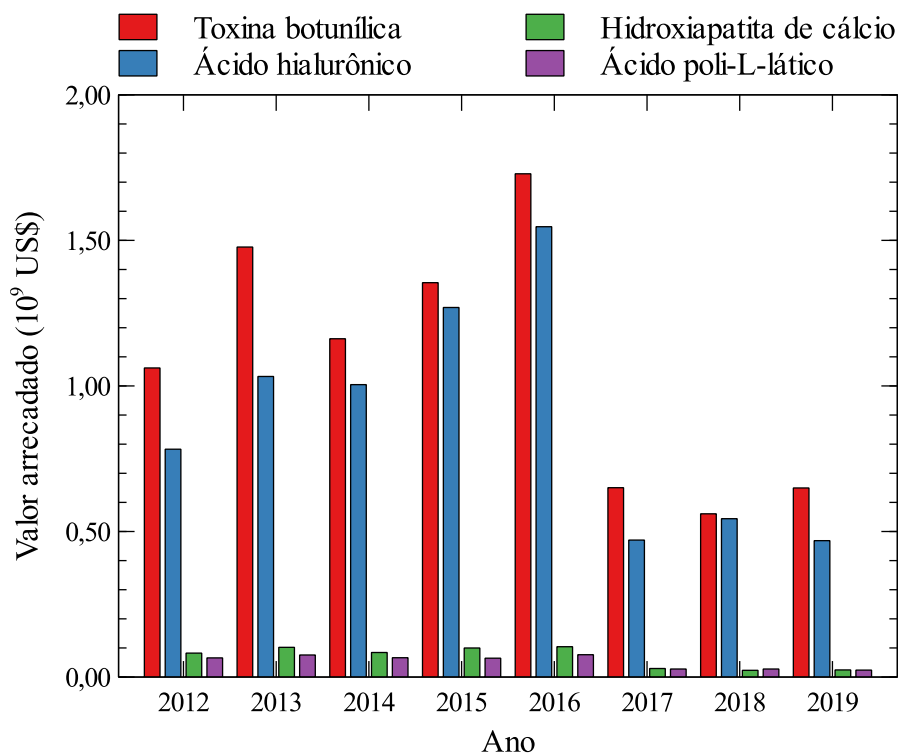
Fontes: International Society of Aesthetic Plastic Surgery (2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022)

Numa primeira análise da Figura 2.4, nota-se que os produtos com toxina botulínica foram a maioria no período analisado, seguidos pelos de ácido hialurônico, enquanto os procedimentos com hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-L-lático combinados representam menos de 4%. Uma tendência que pode ser observada é que o uso de toxina botulínica e ácido hialurônico tem aumentado com o tempo, indicando que eles têm se tornado cada vez mais populares.

Apesar do uso da toxina botulínica ser maior que o do ácido hialurônico (chegando a ser quase o dobro em 2018), um fator que deve ser levado em consideração é o valor pago por estes procedimentos. Apesar de não ter sido encontrado dados do valor

médio da aplicação de cada um destes produtos, foram encontrados dados dos valores praticados nos Estados Unidos, que é o país que mais realiza intervenções médicas de cunho cosmético, mostrados na Figura 2.5 a seguir.

Figura 2.5. Valor arrecadado com procedimentos estéticos não-cirúrgicos com injeção de toxina botulínica, ácido hialurônico, hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-L-lático nos Estados Unidos entre 2012 e 2019.



Fontes: American Society for Aesthetic Plastic Surgery (2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020)

De fato, a Figura 2.5 mostra que arrecadação de ácido hialurônico ao longo dos anos tem se aproximado da arrecadação de toxina botulínica, inclusive, ficando, aproximadamente, igual no ano de 2018. Nota-se que entre 2016 e 2017, houve uma mudança significativa na tendência dos dados. É possível que esta mudança seja resultado de uma alteração na metodologia utilizada para coleta dos dados de 2017 (diminuição da amostra).

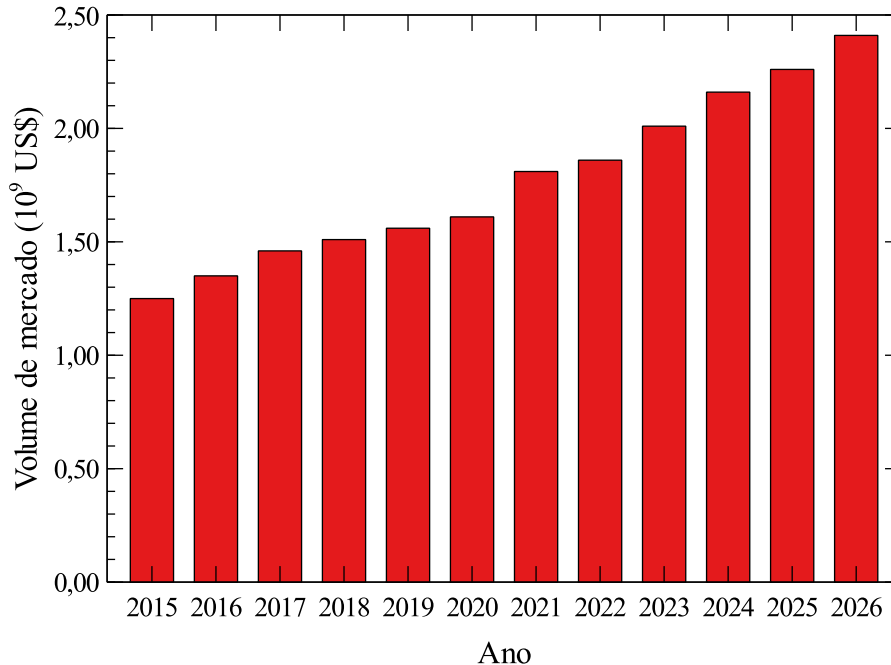
É preciso destacar que os usos de cada um desses produtos são diferentes por conta do seu mecanismo de atuação. A toxina botulínica atua causando paralisia flácida (ou seja, redução do tônus muscular), de forma que ele é indicado para tratamento de marcas de expressão ao redor dos olhos (i.e., “pés-de-galinha”), rugas na testa, ao redor dos lábios e no queixo, desde que sejam mediadas por músculos faciais, e remodelamento da feição do rosto, escolhendo cuidadosamente quais músculos serão usados. Por outro lado, o ácido hialurônico atua preenchendo espaços no local de atuação, portanto, é usado

para remodelar os lábios, pálpebras, rugas superficiais, bochechas e têmporas (ALAM; TUNG, 2018).

Outro fator que também deve ser levado em consideração é a necessidade de reaplicação de cada um deles. Estima-se que uma injeção de ácido hialurônico mantenha seus efeitos de 6 meses até mais de 1 ano, dependendo do paciente e do próprio produto (ALAM; TUNG, 2018). Já a toxina botulínica só consegue manter os resultados por 3 a 4 meses após a injeção, dependendo do histórico do paciente (ERICKSON et al., 2015), apesar de alguns autores citarem que pode durar de 4 a 6 meses (AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2019).

O mercado norte americano do ácido hialurônico em procedimentos estéticos não-cirúrgicos é um dos maiores do mundo. Na Figura 2.6 encontra-se uma projeção do seu volume de mercado entre 2015 e 2026. Nota-se que, em 2026, é esperado que ele atinja a marca de US\$ 2,5 bilhões, o equivalente a aproximadamente o dobro do seu valor em 2015. Além disso, esta mesma projeção também estima que a sua taxa de crescimento composta anual será de quase 6,1% (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

Figura 2.6. Projeção do volume do mercado dos Estados Unidos de ácido hialurônico como preenchimento facial estético.



Fonte: Grand View Research (2020).

2.3.2 Viscosuplementação

Num planeta em que a expectativa de vida tem aumentado (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2017), doenças que atingem a parcela da população com mais

de 60 anos tem se tornado cada vez mais relevantes. Este é o caso da osteoartrite, uma doença degenerativa caracterizada pela perda da cartilagem sinovial nas articulações, levando a dores, inflamações em diferentes níveis e maior sensibilidade nas mesmas, além de limitação na movimentação do paciente (WOOLF; PFLEGER, 2003).

A osteoartrite também possui um fardo econômico muito alto. Estima-se que seus custos indiretos (dias de trabalho perdidos, diminuição na produtividade, morte prematura e pagamentos e/ou benefícios por deficiência) variaram entre US\$ 3,41 a US\$ 13,23 bilhões em 2001 nos Estados Unidos (atualizando estes valores pela inflação norte-americana neste período, eles atingem o patamar de US\$ 5,02 e US\$ 19,49 bilhões, respectivamente). Estes dados se equiparam com os de outras doenças ocupacionais, como câncer, doenças circulatórias e doença pulmonar obstrutiva crônica (LEIGH; SEAVEY; LEISTIKOW, 2001).

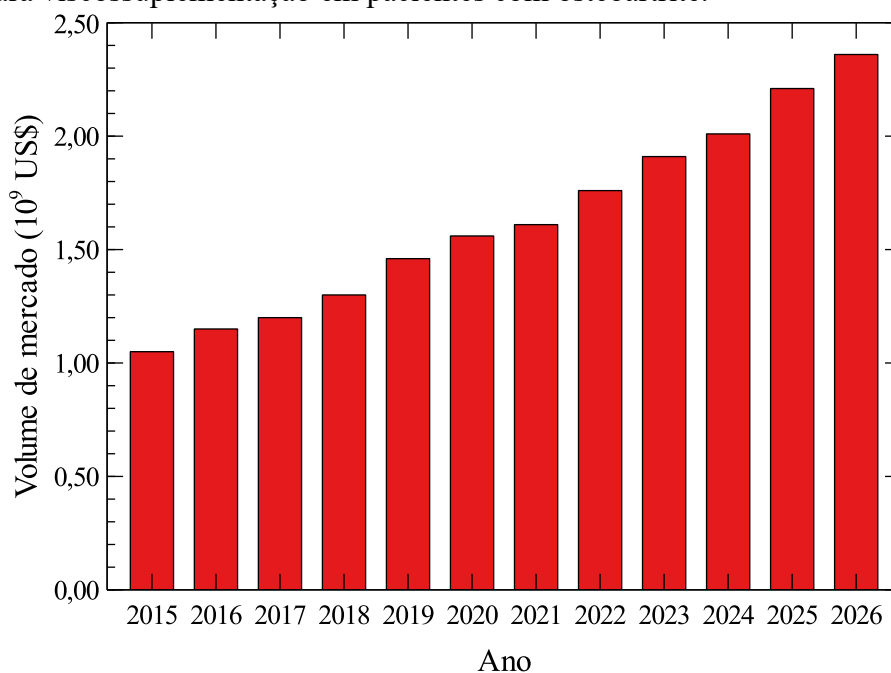
Dessa forma, a busca por tratamentos desta enfermidade tem movimentado o meio acadêmico. Atualmente, eles atuam na mitigação da dor que o paciente sente, sendo que só é recomendada a intervenção cirúrgica em casos extremos, portanto, a maior parte do tratamento é feito por meio de mudanças no estilo de vida ou por uso de medicamentos (BIJLSMA; BERENBAUM; LAFEBER, 2011; CARR et al., 2012).

Tradicionalmente, utilizam-se analgésicos e anti-inflamatórios (YUSUF, 2016), porém a comunidade médica tem desencorajado o uso dos mesmos para casos de dores crônicas, em especial os que utilizam opioides (BUSSE et al., 2017). Neste contexto, o uso do ácido hialurônico de alta massa molar tem se destacado cada vez mais (YUSUF, 2016).

O ácido hialurônico de alta massa molar, por meio de injeções periódicas, consegue melhorar a viscoelasticidade do fluido sinovial presente nas articulações, de modo que a fricção gerada pelos movimentos é significativamente reduzida (YUSUF, 2016). De fato, quando comparado com alternativas de injeções intra-articulares tradicionais, ele foi o único que conseguiu efetivamente reduzir a dor e melhorar a movimentação dos pacientes (PHILLIPS et al., 2020).

Tal como o volume de mercado do ácido hialurônico como preenchimento em procedimentos estéticos, também é esperado que o volume de mercado para viscosuplementação aumente consideravelmente até 2026, conforme mostra a Figura 2.7. De fato, é esperado que em 2026 ambas as aplicações possuam volumes de mercado muito próximos.

Figura 2.7. Projeção do volume do mercado dos Estados Unidos de ácido hialurônico usado para viscosuplementação em pacientes com osteoartrite.



Fonte: Grand View Research (2020).

Analisando a projeção da Figura 2.7, percebe-se que a taxa de crescimento composta anual será de, aproximadamente, 7,6%. O valor desta taxa é provavelmente suportado por todos os fatos já explicitados anteriormente: o uso do ácido hialurônico de alta massa molar tem sido cada vez mais encorajado por médicos para tratar osteoartrite, que é uma doença cuja incidência é maior para a população com mais de 60 anos e que tende a aumentar com o passar dos anos.

2.4 PRODUÇÃO

Quando foi notado que as propriedades do ácido hialurônico o tornavam um material de interesse, iniciou-se a busca por formas de produzi-lo em escala industrial. Hoje, existem três formas de se produzir o ácido hialurônico: por meio de extração de tecidos animais, por cultivos submersos com bactérias produtoras de AH e por meio de conversões enzimáticas (BOERIU et al., 2013).

Apesar de, inicialmente, a produção do AH ser feita por meio da extração de tecidos animais, como os demais glicosaminoglicanos (GAG), as desvantagens relacionadas a este processo motivaram pesquisas em busca de tecnologias mais promissoras, que resultaram na sua produção por meio de cultivos de bactérias que produzem naturalmente ácido hialurônico. Atualmente, a maior parte do ácido

hialurônico produzido é feito usando esta rota microbiana, sendo considerado o único GAG produzido por esta rota (DEANGELIS, 2012).

Estima-se que a produção global seja superior a 600 t ano⁻¹, sendo que a China é o país responsável pela maior parte de sua produção. De fato, a China se tornou um grande expoente no comércio deste biopolímero, indo de 125 t em 2013 para 308 t em 2017, um aumento de aproximadamente 2,5 vezes em 4 anos (CIRIMINNA; SCURRIA; PAGLIARO, 2021).

2.4.1 Produção animal

Por ser encontrado em alta concentração em cristas de galo, a extração do ácido hialurônico foi vista como uma boa estratégia de produção industrial, sendo desenvolvido em um processo de cinco etapas, as quais consistiam na preparação da crista, extração do AH, remoção de proteínas e ácidos nucleicos, eliminação de agentes inflamatórios e preparação para embalagem (BALAZS, 1979).

Neste processamento, o ácido hialurônico obtido possui alta massa molar (1,59 MDa) e baixo teor proteico (0,4%), caracterizando-se, a princípio, como ideal para finalidades médicas, entretanto, conforme os padrões atuais, tal processo passa a ser inviável, haja vista a necessidade de novas etapas *downstream* para se reduzir a concentração de proteínas, com objetivo de atingir a recomendação atual, que é não ser maior que 0,3% (EDQM, 2004). Tal procedimento, conseqüentemente, aumenta os custos do processo.

Houve tentativas de se obter ácido hialurônico a partir de outras fontes como o humor vítreo de atum (*Thunnus obesus*), porém o procedimento necessário para a remoção do tecido dos olhos do animal torna o aumento de escala praticamente inviável, além de possuir baixo rendimento (10,5 mg/unidade) (AMAGAI; TASHIRO; OGAWA, 2009).

Com o passar dos anos, novos problemas com a obtenção do ácido hialurônico foram encontrados, como a dificuldade de se obter matéria-prima de qualidade (por exemplo, no caso do uso da crista de galo, o animal deve ser morto por exsanguinação), o crescente debate a respeito do uso de materiais alimentícios para obtenção de materiais não-alimentícios, a presença de antígenos do animal de origem que podem iniciar um processo alérgico, os custos energéticos e ambientais relacionados a pecuária de alta escala e a pressão política feita por órgãos de regulamentação, como ANVISA e FDA, para o uso de substâncias que não sejam de origem animal (BALAZS, 1979; DEANGELIS, 2012).

2.4.2 Produção microbiana

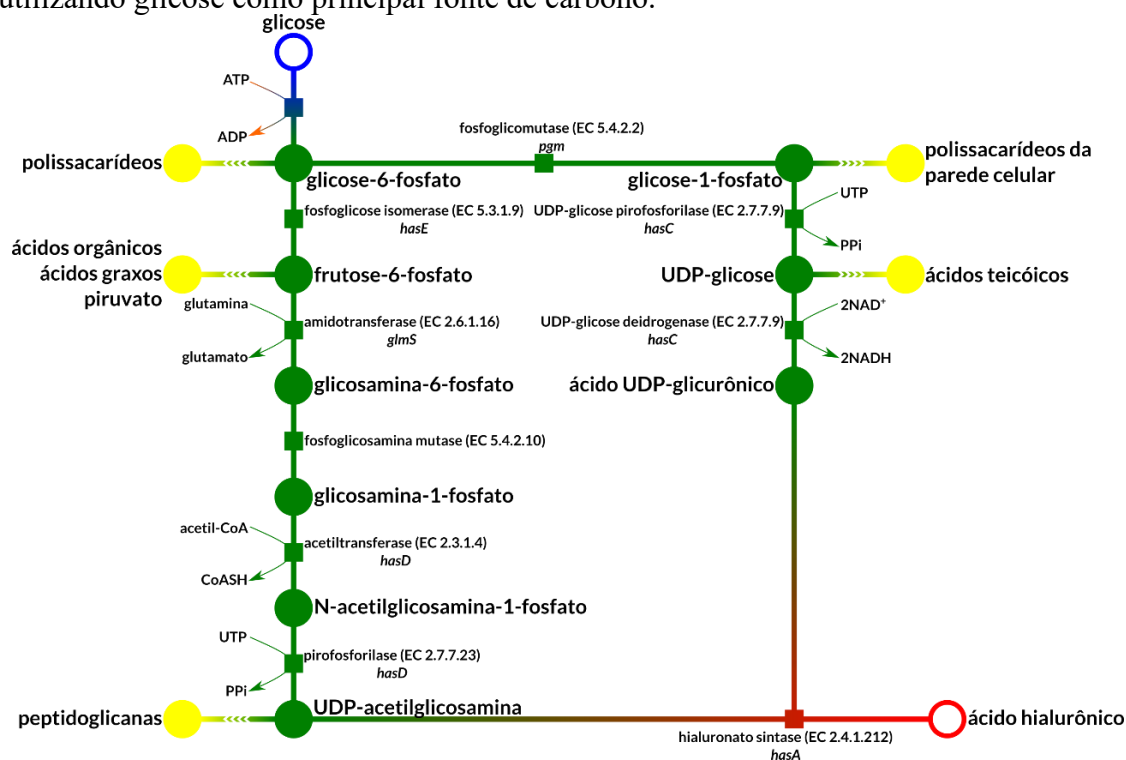
2.4.2.1 Microrganismos

Tal como alguns animais, espécies de microrganismos, em sua maioria, bactérias, também conseguem produzir ácido hialurônico. Inclusive, o AH microbiano possui as mesmas propriedades e estrutura que o de origem animal, porém o produto contém menos proteínas, ácidos nucleicos e endotoxinas (SHIEDLIN et al., 2004).

Para que o ácido hialurônico possa ser sintetizado, é necessária a presença da enzima hialuronato sintase e as vias de produção de seus precursores (N-acetilglicosamina e ácido UDP-glicurônico). Bactérias como *Streptococcus pyogenes*, *S. equi* subesp. *zooepidemicus*, *S. equisimilis*, *S. thermophilus* (IZAWA et al., 2009) e *Pastereulla multocida* (DEANGELIS, 1999) já possuem, naturalmente, este aparato celular. Para estes microrganismos, o AH é considerado um fator de virulência, já que ele os protege contra o sistema imune de hospedeiros (WESSELS et al., 1991). No entanto, deve-se destacar que apenas o ácido hialurônico não é capaz de estimular respostas imunológicas (QUINN; SINGH, 1957).

Dentro os microrganismos capazes de produzir ácido hialurônico, o mais utilizado é o *S. zooepidemicus*, uma bactéria lática gram-positiva. A biossíntese deste polímero nestes microrganismos depende da formação de UDP-acetilglicosamina e ácido UDP-glicurônico, que são produzidos a partir de frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, respectivamente (Figura 2.8). No entanto, estes compostos são responsáveis pela produção de diversos outros produtos, como ácidos orgânicos, polissacarídeos e ácidos graxos, ou seja, o AH compete pelo fluxo de carbono com estes compostos (CHONG et al., 2005).

Figura 2.8. Via de biossíntese do ácido hialurônico em *Streptococcus zooepidemicus*, utilizando glicose como principal fonte de carbono.



Fonte: Adaptado de Liu et al. (2011).

Além desta competição pelo carbono, a produção de ácido hialurônico também consome muita energia da célula de *S. zooepidemicus*: para formar 1 mol do monômero, gasta-se 8 mol de ATP, enquanto apenas se regenera 2 mol de NADH (CHONG et al., 2005). Esta alta demanda de ATP aliada a baixa regeneração de NADH compromete o balanço energético da célula, ainda mais de um microrganismo que não possui diversas reações do ciclo do ácido cítrico – uma rota metabólica responsável por gerar energia em organismos aeróbicos (CASPI et al., 2014).

Na via de biossíntese do ácido hialurônico nota-se a necessidade do consumo de glutamina para conversão de frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato (Figura 2.8). De fato, a adição de glutamina ao meio de cultivo favoreceu a produção de ácido hialurônico em 65% (experimento controle obteve 2 g L⁻¹), porém houve redução da massa molar final em 20,8% (experimento controle atingiu 2,4 MDa) (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013).

Esta estratégia de aumentar a disponibilidade de glutamina possivelmente gerou um desequilíbrio nas concentrações intracelulares dos precursores do ácido hialurônico: aumentou a produção de UDP-acetilglicosamina, mantendo a produção de ácido UDP-glicurônico constante. Acredita-se que a massa molar do ácido hialurônico microbiano se

relaciona com uma proporção ótima de ambos os precursores, apesar de tal proporção ainda não ser conhecida (CHEN et al., 2014).

Além da glutamina, outro componente que é consumido durante formações dos precursores é o trifosfato de uridina (Figura 2.8), que é parcialmente composto por uracila – uma base nitrogenada. De fato, adicionar uracila ao meio de cultivo tem efeitos significativos e positivos no crescimento de *S. zooepidemicus* e em sua produção, enquanto o mesmo não é possível afirmar para adenina, guanina, citosina e timina. Em concentração e tempo de adição ótimos, é possível atingir $6,32 \text{ g L}^{-1}$ de ácido hialurônico, representando um aumento de 21% em relação ao experimento controle sem adição de uracila (LIU et al, 2009a).

Outro ponto a se considerar a respeito do *S. zooepidemicus* são suas necessidades nutricionais: estima-se que esta bactéria não consiga produzir 11 dos 20 aminoácidos essenciais (HARTH, 2018). Esta ocorrência impacta na seleção de fontes de nitrogênio, que devem conter estes aminoácidos em quantidades suficientes para manter o crescimento celular. Estes aminoácidos podem estar tanto na forma livre ou polipeptídeos, uma vez que *S. zooepidemicus* produz proteases (KITANG et al., 2017).

Sabe-se que o AH microbiano não atinge os mesmos níveis de massa molar que o AH animal, ainda que as enzimas sejam semelhantes (CHEN et al., 2009b; WEIGEL, 2004).

Acredita-se que um dos fatores que controla a massa molar seja o nível intracelular de UDP-acetilglicosamina, que é menor que o de ácido UDP-glicurônico (CHEN et al., 2009b). Superexpressando-se diferentes genes responsáveis por reações da via de biossíntese do AH, chegou-se à conclusão de que as etapas limitantes são: as conversões de frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato e de N-acetilglicosamina-6-fosfato em UDP-acetilglicosamina (CHEN et al., 2014).

No entanto, por meio de técnicas de Biologia Molecular, outros microrganismos já são capazes de produzir ácido hialurônico. De modo geral, para a produção heteróloga de AH selecionam-se microrganismos GRAS (do inglês “*generally recognized as safe*”), uma designação dada pelo FDA (do inglês, “*Food and Drug Administration*”) ou por especialistas a produtos ou microrganismos com histórico de uso seguro para serem usados na indústria alimentícia, como *Kluyveromyces lactis* (GOMES et al., 2019), *Lactococcus lactis* (BADRI; RAMAN; JAYARAMAN, 2019; JEEVA et al., 2019; PRASAD; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2010; PUVENDRAN; JAYARAMAN, 2019), *Corynebacterium glutamicum* (CHENG et al., 2016, 2017) e

Bacillus subtilis (WESTBROOK et al., 2018). No entanto, outros microrganismos podem ser usados, como *Pichia pastoris* (JEONG; SHIM; KIM, 2014), *Streptomyces albulus* (YOSHIMURA et al., 2015) e *Escherichia coli* (MAO; SHIN; CHEN, 2009).

A produção de AH com alta massa molar e alta produtividade em microrganismos recombinante é tão árdua quanto naqueles que naturalmente o produzem, conforme está evidenciado nas Tabela 2.1 e Tabela 2.2.

Tabela 2.1. Compilação de microrganismos utilizados para a produção heteróloga de ácido hialurônico com os microrganismos de origem da hialuronato sintase, modo de operação empregado, concentração, massa molar e produtividade volumétrica de AH.

Microrganismo	Origem da hialuronato sintase	Modo de operação	C _{AH} (g L ⁻¹)	MM (MDa)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fonte
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>P. multocida</i>	Batelada	1,9 ± 0,2	2,09 ± 0,01	-*	Gomes et al. (2019)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9020	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada com pulsos de acetato (5 g L ⁻¹) e glicose	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	0,072	Puvendran; Jayaraman (2019)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada	0,97	-*	0,044	Badri; Raman; Jayaraman (2019)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>S. zooepidemicus</i>	Glicostato	1,3	1,4	0,065	Jeeva et al. (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> 1A751	<i>S. equisimilis</i>	Batelada	4,46	1,71	0,45	Westbrook et al. (2018)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	<i>S. equisimilis</i>	Batelada alimentada	21,6 ± 0,5	0,49	0,50 ± 0,02	Cheng et al. (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada alimentada	19,38	0,0066	0,20	Jin et al. (2016)
<i>Streptomyces albulus</i> CRM003	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada com pulsos de glicose	3,2	> 3,0	0,041	Yoshimura et al. (2015)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada	8,3 ± 0,4	0,77	0,24 ± 0,01	Cheng et al. (2016)
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>Xenopus laevis</i>	Batelada com pulso de glicose	1,70 ± 0,01	1,20 ± 0,01	0,094	Jeong; Shim; Kim (2014)
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>Xenopus laevis</i>	Batelada com pulso de glicose	0,76 ± 0,03	2,50 ± 0,02	0,016	Jeong; Shim; Kim (2014)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9020	<i>S. zooepidemicus</i>	Batelada	1,8	2,8	0,075	Prasad; Jayaraman; Ramachandran (2010)
<i>Escherichia coli</i> K5	<i>P. multocida</i>	Batelada com pulso	3,64	-*	0,121	Mao; Shin; Chen (2009)

* Dado não informado pelos autores

Tabela 2.2. Compilação das fontes de carbono e nitrogênio, modo de operação do biorreator, concentração, massa molar e produtividades de trabalhos que produziam ácido hialurônico usando microrganismos que o produzem naturalmente.

(continua)

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Modo de operação	C_{AH} (g L ⁻¹)	MM (MDa)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fonte
<i>S. zooepidemicus</i> MTCC 3523	Glicose (30 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (10 g L ⁻¹)	Batelada	2,40 ± 0,06	1,44	0,18	Mohan et al. (2020)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Sacarose (50 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (50 g L ⁻¹), glutamina (0,6 g L ⁻¹) e glutamato (0,6 g L ⁻¹)	Batelada	0,86	- ^a	0,04	Pan et al. (2019)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Triptona (15 g L ⁻¹), extrato de levedura (5 g L ⁻¹) e nanopartículas de Fe ₂ O ₃ recobertas com glutamato (20 mg L ⁻¹)	Batelada	0,435 ± 0,004	1,48	0,04	Attia; Kobeasy; Samer (2018)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Triptona (15 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	3,60	3	0,26	Amado et al. (2017)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Suco de caju (92 g L ⁻¹) ^b	Extrato de levedura (60 g L ⁻¹)	Batelada	1,76 ± 0,01	- ^a	0,18	Oliveira et al. (2013)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glicose (50 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (10 g L ⁻¹) e triptona (10 g L ⁻¹)	Batelada	2,44	4,36	0,20	Lai et al. (2011)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glicose (5 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (2,5 g L ⁻¹)	Batelada alimentada exponencial	3,28	- ^a	0,60	Liu et al. (2009b)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glicose (20 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (10 g L ⁻¹)	Batelada enche-e-esvazia	1,54	- ^a	0,06	Chen et al. (2009a)

Tabela 2.3. Compilação das fontes de carbono e nitrogênio, modo de operação do biorreator, concentração, massa molar e produtividades de trabalhos que produziam ácido hialurônico usando microrganismos que o produzem naturalmente.

							(conclusão)
Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Modo de operação	C _{AH} (g L ⁻¹)	MM (MDa)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fonte
<i>S. sp</i> KL0188	Glicose (75 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (24 g L ⁻¹) e peptona de soja (3 g L ⁻¹)	Batelada	5,30	- ^a	0,41	Lee et al. (2009)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Glicose (20 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (10 g L ⁻¹), triptona (1,7 g L ⁻¹) e peptona de soja (0,3 g L ⁻¹)	Batelada repetida	- ^a	- ^a	0,59	Huang; Chen; Chen (2008)
<i>S. zooepidemicus</i> WSH-24	Sacarose Inicial 10 g L ⁻¹ Alimentação 600 g L ⁻¹ ₁	Extrato de levedura (20 g L ⁻¹)	Batelada alimentada exponencial seguida por batelada	6,80	- ^a	0,34	Liu et al. (2008a)
<i>S. zooepidemicus</i> WSH-24	Sacarose (70 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (25 g L ⁻¹)	Batelada com pulsos de sacarose	5,01	- ^a	0,25	Liu et al. (2008b)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Sacarose (50 g L ⁻¹)	Hidrolisado de caseína (10 g L ⁻¹) e extrato de levedura (3,5 g L ⁻¹)	Batelada	5,08	3,7 ± 0,3	0,18	Rangaswamy e Jain (2008)
<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 35246	Glicose (15 g L ⁻¹)	Extrato de levedura (10 g L ⁻¹)	Quimiostato	0,35 ± 0,09	- ^a	- ^a	Blank; Mclaughlin; Nielsen (2005)

^a Dado não informado pelos autores

^b Concentração de açúcares redutores

Considerando a produtividade e massa molar final, os melhores resultados de produção de AH recombinante foram os de Westbrook et al. (2018) (Tabela 2.1). Porém, para obtê-los, foi preciso usar n-hexadecano para aumentar a solubilidade do oxigênio no meio. Como esta substância é levemente tóxica por via intravenosa e causa irritações severas na pele humana (LEWIS, 2012), uma etapa adicional, provavelmente envolvendo algum solvente orgânico (LIDE, 2005), deverá ser incluída ao processo de purificação, com o objetivo de removê-lo do produto, podendo aumentar os custos do processo.

Para a produção homóloga, usando o mesmo critério, destacam-se os trabalhos de Lai et al. (2011) e Rangaswamy e Jain (2008) (Tabela 2.2). Destaca-se que ambos os trabalhos atingiram nem metade da produtividade atingida por Westbrook et al. (2018), porém a massa molar atingida foi quase duas vezes maior. Ou seja, diante do que foi reportado até então, a produção homóloga traz menores produções que a recombinantes, porém consegue produzir AH de maior valor agregado.

2.4.2.2 Meio de cultivo

O desenvolvimento ou conhecimento de um bom meio de cultivo para microrganismos é uma etapa essencial para desenvolver um bioprocessamento com alto rendimento e produtividade. De modo geral, a composição do meio compreende fontes de carbono (como glicose, xilose, sacarose, glicerol) e de nitrogênio (como peptonas, extrato de levedura, sais de amônia, aminoácidos). A presença de outras substâncias como sódio, potássio e vitaminas é importante (SCHMIDELL, 2008).

2.4.2.2.1 Fonte de carbono

A escolha de uma fonte de carbono é essencial para o crescimento e a produção de AH. Considerando apenas os microrganismos que naturalmente produzem o biopolímero, a fonte de carbono mais utilizada é a glicose (Tabela 2.2). O uso deste substrato deve ser feito com cautela: em excesso, a glicose pode inibir o crescimento celular e a produção de ácido hialurônico, porém em quantidades insuficientes, ela pode limitar o cultivo e mudar o metabolismo da célula, levando à produção de outros compostos, como ácido fórmico e etanol (PIRES; SANTANA, 2010). Diante disto, a faixa ótima para a concentração desta fonte de carbono para cultivos em batelada, é de 30 a 50 g L⁻¹, pois os efeitos inibitórios não são tão severos e evita-se a formação de subprodutos indesejados (DON; SHOPARWE, 2010; PIRES; SANTANA, 2010).

Outro ponto a ser considerado é o impacto que a concentração de glicose tem na massa molar do produto. Pires e Santana (2010) mostraram que a massa molar final tende a aumentar conforme a concentração inicial de glicose aumenta. Don e Shoparwe (2010) também fizeram um estudo semelhante avaliando uma faixa maior de concentração inicial e observaram o mesmo efeito até 40 g L^{-1} , após este valor a massa molar diminui.

Este fenômeno pode estar relacionado com a concentração intracelular dos precursores: conforme se aumenta a disponibilidade de glicose, a produção de UDP-acetilglicosamina e ácido UDP-glicurônico também aumenta. No entanto, quando a concentração de ambos se torna muito alta, o fluxo de carbono passa a ir na direção de outros compostos, como peptidoglicanos, gerando um novo desbalanço de tais metabólitos (CHEN et al., 2014).

Além disso, acredita-se que a concentração instantânea da glicose também pode afetar a massa molar. Através de cultivos em batelada de *L. lactis* recombinante com concentração constante de glicose (glicostato) foi possível controlar a massa molar do ácido hialurônico, de forma que ela permaneceu constante durante todo cultivo, ao mesmo tempo em que se observa o acúmulo de AH (JEEVA et al., 2019). Uma estratégia semelhante, porém, mais rudimentar, já foi reportada por Nimrod et al. (1986) com *S. zooepidemicus* ATCC 39920 obtendo-se AH com massa molar maior que 3,5 MDa.

Alguns trabalhos utilizam a sacarose (LIU et al., 2008a, 2008b, 2009; LONG; ZHANG; MO, 2012; PAN et al., 2019; RANGASWAMY; JAIN, 2008) como fonte de carbono. O seu uso é uma opção muito interessante, pois, após ser assimilado, ele é hidrolisado formando glicose-6-fosfato e frutose, que é convertida a frutose-6-fosfato, podendo fortalecer a produção de UDP-acetilglicosamina e, conseqüentemente, aumentar a massa molar e produção de ácido hialurônico (ZHANG et al., 2016).

Uma outra fonte de carbono utilizada com sucesso é a maltose, que consegue produzir ácido hialurônico com mais eficiência que a glicose, sem alterações muito significativas na massa molar. Acredita-se que a maltose seja mais eficiente por conseguir aumentar o fluxo de ATP (CHONG; NIELSEN, 2003a). Já foi estudada a possibilidade do uso de lactose, no entanto a sua velocidade de assimilação é muito baixa, quando ela é de fato assimilada, e produz ácido láctico em altas concentrações, que é um notório inibidor para o *S. zooepidemicus* (AMADO et al., 2016).

2.4.2.2.2 Fonte de nitrogênio

De modo geral, para a produção de ácido hialurônico, é mais comum utilizar fontes de nitrogênio complexas, como extratos de leveduras, peptonas e triptonas (Tabela 2.2), por apresentarem melhores resultados (IM et al., 2009). Apesar de também serem usados meios definidos, eles são mais encontrados em estudos que buscam elucidar o metabolismo de *S. zooepidemicus* (BLANK; MCLAUGHLIN; NIELSEN, 2005; CHEN et al., 2009b, 2014; CHONG; NIELSEN, 2003a).

Estas fontes de nitrogênio usadas na produção de ácido hialurônico por cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* devem conter arginina, cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina, uma vez que estes aminoácidos são considerados essenciais para o seu crescimento (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997).

Um ponto importante a ser levado em consideração é a origem da fonte de nitrogênio. Tipicamente, os meios mais recomendados para cultivo de bactérias do gênero *Streptococcus* são TH (Todd-Hewitt), THY (Todd-Hewitt suplementado com extrato de levedura), TSB (do inglês, “tryptic soy broth”) e BHI (do inglês, “brain heart infusion”), no entanto, todos eles utilizam em sua composição algum produto de origem animal, como infusão de cérebro e coração ou triptonas, o que pode ser considerado incongruente, uma vez que a rota microbiana foi desenvolvida para evitar os problemas recorrentes do uso de produtos animais.

Portanto, neste contexto, buscou-se fontes de nitrogênio alternativas, como o extrato de levedura e peptonas de soja (BENEDINI; SANTANA, 2013; LEE et al., 2009). É importante destacar que um dos critérios de pureza do ácido hialurônico para fins médicos e/ou cosméticos é o conteúdo de ácidos nucleicos presentes no produto (EDQM, 2004). Logo, neste quesito a peptonas de soja pode ser mais interessante que o extrato de levedura.

A concentração da fonte de nitrogênio também é um fator importante a ser levado em consideração. Apesar de não terem sido encontrados estudos que reportem efeitos inibitórios relacionados a este componente, sabe-se que a razão carbono:nitrogênio é muito importante para a produção de ácido hialurônico. No entanto, o valor ótimo para esta razão é único para cada fonte de nitrogênio utilizada, uma vez que cada uma possui seu próprio teor de carboidratos, proteínas, polipeptídeos e aminoácidos

livres e totais (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010; LAI et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

Uma ideia muito promissora para aumentar a produção de AH é a suplementação do meio de cultivo com outras fontes de nitrogênio mais simples, como glutamina. Este aminoácido atua como um doador de grupo amino para a formação da glicosamina-6-fosfato (Figura 2.8) e adicioná-lo ao meio de cultivo pode aumentar a produção de ácido hialurônico (ATTIA; KOBEASY; SAMER, 2018; JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010; PAN et al., 2019).

2.4.2.2.3 Demais componentes

Conforme relatado, para manutenção do crescimento celular, a presença de outros compostos, como sais, pode favorecer o crescimento. Por isso, muitos meios possuem sais em suas composições.

Para o caso de cultivos de *S. zooepidemicus*, sabe-se que a presença de Na^+ diminui a formação de AH, provavelmente porque este íon pode atuar como inibidor para hialuronato sintase. Por outro lado, a sua presença pode aumentar a massa molar. Este mecanismo é interessante do ponto de vista industrial, uma vez que permite a flexibilização da produção de ácido hialurônico com muita facilidade. Outros íons também foram testados (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+}), porém não possuem efeitos significativos no crescimento celular, concentração e massa molar de AH (PIRES; EGUCHI; SANTANA, 2010).

Outro fator que deve ser considerado é a possibilidade de aumentar a produção de AH através da adição de outros componentes, como iodoacetato (que inibe a glicólise) e glutamina (que atua como doador de grupo amino para formação de N-acetilglicosamina-6-fosfato). O uso individual destas substâncias já apresenta resultados positivos, no entanto, ao combiná-los, pode-se potencializar a formação de ácido hialurônico de alta massa molar e mitigar a produção de lactato (Tabela 2.4) (SHAH; BADLE; RAMACHANDRAN, 2013).

Tabela 2.4. Efeitos do uso de inibidor da glicólise (iodoacetato) e promotor da produção de N-acetilglicosamina-6-fosfato (glutamina) na formação de biomassa e ácido hialurônico.

Estratégia	C_X (g L^{-1})	C_{lactato} (g L^{-1})	C_{AH} (g L^{-1})	MM (MDa)
Controle	2,6	18,6	2	2,4
Iodoacetato (25 μM)	2,6	10	3	2,7
Glutamina (5 g L^{-1})	3,4	11,8	3,3	1,9
Iodoacetato (25 μM) + Glutamina (5 g L^{-1})	3,5	6,0	5,0	3,0

Fonte: Shah; Badle; Ramachandran (2013)

Outra possibilidade é adicionar N-acetilglicosamina ao meio de cultivo para aumentar a fluxo da produção de UDP-acetilglicosamina. Usando proporções iguais de glicose e N-acetilglicosamina (10 g L⁻¹ cada) observou-se a assimilação simultânea dos açúcares e o aumento da concentração intracelular de UDP-acetilglicosamina, porém, não houve aumento expressivo no rendimento e na massa molar de AH. Provavelmente, o excesso de N-acetilglicosamina-6-fosfato foi convertido em frutose-6-fosfato, sendo redirecionado a via do carbono central e de produção de ácido UDP-glicurônico, pois houve um aumento na concentração deste metabólito (CHEN et al., 2014).

No entanto, é possível que a proporção e a concentração de glicose e N-acetilglicosamina não sejam as ideais: ao se utilizar 20 e 10 g L⁻¹, respectivamente, observou-se aumento de 19,8% na concentração de AH e de 62,6% na massa molar. Invertendo tal proporção, a massa molar dobra, enquanto a concentração de ácido hialurônico cai pela metade (MOHAN et al., 2020). Esta ocorrência mostra-se interessante para o meio industrial, pois através da manipulação da razão destes açúcares é possível flexibilizar a produção da fábrica de acordo com a necessidade. Deve-se destacar que os estudos de Chen et al. (2014) e Mohan et al. (2020) usaram diferentes meios (definido e complexo, respectivamente) e cepas de *S. zooepidemicus*.

2.4.2.2.4 *Uso de resíduos e subprodutos*

As políticas ambientais do mundo têm se tornado cada vez mais rígidas, exigindo que resíduos industriais sejam tratados antes do descarte. Uma alternativa interessante é valorizar tais materiais através do seu reaproveitamento em outros processos industriais, pois consegue-se reduzir os custos tanto do tratamento do resíduo como de matérias-primas.

Resíduos e subprodutos que possuem altas concentrações de carboidratos, aminoácidos e proteínas são ideais para serem utilizados em bioprocessos, podendo substituir fontes de carbono e nitrogênio. Neste contexto alguns autores têm buscado valorizar estes materiais utilizando-os em meios de cultivo de *S. zooepidemicus* para produção de ácido hialurônico (Tabela 2.5) (PIRES et al., 2010).

Os resultados mais promissores foram obtidos através da substituição de fontes de nitrogênio tradicionais, como triptona e peptona, por soro de queijo e água de maceração de milho. Usar estes subprodutos permite atingir bons níveis de produtividade (0,27 e 0,25 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente) e massa molar (3,71 e 3,80 MDa, respectivamente) (AMADO et al., 2016, 2017). A título de comparação, usando triptona (15 g L⁻¹), atingiu-se 0,26 g L⁻¹ h⁻¹ e 3,00 MDa para estes respectivos parâmetros (AMADO et al., 2016).

Tabela 2.5. Compilação com informações a respeito de fontes de carbono e de nitrogênio, modo de operação, concentração, massa molar e produtividade de ácido hialurônico microbiano produzido através de resíduos e subprodutos industriais.

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Modo de operação	C _{AH} (g L ⁻¹)	MM (MDa)	Pr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fonte
S. zooepidemicus ATCC 35246	Melaço (14%)	Peptona de lã de ovelha (12 g L ⁻¹)	Frasco agitado	3,54	- ^a	0,07	Arslan e Aydogan (2020)
S. zooepidemicus MTCC 3523	Jagra de palmeira palmyra (30 g L ⁻¹)	Peptona de soja (17,5 g L ⁻¹)	Batelada	1,19	0,66	0,07	Rohit et al. (2018)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Água de maceração de milho (10% v/v) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	3,48	3,8	0,25	Amado et al. (2017)
S. zooepidemicus ATCC 39920	Melaço de cana pré-tratado (85,35 g L ⁻¹) ^b	Extrato de levedura (50 g L ⁻¹)	Batelada	2,825	- ^a	0,12	Pan et al. (2017)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Proteínas de soro de queijo (5 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	3,77	3,71 ± 0,09	0,27	Amado et al. (2016)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Proteínas de soro de queijo hidrolisado (8,5 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	2,59	3,3 ± 0,2	0,19	Amado et al. (2016)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Proteína de vísceras não hidrolisadas de <i>Scyliorhinus canicula</i> (8 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada alimentada	2,50	> 2,11	0,14	Vázquez et al. (2015)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicogênio (50 g L ⁻¹) de água residuária de processamento de mexilhão	Proteínas de resíduos de vísceras de atum (8 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	2,52	2,2	0,18	Vázquez et al. (2010)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Proteínas de peptona de vísceras de tubarão (8 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	2,51	- ^a	0,18	Vázquez et al. (2009)
S. zooepidemicus ATCC 35246	Glicose (50 g L ⁻¹)	Proteínas de peptona de vísceras de arraia (8 g L ⁻¹) e extrato de levedura (5 g L ⁻¹)	Batelada	2,34	- ^a	0,17	Vázquez et al. (2010)

^a Dado não informado pelos autores

^b Concentração de açúcares totais

Um trabalho que deve ser destacado foi de Vázquez et al. (2010) que substituiu tanto a fonte de carbono (glicose por água residuária de processamento de mexilhão) como a de nitrogênio (triptona por resíduos de vísceras de atum) e obteve-se produtividade de $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e massa molar de 2,20 MDa. No entanto, é preciso lembrar que ambos os resíduos são de origem animal.

Outra possibilidade é o uso de resíduos em cultivos em estado sólido. Esta rota já é amplamente explorada para a produção de enzimas de interesse comercial. Para a produção de ácido hialurônico, cultivou-se *S. zooepidemicus* em biorreatores de leito fixo tipo colunas de Raimbault modificado recheado com bagaço de suco de caju suplementado com suco de caju e extrato de levedura, obtendo-se $6,6 \text{ mg}_{\text{AH}} \text{ g}_{\text{recheio}}^{-1}$ (DE MACEDO; SANTANA, 2012). No entanto, é possível que a produção de AH possa ser aumentada ao se usar outros tipos de biorreator de leito fixo, como um com sistema de aeração central (FERRARI et al., 2013).

2.4.2.3 Aeração e agitação

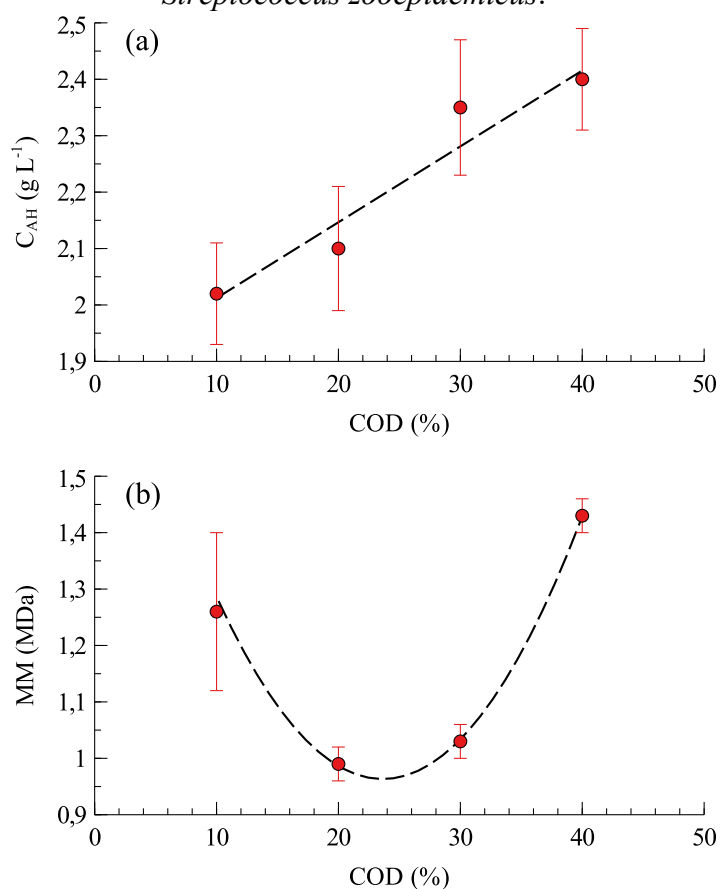
A aeração é um parâmetro muito importante para cultivo de microrganismos, quer seja em estado sólido ou submerso. Estudos mostram que apesar de não ser necessária para a manutenção do crescimento de *S. zooepidemicus* – um microrganismo anaeróbico facultativo –, a aeração pode aumentar a produção de AH e sua massa molar (ARMSTRONG; JOHNS, 1997). Este fenômeno relaciona-se com a alteração no balanço de NADH e NAD^+ promovido pela conversão de O_2 em H_2O realizada por meio da enzima NADH oxidase (CHONG; NIELSEN, 2003b).

Buscando melhorar os níveis de AH, desenvolveu-se uma estratégia em que se aumentava manualmente a agitação e a vazão de ar em biorreatores, conforme atingia-se concentrações celulares maiores (KIM; PARK; KIM, 2006). Este tipo de estratégia sugere que manter a concentração de oxigênio dissolvido (COD) constante, através de ferramentas de controle em biorreator, pode aumentar a produtividade destes cultivos.

De fato, posteriormente, foi mostrado que a produção de ácido hialurônico em cultivos de *S. zooepidemicus*, cuja vazão de ar foi mantida constante, foi 27% menor que em cultivos em que se manteve COD em 30% da saturação através da atuação de um controlador ($1,92$ e $2,45 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente) (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

No entanto, o *setpoint* utilizado para o controle de COD também pode influenciar a concentração final e a massa molar de AH, porém de maneiras diferentes. Enquanto se observa um comportamento aproximadamente linear entre a concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de ácido hialurônico (Figura 2.9a), para a massa molar nota-se um perfil parabólico com um mínimo entre 20 e 30% da saturação (Figura 2.9b) (MOHAN et al., 2020).

Figura 2.9. Comportamento da (a) concentração e (b) massa molar de ácido hialurônico em relação a concentração de oxigênio dissolvido (COD) em cultivos submersos de *Streptococcus zooepidemicus*.



Fonte: Mohan et al. (2020)

2.4.2.4 Temperatura

A maioria das reações que ocorrem em células são catalisadas por enzimas, proteínas com propriedades catalíticas. Portanto, tal como enzimas são afetadas pela temperatura, é natural imaginar que cultivos também sejam afetados.

A produção de ácido hialurônico em *S. zooepidemicus* apresenta boa robustez neste sentido, com poucas variações na sua concentração quando operados na faixa de 27 a 37 °C. No entanto, a massa molar diminui com o aumento da temperatura

(ARMSTRONG; JOHNS, 1997; JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010; LIU et al., 2018). É possível relacionar, mais uma vez, com a disponibilidade intracelular dos precursores do AH, pois foi verificado que, em temperaturas mais baixas, o fluxo metabólico da UDP-acetilglicosamina e ácido UDP-glicurônico é maior (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Por conta deste comportamento, algumas estratégias baseadas no controle da temperatura foram criadas buscando maximizar a produção de ácido hialurônico de alta massa molar. Uma delas é realizar ciclos periódicos com diferentes temperaturas, em que se alterna a temperatura do biorreator entre 37 e 30 °C durante uma hora. O grande interesse nesta estratégia é a possibilidade de se aumentar a concentração de AH, apesar de se reduzir muito pouco a massa molar, ao se comparar com os cultivos-controle (Tabela 2.6) (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Tabela 2.6. Comparação de diferentes estratégias de cultivo baseadas no controle de temperatura de biorreatores tipo tanque agitado.

Estratégia	C_{AH} (g L ⁻¹)	MM (MDa)	Fonte
Controle 37 °C	2,10	2,1	Jagannath e Ramachandran (2010)
Controle 30 °C	2,15	2,9	
Ciclo de temperatura	2,57	2,7	
Controle pH 8 a 31 °C	3,58	2,42	Liu et al. (2018)
Controle pH 7 a 37 °C	4,71	1,63	
Duas fases:			
1 – pH 8 a 31 °C (0 a 10 h)	4,75	2,26	
2 – pH 7 a 37 °C (10 a 24 h)			

Outra estratégia testada por Liu et al. (2018) foi a divisão do cultivo em duas fases: uma primeira com pH 8 a 31 °C nas primeiras 10 h e uma segunda com pH 7 mantida a 37 °C até o fim do cultivo. Semelhante à estratégia de ciclos de temperatura, foi possível aumentar a concentração de AH apesar de se diminuir a massa molar cerca de 10%.

2.5 ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA

A Engenharia Química é o ramo da Engenharia que lida com processos que transformam a composição, estado energético e/ou estado físico de materiais para produzir novos materiais com fins úteis. Diante desta definição, a análise técnico-econômica pode ser considerada uma das ferramentas mais importantes da Engenharia

Química, visto que ela permite avaliar o desempenho econômico de diferentes processos de forma barata, eficiente e com relativa facilidade (ELIAS et al., 2021).

A análise técnico-econômica envolve a resolução de um sistema de equações formado por relações físico-químicas e balanços materiais e energéticos de cada processo ou operação unitária envolvida na fabricação de determinados produtos. Em seguida, aplicam-se critérios de desempenho econômico, como o valor presente líquido, taxa interna de retorno, preço mínimo de produto, entre outros, que permitem avaliar o processo em estudo. Geralmente, análises técnico-econômicas são realizadas em simuladores de processos (como SuperPro, EMSO, Aspen-Hysys) por conta do grande número de equações e alta complexidade de algumas delas, como as relações termodinâmicas.

Para o cálculo destes critérios econômicos, estima-se os custos capitais, que são os gastos com a construção ou expansão da indústria, e os operacionais, que são as despesas necessárias para a indústria operar (HARRISON et al., 2015).

Na avaliação dos custos capitais, é preciso avaliar os custos capitais fixos, o capital de giro e os custos de validação e inicialização. Os custos capitais fixos envolvem a aquisição dos equipamentos industriais, compra do terreno e construção da estrutura física industrial. Em geral, para projetos preliminares, estimam-se estes custos através de preço de aquisição dos equipamentos, que pode ser feito através de contato com fornecedores ou com relações matemáticas, como o método CAPCOST. O capital de giro e os custos de validação e inicialização, em geral, são uma fração dos custos capitais fixos (HARRISON et al., 2015; TURTON et al., 2012).

Os custos operacionais também são divididos em três fatores. O primeiro é os custos diretos de fabricação englobam os custos daquilo que está diretamente relacionado à fabricação do produto, de forma que variam de acordo com a taxa de produção. São contabilizados neste fator os gastos com matéria-prima, mão-de-obra (tanto operacional como de supervisão), tratamento de resíduos, utilidades (quentes, frias, ar, eletricidade etc.), patente, suprimentos operacionais, laboratório, manutenção e reparos (TURTON et al., 2012).

O segundo fator é custos diretos, que não variam de acordo com a taxa de produção, dizendo respeito então a depreciação, impostos, seguro e despesas da fábrica ³.

³ Inclui-se nas despesas fábricas gastos como serviços de contabilidade, benefícios dos funcionários, proteção de fogo e segurança laboral, cafeteria, entre outros.

Por fim, o terceiro e último fator é despesas gerais, que são gastos que não estão associados diretamente à fabricação do produto. Aqui, inclui-se nas despesas gerais os custos administrativos e de supervisão gerais, distribuição, venda, pesquisa e desenvolvimento (se existirem) (TURTON et al., 2012).

2.5.1 Análise técnico-econômica da produção de ácido hialurônico

Até 2021, poucos trabalhos focavam no aspecto econômico da produção de ácido hialurônico microbiano, sendo que os que o faziam focavam no custo do meio de cultivo e formas de barateá-lo. No entanto, este cenário mudou com os trabalhos de Cerminati et al. (2021), Ferreira et al. (2021) e Torres-Acosta et al. (2021) que focaram neste aspecto.

Cada um destes trabalhos focou em aspectos diferentes: Torres-Acosta et al. (2021) focaram em comparar o uso de microrganismos recombinantes e produtores naturais de ácido hialurônico e em análises de sensibilidade; Ferreira et al. (2021) realizaram uma análise técnico-econômica clássica da produção de ácido hialurônico microbiano com *S. zooepidemicus* avaliando os efeitos de aumentar a sua produção em biorreator e de se adicionar uma nova etapa de purificação para separar ácido hialurônico de alta massa molecular – que pode ser comercializado por um preço maior –; e Cerminati et al. (2021) exploraram o conceito de economia circular utilizando como substrato glicerol proveniente de resíduo de uma fábrica de biodiesel argentina.

Um consenso que existe nos trabalhos é que a produção de ácido hialurônico é viável com altas taxas de lucro e/ou retorno. No entanto, o preço de venda do biopolímero chama a atenção: Ferreira et al. (2021) se basearam nas estimativas de Chong et al. (2005) e consideram que o quilograma é vendido a US\$ 2.000,00 ou US\$ 50.000,00, dependendo da aplicação, enquanto Cerminati et al. (2021), sem explicitar suas fontes, afirmam que o quilograma é vendido por US\$ 200,00. Esta diferença se torna relevante, pois o custo unitário de produção do quilograma de ácido hialurônico encontrado por Ferreira et al. (2021) varia de US\$ 946,00 a US\$ 1.691,00, o que inviabiliza sua venda usando o valor de Cerminati et al. (2021).

Os processos analisados eram muito semelhantes, sendo as principais diferenças o momento em que é realizada a precipitação do ácido hialurônico, uma etapa a mais de adsorção com sílica e o uso de filtração tangencial no início para concentrar o biopolímero e remover contaminantes com massa molar menor que 30 kDa. De fato, esta é uma boa estratégia, pois remove um volume considerável de água da corrente, diminuindo o custo do secador. No entanto, não é possível realizar nenhuma comparação entre os processos,

uma vez que Torres-Acosta et al. (2021) não informam maiores detalhes a respeito do desempenho econômico de seu processo, focando mais em análises de sensibilidade. No entanto, é preciso destacar que o processo proposto por Ferreira et al. (2021) utiliza poucas informações experimentais, enquanto o de Torres-Acosta et al. (2021) é baseado no processo de Rangaswamy e Jain (2008) e que atende experimentalmente as normas da Farmacopeia Britânica para o ácido hialurônico.

Um outro aspecto relevante da análise técnico-econômica é que ela permite identificar pontos no processo que podem ser melhorados, direcionando pesquisas naquela direção. Neste contexto, verificou-se que o rendimento de recuperação é o parâmetro que mais influencia a produção de ácido hialurônico, indicando que se deve buscar alternativas para os atuais processos de recuperação e purificação do biopolímero, independente de se utilizar microrganismos naturalmente produtores de AH ou recombinantes (TORRES-ACOSTA et al., 2021).

Tal como é esperado todos os trabalhos possuem suas limitações individuais, como não se conhecer o valor preciso de alguns parâmetros (FERREIRA et al., 2021), não possuir uma etapa de recuperação de etanol (CERMINATI et al., 2021) ou isopropanol (TORRES-ACOSTA et al., 2021).

Um ponto que nenhum dos trabalhos publicados tocam é na avaliação do impacto ambiental que a produção de ácido hialurônico possui, o que já é considerado uma métrica importante no desenvolvimento de um processo industrial (TUFVESSON et al., 2013). Para o ácido hialurônico, esta análise torna-se imprescindível, uma vez que um dos fatores que motivou a busca por alternativas à sua extração de cristas de galo foi o alto impacto ambiental do solvente usado (clorofórmio) possui, no entanto, nenhum trabalho realiza tal análise. O mais próximo encontrado foi um processo considerado sustentável pelos autores por utilizar glicerol proveniente de produtores locais de biodiesel (CERMINATI et al., 2021).

2.6 ANÁLISE DE CICLO VIDA

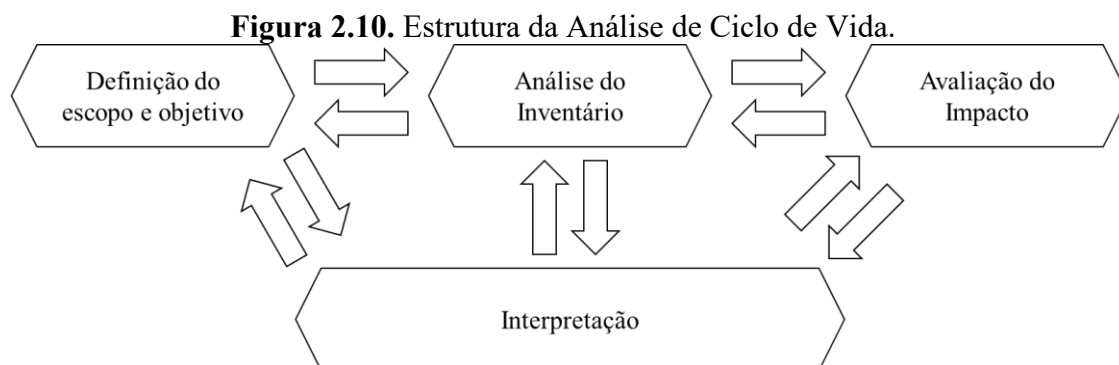
O impacto ambiental de processos industriais é relevante, uma vez que ele pode impactar diretamente os operários, o meio ambiente (local e global) e na relação com o consumidor, que vem buscando produtos mais amigáveis ao meio ambiente. Uma forma de avaliar tal impacto é a Análise de Ciclo de Vida (LACA; HERRERO; DÍAZ, 2011).

A Análise de Ciclo de Vida é uma técnica que estuda os aspectos ambientais e possíveis impactos relacionados desde a obtenção da matéria até a disposição final do

produto. Esta abordagem é conhecida como berço-ao-túmulo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001). No entanto existem outras abordagens, como a berço-ao-portão (da produção de matéria-prima até a saída do produto da indústria) e a portão-ao-portão (da entrada da matéria até a saída do produto da indústria).

De modo geral, a Análise de Ciclo de Vida possui 4 etapas, como mostra a Figura 2.10:

- i. Definição do escopo e objetivo;
- ii. Análise do Inventário;
- iii. Avaliação do Impacto;
- iv. Interpretação.



Fonte: Adaptado de Laca, Herrero e Díaz (2011).

Na etapa da definição do escopo e objetivo, declara-se qual é a aplicação, a motivação do estudo, o público-alvo e o escopo. O escopo consiste em determinar qual é a unidade funcional (a referência para as medidas de saída e entrada do sistema), as fronteiras do sistema, o tipo de impacto, a metodologia a ser utilizada, os procedimentos de alocação (se necessários), as suposições feitas, as limitações do estudo e o requisito de qualidade dos dados (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001).

Realizado este procedimento, passa-se para a próxima etapa, a Análise do Inventário, que é, em essência, um balanço de massa e energia. Nele, quantificam-se todas as entradas (matéria-prima e energia) e as saídas (emissões para o ar, água e solo; produtos e subprodutos; geração de resíduos sólidos). Em geral, esta etapa é a que mais consome tempo, por conta do alto volume de coleta de dados. Para facilitar esta etapa, é possível recorrer a bases de dados externas, sendo uma das mais conhecidas a Ecoinvent (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001; LACA; HERRERO; DÍAZ, 2011).

A próxima etapa é a Avaliação do Impacto. Nela, associam-se os dados do Inventário com possíveis impactos específicos e busca-se compreender tais impactos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001). A Avaliação pode ser dividida em 4 subetapas: classificação (relacionar os dados do inventário por categoria), caracterização (usar fatores de pesos ou equivalência para unir todos os impactos das entradas e saídas em um indicador único para cada categoria de impacto), normalização (estabelecer uma referência para tornar os impactos “adimensionais”, o que permite comparar tais resultados) e avaliação (atribuir peso aos impactos, identificando quais categorias são mais importantes para o objetivo escolhido). É preciso destacar que a avaliação é uma etapa controversa no meio, já que utiliza considerações subjetivas (LACA; HERRERO; DÍAZ, 2011).

Por fim, é feita a Interpretação, que é tirar conclusões a partir dos resultados das três etapas anteriores. É nesta etapa que é possível identificar partes críticas do processo, auxiliando no desenvolvimento de estratégias que possam reduzir o impacto ambiental. Destaca-se que é na Interpretação, em estudos comparativos, que é possível identificar qual alternativa possui melhor desempenho econômico. A Interpretação também pode ser feita durante as outras etapas (Figura 2.10), ajudando a reavaliar o escopo, o objetivo e o inventário (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001; LACA; HERRERO; DÍAZ, 2011).

2.7 REFERÊNCIAS

ALAM, M.; TUNG, R. Injection technique in neurotoxins and fillers: Indications, products, and outcomes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, n. 3, p. 423–435, 2018.

AMADO, I. R. et al. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54–61, 2016.

AMADO, I. R. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.

AMAGAI, I.; TASHIRO, Y.; OGAWA, H. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. **Fisheries Science**, v. 75, n. 3, p. 805–810, 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2012. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 33, n. 2_Supplement, p. 1S-21S, 1 jul. 2013.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2013. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 34, n. Supplement_1, p. 1–20, 1 jul. 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2014. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 35, n. suppl_2, p. 1–24, 1 jul. 2015.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2015. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 36, n. suppl_1, p. 1–29, 1 maio 2016.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2016. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 37, n. suppl_2, p. 1–29, 7 abr. 2017.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2017. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 38, n. suppl_3, p. 1–24, 26 maio 2018.

AMERICAN SOCIETY FOR AESTHETIC PLASTIC SURGERY. Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2018. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 39, n. Supplement_4, p. 1–27, 21 jun. 2019.

ARMSTRONG, D. C.; COONEY, M. J.; JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 309–312, 1997.

ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.

ARSLAN, N. P.; AYDOGAN, M. N. Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. **Waste and Biomass Valorization**, 2020.

ASARI, A. Medical Application of Hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 457–473.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14040: Gestão ambiental - Avaliação do ciclo de vida - Princípios e estrutura**. Rio de Janeiro: 2001.

ATTIA, Y. A.; KOBEASY, M. I.; SAMER, M. Evaluation of magnetic nanoparticles influence on hyaluronic acid production from *Streptococcus equi*. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 135–142, 2018.

BADRI, A.; RAMAN, K.; JAYARAMAN, G. Uncovering Novel Pathways for Enhancing Hyaluronan Synthesis in Recombinant *Lactococcus lactis*: Genome-Scale Metabolic Modeling and Experimental Validation. **Processes**, v. 7, n. 6, p. 343, 2019.

BALAZS, E. A. **Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof**. Estados Unidos,

1979. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4141973.html>>

BALAZS, E. A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 415–455.

BENEDINI, L. J.; SANTANA, M. H. A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 798–800, fev. 2013.

BIJLSMA, J. W. J.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F. P. J. G. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. **The Lancet**, v. 377, n. 9783, p. 2115–2126, 2011.

BLANK, L. M.; MCLAUGHLIN, R. L.; NIELSEN, L. K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 685–693, 20 jun. 2005.

BOERIU, C. G. et al. Production Methods for Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p. 14, 2013.

BUSSE, J. W. et al. Guideline for opioid therapy and chronic noncancer pain. **Canadian Medical Association Journal**, v. 189, n. 18, p. E659 LP-E666, 8 maio 2017.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D459-D471, 1 jan. 2014.

CARR, A. J. et al. Knee replacement. **The Lancet**, v. 379, n. 9823, p. 1331–1340, 2012.

CERMINATI, S. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3075–3086, 2021.

CHEN, S.-J. et al. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 428–432, 2009a.

CHEN, W. Y. et al. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 27, p. 18007–18014, jul. 2009b.

CHEN, W. Y. et al. The Role of Hyaluronic Acid Precursor Concentrations in Molecular Weight Control in *Streptococcus zooepidemicus*. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 147–156, 2014.

CHENG, F. et al. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 4, p. 574–584, 1 abr. 2016.

CHENG, F. et al. Enhanced Biosynthesis of Hyaluronic Acid Using Engineered *Corynebacterium glutamicum* Via Metabolic Pathway Regulation. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 10, p. 1700191, 1 out. 2017.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.

CHONG, B. F.; NIELSEN, L. K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 153–162, 2003a.

CHONG, B. F.; NIELSEN, L. K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 33–41, 9 jan. 2003b.

CIRIMINNA, R.; SCURRIA, A.; PAGLIARO, M. Microbial production of hyaluronic acid: the case of an emergent technology in the bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 6, p. 1604–1610, 2021.

DE MACEDO, A. C.; SANTANA, M. H. A. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2213–2219, 2012.

DEANGELIS, P. L. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26557–26562, set. 1999.

DEANGELIS, P. L. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 295–305, 2012.

DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95–103, 15 mar. 2010.

EDQM. **European Pharmacopoeia**. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004.

ELIAS, A. M. et al. Techno-Economic-Environmental Analysis of Sophorolipid Biosurfactant Production from Sugarcane Bagasse. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 27, p. 9833–9850, 14 jul. 2021.

ERICKSON, B. P. et al. The Role of Neurotoxins in the Periorbital and Midfacial Areas. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 243–255, 2015.

FERRARI, F. A. et al. The Solid-State Cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in Polyurethane Foam as a Strategy for the Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1491–1502, 2013.

FERREIRA, R. G. et al. Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation. **Processes**, 2021.

GOMES, A. M. V. et al. Heterologous Hyaluronic Acid Production in *Kluyveromyces lactis*. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 294, 2019.

GRAND VIEW RESEARCH. **Hyaluronic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Dermal Fillers, Osteoarthritis (Single Injection, Three Injection, Five Injection), Ophthalmic, Vesicoureteral Reflux), By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027**. Disponível em:

<<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hyaluronic-acid-market>>.

Acesso em: 11 mar. 2020.

HARRISON, R. E. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HUANG, W.-C.; CHEN, S.-J.; CHEN, T.-L. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 460–464, 2008.

IM, J.-H. et al. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1337, 2009.

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2014**. New Hampshire - USA: [s.n.]. 2015

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2015**. New Hampshire - USA: [s.n.]. 2016

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **The international study on aesthetic/comestic procedures performed in 2016**. New Hampshire - USA: [s.n.]. 2017

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2017**. New Hampshire - USA: [s.n.]. 2018

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2018**. New Hampshire - USA: [s.n.]. 2019

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2019**. [s.l: s.n.]. 2020

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2020**. [s.l: s.n.]. 2021

INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY. **ISAPS international survey on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2021**. [s.l: s.n.]. 2022

IZAWA, N. et al. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 119–123, 2009.

- JAGANNATH, S.; RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 148–158, 15 jan. 2010.
- JEEVA, P. et al. Production of controlled molecular weight hyaluronic acid by glucostat strategy using recombinant *Lactococcus lactis* cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4363–4375, 2019.
- JEONG, E.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 28–36, 2014.
- JIN, P. et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. **Metabolic Engineering**, v. 35, p. 21–30, 2016.
- KIM, S.-J.; PARK, S.-Y.; KIM, C.-W. A Novel Approach to the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 12, p. 1849–1855, 2006.
- KITTANG, B. R. et al. Zoonotic necrotizing myositis caused by *Streptococcus zooepidemicus* in a farmer. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 147, 2007.
- LACA, A.; HERRERO, M.; DÍAZ, M. Life Cycle Assessment in Biotechnology. In: MOO-YOUNG, M. B. T.-C. B. (SECOND E. (Ed.). . **Comprehensive Biotechnology 2: Engineering Fundamentals of Biotechnology**. Burlington: Academic Press, 2011. p. 839–851.
- LAI, Z.-W. et al. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 15, p. 2114–2123, 2011.
- LEE, G.-Y. et al. Effect of non-animal-derived nitrogen sources on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus* sp. KL0188. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 283–289, 2009.
- LEIGH, J. P.; SEAVEY, W.; LEISTIKOW, B. Estimating the costs of job-related arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 7, p. 1647 LP – 1654, 1 jul. 2001.
- LEWIS, R. J. **Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials**. 11. ed. Hoboken - US: John Wiley & Sons, 2012.
- LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Boca Raton - USA: CRC Press, 2005.
- LIU, J. et al. Efficient production of high-molecular-weight hyaluronic acid with a two-stage fermentation. **RSC Advances**, v. 8, n. 63, p. 36167–36171, 2018.
- LIU, L. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2011.
- LIU, L. et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy

- based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8532–8536, 2008a.
- LIU, L. et al. Influence of culture modes on the microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 3, p. 269, 2008b.
- LIU, L. et al. Statistical modeling and optimization for enhanced hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* via the supplement of uracil. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 3, n. 4, p. 351–356, 2009a.
- LIU, L. et al. Culture conditions optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* based on radial basis function neural network and quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 1, p. 24–32, 2009b.
- LONG, H. X.; ZHANG, X. H.; MO, Z. J. Culture Conditions Optimization of Hyaluronic Acid Production Based on GP and QPSO Algorithms. **Advanced Materials Research**, v. 424–425, p. 141–145, 2012.
- MAO, Z.; SHIN, H.-D.; CHEN, R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 63–69, 2009.
- MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629–634, dez. 1934.
- MEYER, K.; SMYTH, E. M.; DAWSON, M. H. The isolation of a mucopolysaccharide from synovial fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 319–327, abr. 1939.
- MOHAN, N. et al. Deciphering the role of dissolved oxygen and N-acetyl glucosamine in governing higher molecular weight hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus* cell factory. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 8, p. 3349–3365, abr. 2020.
- NIMROD, A. et al. **Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of streptococcus**. USA, 1986.
- OLIVEIRA, A. H. et al. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1097–1104, 2013.
- OLIVEIRA, R. DE C. **Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando peptona de soja**. [s.l.] UNICAMP, 2014.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **World Population Aging 2017 - Highlights**. Nova Iorque - EUA: [s.n.].
- PAN, N. C. et al. Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 1, p. 276–293, 2017.

PAN, N. C. et al. Factorial design in fermentation medium development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, n. 1 SE-Biotechnology, 3 out. 2019.

PHILLIPS, M. et al. Differentiating factors of intra-articular injectables have a meaningful impact on knee osteoarthritis outcomes: a network meta-analysis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, 2020.

PIRES, A. M. B. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6506–6509, ago. 2010.

PIRES, A. M. B.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2125–2135, 2010.

PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.

PRASAD, S. B.; JAYARAMAN, G.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 273–283, 2010.

PUVENDRAN, K.; JAYARAMAN, G. Enhancement of acetyl-CoA by acetate co-utilization in recombinant *Lactococcus lactis* cultures enables the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 6989–7001, set. 2019.

QUINN, R. W.; SINGH, K. P. Antigenicity of Hyaluronic Acid. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 95, n. 2, p. 290–294, 1 jun. 1957.

RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 493–496, 2008.

ROHIT, S. G. et al. Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 284–293, 2018.

SARWER, D. B. Body image, cosmetic surgery, and minimally invasive treatments. **Body Image**, v. 31, p. 302–308, 2019.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W. et al. (Eds.). **Biociencia Industrial**. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 2008. p. 5–18.

SHAH, M. V; BADLE, S. S.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 53–60, 2013.

SHIEDLIN, A. et al. Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: *Streptococcus*

zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2122–2127, 1 nov. 2004.

SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D. Therapeutic biomaterials from chemically modified hyaluronan. In: **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 475–504.

TORRES-ACOSTA, M. A. et al. Comparative Economic Analysis Between Endogenous and Recombinant Production of Hyaluronic Acid. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 659, 2021.

TUFVESSON, P. et al. Advances in the Process Development of Biocatalytic Processes. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 10, p. 1233–1238, 18 out. 2013.

TURTON, R. et al. **Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes**. 4. ed. Ann Arbor: Pearson Education, 2012.

VÁZQUEZ, J. A. et al. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2, p. 125–130, 2009.

VÁZQUEZ, J. A. et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 46, 2010.

VÁZQUEZ, J. A. et al. Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* on Protein Substrates Obtained from *Scylliorhinus canicula* Discards. **Marine drugs**, v. 13, n. 10, p. 6537–6549, 23 out. 2015.

WEIGEL, P. H. Bacterial Hyaluronan Synthases -Update-. **Hyaluronan Today**, v. 8, n. A4, 2004.

WEISSMANN, B.; MEYER, K. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 7, p. 1753–1757, abr. 1954.

WESSELS, M. R. et al. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8317–8321, out. 1991.

WESTBROOK, A. W. et al. Application of hydrocarbon and perfluorocarbon oxygen vectors to enhance heterologous production of hyaluronic acid in engineered *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 5, p. 1239–1252, 1 maio 2018.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 9, p. 646–656, 2003.

YOSHIMURA, T. et al. Heterologous Production of Hyaluronic Acid in an ϵ -Poly-L-Lysine Producer, *Streptomyces albulus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3631–3640, jun. 2015.

YUSUF, E. Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. **Current Treatment Options in Rheumatology**, v. 2, n. 2, p. 111–125, 2016.

ZHANG, X. et al. Construction of efficient *Streptococcus zooepidemicus* strains for hyaluronic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 121, 2016.

3 ESTRATÉGIAS DE CONDUÇÃO DE CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS

Este capítulo traz um estudo a respeito da influência que a manutenção do pH possui em cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* para produção de ácido hialurônico. Este estudo em frascos agitados – sem controle de pH por adição de base – avaliou o efeito de diferentes temperaturas de cultivo, o uso de MOPS como tampão e pHs iniciais, tanto na concentração de biomassa e ácido hialurônico.

3.1 INTRODUÇÃO

O interesse da comunidade acadêmica pelo ácido hialurônico tem aumentado nos últimos anos, possivelmente por conta de suas aplicações, como Engenharia de Tecidos, preenchimento cutâneo, viscosuplementação em articulações de pessoas acometidas com artrite e artrose, entre outras. Inicialmente, sua produção era feita por meio de extração de tecidos animais, em especial de cristas de galo. No entanto, este perfil tem mudado com o passar o tempo, uma vez que se encontrou bactérias que o produziam naturalmente e foi possível atender às demandas das agências reguladoras para a diminuição do uso de produtos de origem animal em seres humanos (DEANGELIS, 2012).

As bactérias mais utilizadas são as do gênero *Streptococcus*, mais especificamente da espécie *Streptococcus zooepidemicus*, por conta de sua alta produtividade. Uma característica distinta dessas bactérias é que a produção de ácido láctico é a principal forma de geração de energia e manutenção do crescimento celular (PIRES; SANTANA, 2010), havendo, portanto, uma tendência de queda de pH ao longo de cultivos em meio líquido. Em cultivos em biorreatores, supera-se tal dificuldade através da adição contínua de bases para manter o pH no valor desejado.

No entanto, o uso de bases pode aumentar os custos de um bioprocessamento industrial. Diante disto, este capítulo possui como objetivo verificar se o controle de pH é de fato necessário para cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* e, se for, avaliar estratégias de cultivo para controlar o pH.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo e meios de cultura

O microrganismo utilizado foi *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, adquirido da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, Estados Unidos) e cedido pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos –

FEQ/UNICAMP. O estoque do microrganismo foi mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com meio contendo 20% (m/m) de glicerol.

O meio de cultura utilizado era composto por peptona de soja (Kerry) 40 g L^{-1} , MOPS (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil) e glicose PA (Êxodo Científica). A esterilização dos meios foi feita em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A fonte de carbono, peptona de soja e o MOPS foram autoclavados em frascos diferentes para evitar interação entre eles durante a esterilização.

3.2.2 Cultivos

Para ativação do microrganismo, estriou-se $10\text{ }\mu\text{L}$ da cultura-estoque de *Streptococcus zooepidemicus* em placas de Petri contendo ágar (30 g L^{-1}) e peptona de soja (67 g L^{-1}) (BENEDINI; SANTANA, 2013).

Os cultivos foram conduzidos em agitadores orbitais a 200 rpm. A temperatura de incubação foi mantida a 27 ou $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo do cultivo. No geral, foram utilizados erlenmeyers de 50 mL, exceto para avaliação do efeito de inibição da glicose, que foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL. Em todos os casos o volume reacional foi de 50% do volume nominal do frasco.

Os cultivos conduzidos em erlenmeyers de 50 mL foram inoculados através da ressuspensão de uma colônia de microrganismo, previamente cultivada em placa de petri, conforme já descrito.

Já os cultivos em erlenmeyers de 250 mL foram inoculados com 6,25 mL de caldo de inóculo com $\text{DO}_{600} \approx 2$.

3.2.3 Separação e purificação do ácido hialurônico

A amostra de caldo foi centrifugada durante 20 min, adicionando-se etanol ao sobrenadante na razão volumétrica etanol:sobrenadante 1,5:1. A solução resultante foi mantida, durante 1 h, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, centrifugada para precipitar o ácido hialurônico (PIRES; SANTANA, 2010).

Ao corpo de fundo da centrifugação adicionou-se cloreto de sódio ($0,15\text{ mol/L}$) para ressolubilização. A esta nova solução, repetiu-se o processo descrito anteriormente mais duas vezes (PIRES; SANTANA, 2010).

3.2.4 Métodos analíticos

Acompanhou-se o crescimento celular periodicamente através da medida da densidade ótica a 600 nm (DO_{600}). Em seguida, converteu-se este valor para concentração celular (C_X [$g L^{-1}$]) através da Equação (3.1).

$$C_X (g L^{-1}) = (0,29 \pm 0,05) DO_{600} \quad (3.1)$$

A concentração de ácido hialurônico foi determinada por turbidimetria (500 nm) (CAVALCANTI et al., 2019). Como padrão foi utilizado hialuronato de sódio adquirido de Genzyme Corporation (Cambridge, MA, EUA).

3.3 PROCEDIMENTOS MATEMÁTICOS

3.3.1 Cálculo de velocidade específica de crescimento máxima

Uma ferramenta muito útil para acompanhamento de processos químicos ou físicos é o balanço de massa de um componente i em um volume de controle, que geralmente resulta em equações diferenciais. Os principais termos destas equações são as vazões mássicas de entrada (\dot{m}_i^e [g/h]) e de saída (\dot{m}_i^s [g/h]), velocidade volumétrica de reação (r_i [$g/h/L$]), volume (V [L]) e a massa acumulada (m_i [g]), conforme mostra a Equação genérica (3.2).

$$\frac{dm_i}{dt} = \dot{m}_i^e - \dot{m}_i^s + r_i V \quad (3.2)$$

É importante destacar que está sendo considerado que a velocidade volumétrica de reação assume valor negativo, caso i seja um substrato ou reagente e positivo caso seja um produto.

Como a Equação (3.2) é bem generalista, é preciso simplificá-la. Para o caso de o volume de controle estar na fase líquida de um biorreator aerado inoculado operando em batelada com volume constante, desprezando eventuais perdas por evaporação e amostragem, obtém-se a Equação (3.3) a seguir.

$$\frac{dC_i}{dt} = r_i \quad (3.3)$$

Uma definição que é muito utilizada para bioprocessos que utilizam microrganismos é a velocidade específica de crescimento (μ [h^{-1}]), que é representada pela razão entre a velocidade volumétrica de reação e a concentração celular (C_X [g L^{-1}]) (SHULER; KARGI, 2002), mostrada na Equação (3.4)

$$\mu = \frac{r_X}{C_X} \quad (3.4)$$

Rearranjando a Equação (3.4) para se obter r_X e substituindo na Equação (3.3) quando o componente i for a biomassa (X), é obtida a Equação (3.5).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu C_X \quad (3.5)$$

De modo geral, a velocidade específica de crescimento pode depender de vários fatores, como temperatura, concentração de substrato (fontes de carbono, nitrogênio, sais etc.), concentração de células, entre outros. No entanto, assume-se que, em um cultivo em batelada, μ é constante e máxima durante a fase exponencial do crescimento celular, ou seja, $\mu = \mu_{\text{máx}}$. Fazendo esta substituição, obtém-se a Equação (3.6).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_{\text{máx}} C_X \quad (3.6)$$

Como $\mu_{\text{máx}}$ é um parâmetro importante de um cultivo, ele deve ser calculado. Uma forma simples é resolver a Equação (3.6). Para isso, é preciso uma condição inicial conhecida. Neste caso, considera-se que: $t = t_0$, $C_X = C_{X0}$. Portanto, separando as variáveis, integrando e aplicando a condição inicial obtém-se a Equação (3.7).

$$\ln C_X = \mu_{\text{máx}}(t - t_0) + \ln C_{X0} \quad (3.7)$$

Nota-se uma relação linear entre $\ln C_X$ e $(t - t_0)$, permitindo calcular $\mu_{\text{máx}}$ por regressão linear.

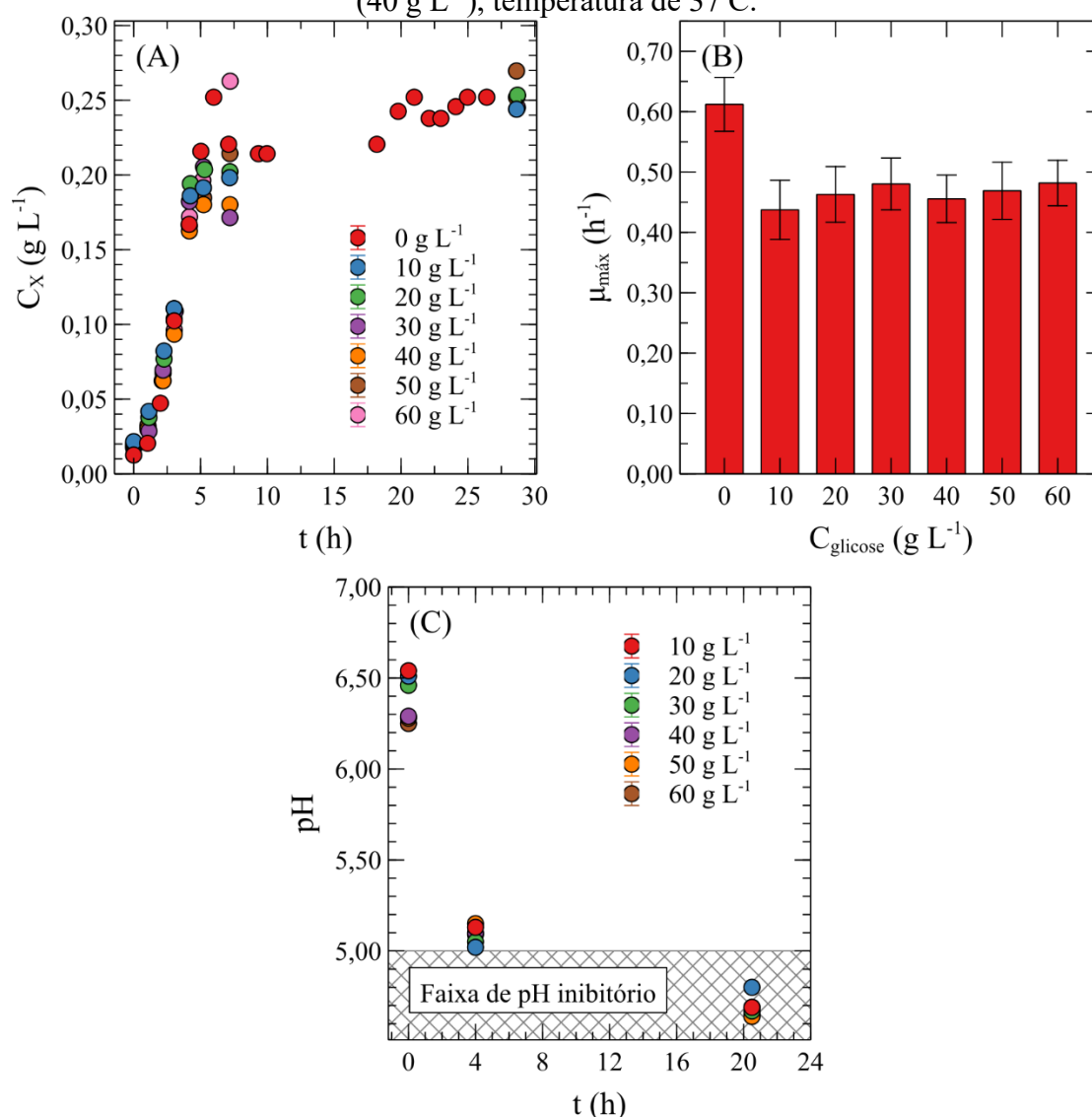
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Inibição por glicose

Como a concentração inicial de glicose influencia na produção de ácidos orgânicos (PIRES; SANTANA, 2010), realizou-se 7 cultivos com diferentes

concentrações (de 0 a 60 g L⁻¹). Verificou-se que a concentração celular final foi muito semelhante para todos os cultivos, independentemente da concentração inicial de glicose (Figura 3.1a). Pires e Santana (2010) observaram a mesma ocorrência, usando uma diferente fonte de nitrogênio em alta concentração (extrato de levedura 60 g L⁻¹).

Figura 3.1 (a) Perfil de crescimento celular (C_X), (b) variação da velocidade máxima de crescimento específica ($\mu_{\text{máx}}$) em função da concentração inicial de glicose (C_{glicose}) e (c) perfil do pH de cultivos de *S. zoepidemicus* em frascos agitados a 200 rpm em diferentes concentrações iniciais de glicose (0 a 60 g L⁻¹) com concentração de peptona (40 g L⁻¹), temperatura de 37 C.



Fonte: Acervo pessoal.

Calculando as velocidades específicas máximas de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) dos cultivos (Figura 3.1b) nota-se que, na presença de glicose, elas se mantêm aproximadamente constantes, porém, em sua ausência, ela é maior. Pires e Santana (2010) verificaram que na ausência ou baixa disponibilidade de glicose a geração de energia da

célula se dá por fermentação ácida mista (evidenciado pela produção de ácido fórmico e etanol), portanto é possível que esta diferença de valores de $\mu_{\text{máx}}$ seja resultado de processos metabólicos diferentes.

Esperava-se que o gráfico de $\mu_{\text{máx}}$ em função da concentração de glicose (Figura 3.1b) possuísse, pelo menos, comportamento hiperbólico em vez da reta paralela ao eixo horizontal. Esta ocorrência indica que a glicose não está limitando o crescimento celular, de forma que outro fenômeno o está realizando. Diante disto, analisou-se o pH dos cultivos ao longo do tempo (Figura 3.1c) e notou-se que seu valor cai muito rapidamente, atingindo níveis em que ele passa a ter efeitos deletérios no crescimento celular (LIU et al., 2018; PIRES, 2009). Estes resultados mostram, independente da concentração inicial de glicose, que o cultivo de *S. zooepidemicus* é inviável sem controlar o pH de alguma forma.

3.4.2 Viabilidade do uso de tampão

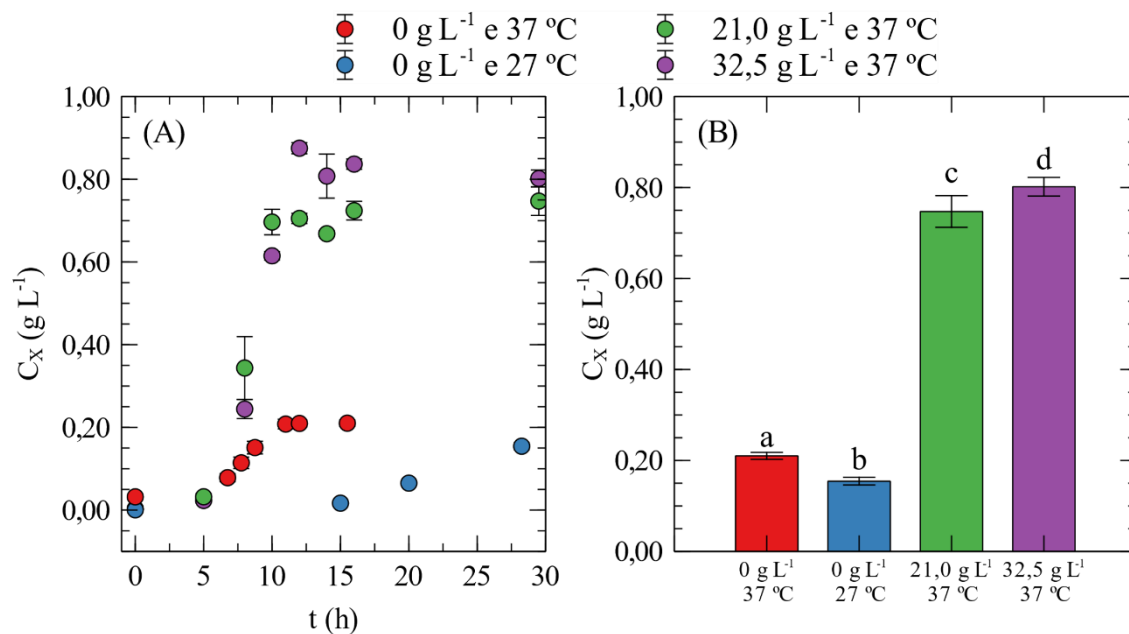
Para viabilizar o cultivo de *S. zooepidemicus* com correção de pH, propôs-se duas estratégias: adicionar ao meio de cultura ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) – um tampão biológico – ou conduzir o cultivo a 27 °C para diminuir a produção de ácidos. Escolheu-se MOPS como tampão, pois é altamente solúvel em água e insolúvel em outros solventes, não interage com outros sais, não é facilmente assimilado pelas células e não inibe reações bioquímicas (FERGUSON et al., 1980). Como a concentração do tampão pode interferir no crescimento celular, foram feitos dois cultivos com diferentes concentrações de tampão: 21 e 32,5 g L⁻¹ (ORTIZ, 2005).

Comparando as estratégias, a adição de MOPS em 32,5 g L⁻¹ atingiu os melhores resultados de concentração celular (cerca de 3,6 vezes maior que o cultivo-controle), seguido pelo cultivo com MOPS a 21 g L⁻¹ (Figura 3.2). Resultados semelhantes foram obtidos ao se adicionar HEPES, uma substância semelhante ao MOPS também usada como tampão, ao meio THY (Todd-Hewitt suplementado com extrato de levedura), aumentando a concentração celular e viabilidade de *Streptococcus pyogenes* (SAVIC; MCSHAN, 2012).

A condução do cultivo em temperatura mais baixa reduziu a produção de biomassa (Figura 3.2), o que pode estar relacionado com o desvio do fluxo do carbono no sentido de outros produtos como gás carbônico e ácidos acético e hialurônico (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010). O teste ANOVA de um fator indicou que existe diferença estatística significativa entre os grupos ($F(3,6) = 1126,439$, $p = 1,22 \cdot 10^{-8}$), sendo que o teste

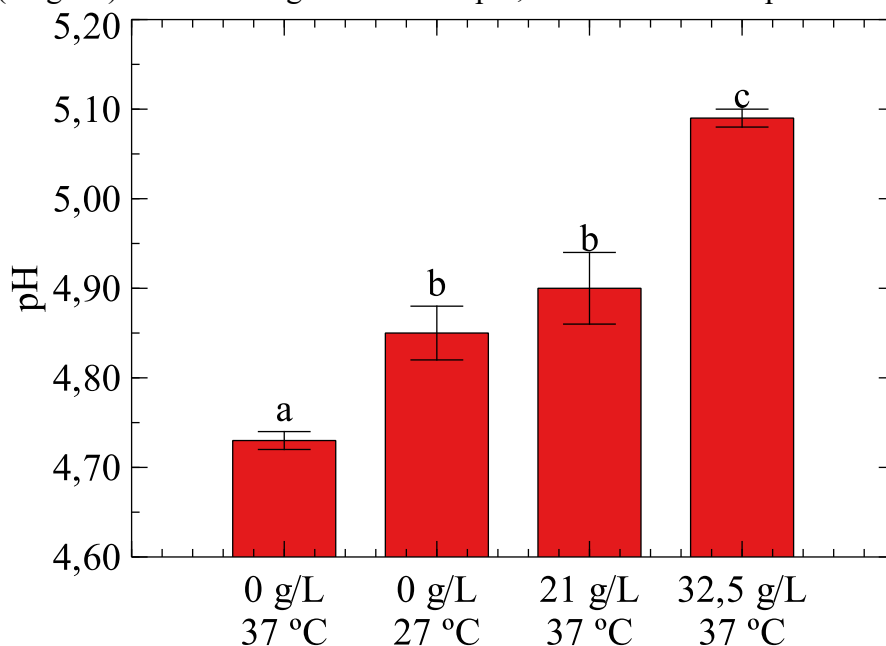
de Tukey indicou que todos os cultivos possuem diferenças significativas entre si com nível de significância (α) 0,05.

Figura 3.2. Influência de cultivo em temperatura mais baixa (27 °C) e do uso de MOPS em duas concentrações diferentes (21 e 32,5 g L⁻¹) no (A) perfil de crescimento e (B) concentração final de *Streptococcus zooepidemicus* em meio glicose (20 g L⁻¹) e peptona de soja (40 g L⁻¹) em frascos agitados a 200 rpm, com cultivos feitos em duplicata em paralelo.



Aferiu-se também o pH ao fim dos cultivos e todos eles atingiram valores próximos ou menores que 5, apesar do uso de MOPS (Figura 3.3), o que sugere que apenas a adição de MOPS não é suficiente para evitar quedas acentuadas no pH.

Figura 3.3. pH final de cultivos de *S. zooepidemicus* em diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e concentrações de MOPS (21 e 32,5 g L⁻¹) em meio glicose (20 g L⁻¹) e peptona de soja (40 g L⁻¹) em frascos agitados a 200 rpm, conduzidos em duplicata em paralelo.



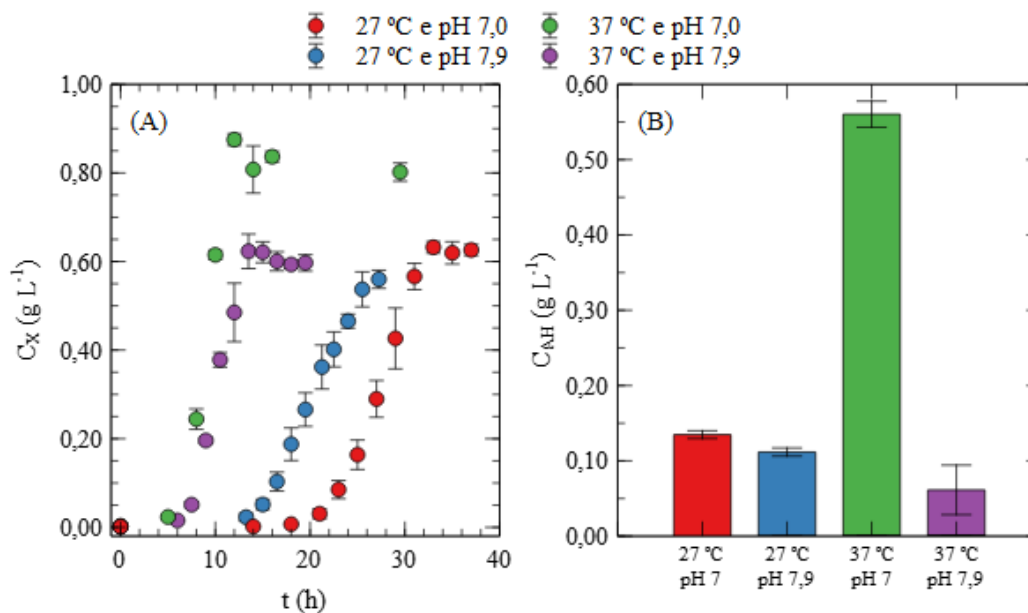
Fonte: Acervo pessoal.

3.4.3 Estratégias para mitigar a queda do pH

Como apenas adicionar o tampão ao meio de cultivo não foi capaz de manter o pH em níveis não-inibitórios (acima de 5), combinou-se uso do tampão a uma temperatura de cultivo de 27 °C, para reduzir a velocidade de crescimento e a produção de ácidos, e pH inicial de 7,9 – o valor máximo da faixa ótima de pH para MOPS –, para permitir que o pH do meio permanecesse por mais tempo próximo a 7.

Apesar da tentativa de variar a temperatura de cultivo e pH inicial, o melhor resultado, tanto para a concentração de *S. zooepidemicus* como de ácido hialurônico foi a 37 °C e pH 7 (Figura 3.4). Tal afirmação pode estar relacionada ao fato de estes serem considerados os valores ótimos para o cultivo de *S. zooepidemicus*, sendo, inclusive, os valores padrão para *setpoint* de diversos cultivos em biorreator.

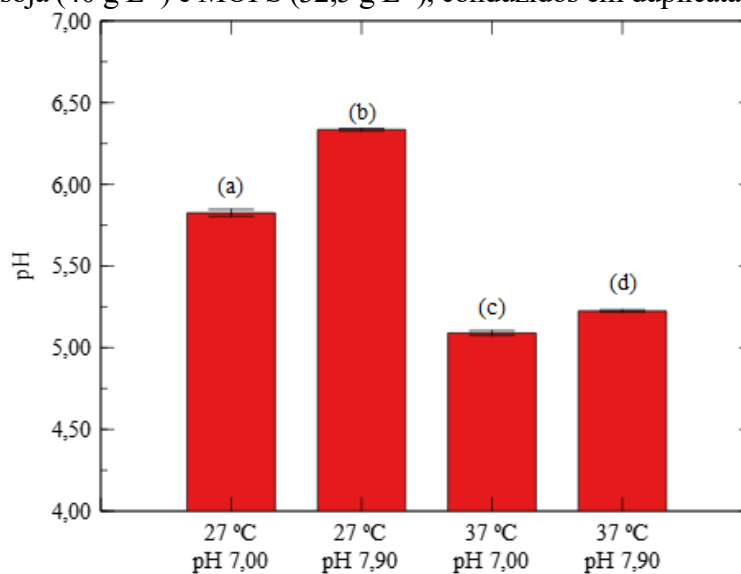
Figura 3.4. Efeitos do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* em frascos agitados a 200 rpm sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) no (A) perfil de crescimento e (B) concentração de ácido hialurônico final em meio com glicose (20 g L⁻¹), peptona de soja (40 g L⁻¹) e MOPS (32,5 g L⁻¹), com cultivos conduzidos em duplicata em paralelo.



Fonte: Acervo pessoal.

Aferindo o pH final dos cultivos em diferentes temperaturas e pH inicial, verificou-se que a única condição de cultivo que conseguiu manter o pH acima de 6 foi a 27 °C e pH inicial 7,9 (Figura 3.5). Porém, ainda com resultados insatisfatórios de concentração celular e de ácido hialurônico (Figura 3.4b).

Figura 3.5. pH final dos cultivos de *S. zooepidemicus* em frascos agitados a 200 rpm sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) em meio glicose (20 g L⁻¹), peptona de soja (40 g L⁻¹) e MOPS (32,5 g L⁻¹), conduzidos em duplicata em paralelo.

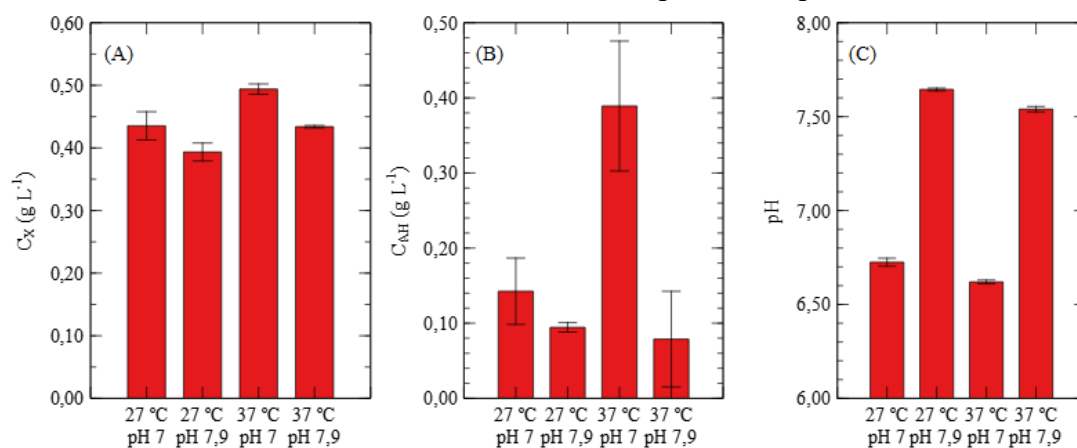


Fonte: Acervo pessoal.

O componente do meio responsável pela queda no pH é a glicose, pois cultivos usando apenas peptona e MOPS, nas mesmas condições de pH e temperatura, mostraram uma queda baixa no pH em relação ao valor inicial (Figura 3.6b), sugerindo que a glicose é a responsável pela queda no pH, o que é reforçado pelo trabalho de Pires e Santana (2010).

Apesar de na ausência de glicose, o pH manter-se na faixa ideal, esta não é uma boa estratégia para conduzir os cultivos, uma vez que a concentração de ácido hialurônico atingida, independente da temperatura e pH inicial, é menor que ao se adicionar glicose (Figura 3.6).

Figura 3.6. Efeitos do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* sob diferentes temperaturas (27 e 37 °C) e pH inicial (7,0 e 7,9) em meio peptona de soja (40 g L⁻¹) e MOPS (32,5 g L⁻¹) na (A) concentração celular, (B) de ácido hialurônico e (C) pH final, sendo os cultivos conduzidos em duplicata em paralelo.



Fonte: Acervo pessoal.

3.5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou a eficácia de se utilizar MOPS em cultivos de *S. zooepidemicus* para aumentar seu crescimento. No entanto, este efeito positivo se limita a capacidade tamponante do MOPS, uma vez que, eventualmente, o pH irá atingir níveis inibitórios, principalmente quando se utiliza glicose como fonte de carbono. Mesmo mudando a temperatura de cultivo e pH inicial, não se conseguiu manter o pH fora da faixa inibitória. Omitir a presença de glicose na composição do meio faz com que a queda no pH fosse menor ao custo da redução da concentração celular e de ácido hialurônico.

Além disso, os resultados mostraram que conduzir cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* em larga escala sem a adição de uma base é inviável, visto que as

concentrações atingidas são, pelo menos, cinco vezes menores que as reportadas pela literatura. Contudo, o custo desta adição deve ser considerado.

Por outro lado, a adição de MOPS ao meio reacional é essencial para a realização de cultivos em frascos agitados, visto que a queda acentuada no pH pode mascarar os resultados (ZHANG; HAO; CHEN, 2006). Para estes casos, recomenda-se utilizá-los em 32 g L⁻¹. Além disso, mostra-se que é preciso avaliar novas estratégias de produção de ácido hialurônico microbiano que exijam menor adição de bases, quer seja através de modificações genéticas em *Streptococcus zooepidemicus* ou o desenvolvimento de novas plataformas de expressão deste biopolímero para redução de seu impacto ambiental.

3.6 REFERÊNCIAS

- BENEDINI, L. J.; SANTANA, M. H. A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 798–800, 2013.
- CAVALCANTI, A. D. D. et al. Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 2, p. 527–539, 2019.
- DEANGELIS, P. L. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 295–305, 2012.
- DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95-103, 2010.
- FERGUSON, W. J. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 2, p. 300–310, 1980.
- JAGANNATH, S.; RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 148–158, 2010.
- LIU, J. et al. Efficient production of high-molecular-weight hyaluronic acid with a two-stage fermentation. **RSC Advances**, v. 8, n. 63, p. 36167–36171, 2018.
- ORTIZ, S. C. A. **Estudo da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em diferentes concentrações de lipídios e de fontes complexas de nitrogênio.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- PIRES, A. M. B. **Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico.** [s.l.] UNICAMP, 2009.
- PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry**

and Biotechnology, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.

SAVIC, D. J.; MCSHAN, W. M. Long-term survival of *Streptococcus pyogenes* in rich media is pH-dependent. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 6, p. 1428–1436, 2012.

ZHANG, J.; HAO, N.; CHEN, G.-Q. Effect of expressing polyhydroxybutyrate synthesis genes (phbCAB) in *Streptococcus zooepidemicus* on production of lactic acid and hyaluronic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 222–227, 2006.

4 INCORPORANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO À BIORREFINARIAS DE ETANOL: ESCOLHA DA FONTE DE CARBONO E DO FLUXOGRAMA

Neste capítulo 4, buscou-se investigar a possibilidade de integrar a produção de ácido hialurônico microbiano a biorrefinarias de etanol e biodiesel. Para isso, verificou-se a possibilidade do uso de glicose, sacarose, xilose e glicerol como fontes de carbono através de cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* em frascos agitados. Em seguida, pesquisou-se e foi definido um fluxograma da produção do biopolímero em escala industrial, que será testada sua viabilidade técnico-econômica-ambiental no capítulo 5.

4.1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear composto por ácido glicurônico e N-acetilglicosamina (WEISSMANN; MEYER, 1954). Suas propriedades físico-químicas únicas, como alta massa molar, capacidade de retenção de água e de preenchimento espacial, aliadas à sua biocompatibilidade atraí o interesse de diferentes áreas da ciência, de tal forma que hoje ele é utilizado em preenchimento cutâneo (ALAM; TUNG, 2018; GOLD, 2007), cirurgias oftalmológicas (BALAZS, 2004), viscosuplementação de pacientes com artrite e artrose (ASARI, 2004; SCHIRALDI et al., 2010; SINGH et al., 2021; TREVISANI; FIDELIX, 2009; ZHAO et al., 2021), entre outros. Além disso, a própria estrutura do ácido hialurônico permite modificações químicas que lhe confere novas propriedades (BACOS; DAYAN, 2019; BAEK et al., 2018; DELLA SALA et al., 2021; TIWARI; BAHADUR, 2019).

Inicialmente, sua produção era feita por meio de extração de tecidos animais como a crista de galo (BALAZS, 1979; BOERIU et al., 2013). No entanto, os altos custos de purificação, dificuldade no fornecimento de matéria-prima de qualidade, o impacto ambiental da pecuária de larga escala e pressão de agências reguladoras para diminuição do uso de produtos de origem animal estimulou a busca por fontes alternativas de produção (DEANGELIS, 2012). É neste contexto que a produção microbiana usando *Streptococcus zooepidemicus* ganhou destaque, visto que o ácido hialurônico produzido por esta rota era igual ao de origem animal, de forma que o ácido hialurônico se tornou o único glicosaminoglicano produzido por microrganismos em escala industrial.

O aquecimento global já é considerado um dos maiores desafios da humanidade no Século 21 e uma das formas de mitigar seus efeitos é através do desenvolvimento de

processos industriais sustentáveis. Já se investigou a produção de ácido hialurônico usando resíduos e subprodutos agroindustriais, como jagra de palmeira palmyra (ROHIT et al., 2018), água de maceração de milho (AMADO et al., 2017), melão de cana (ARSLAN; AYDOGAN, 2020; PAN et al., 2017), proteínas de soro de queijo (AMADO et al., 2016), vísceras de tubarão (VÁZQUEZ et al., 2009), de arraia e atum (VÁZQUEZ et al., 2010). No entanto, a grande maioria dos trabalhos usou a glicose como principal fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Dentro deste contexto, este trabalho busca avaliar o efeito no crescimento celular e produção de ácido hialurônico de três fontes de carbono diferentes que são produtos ou resíduos presentes em biorrefinarias de cana-de-açúcar (sacarose e xilose) e de soja (glicerol) utilizando uma fonte de nitrogênio de origem vegetal: a peptona de soja.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismo e meios

O microrganismo utilizado foi *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, adquirido da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, Estados Unidos) e cedido pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos – FEQ/UNICAMP. O estoque do microrganismo foi mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com meio contendo 20% (m/m) de glicerol.

O meio de cultura basal utilizado era composto por peptona de soja (Kerry) 40 g L^{-1} e MOPS (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil) $32,5\text{ g L}^{-1}$. As fontes de carbono utilizadas foram glicose PA (Êxodo Científica), xilose PA (Sigma), sacarose PA (Sigma) e glicerol PA (Synth). A esterilização dos meios foi feita em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A fonte de carbono, peptona de soja e o MOPS foram autoclavados em frascos diferentes para evitar interação entre eles durante a esterilização.

Garantiu-se que houvesse a mesma disponibilidade de carbono em todos os cultivos mantendo a concentração das fontes de carbono em $0,666\text{ C-mol L}^{-1}$. Na Tabela 4.1 encontram-se os valores de massa molar em C-mol e a concentração em g L^{-1} utilizados.

Tabela 4.1. Concentração em g L^{-1} e massa molar (g C-mol^{-1}) de glicose, sacarose, glicerol e xilose utilizados nos cultivos.

Fonte de carbono	Glicose	Sacarose	Glicerol	Xilose
MM (g C-mol^{-1})	30,026	28,525	30,698	30,026
C (g L^{-1})	20,00	19,00	20,45	20,00

4.2.2 Cultivos

Para ativação do microrganismo, estriou-se 10 μL da cultura-estoque de *Streptococcus zooepidemicus* em placas de Petri contendo ágar (30 g L^{-1}) e peptona de soja (67 g L^{-1}) (BENEDINI; SANTANA, 2013).

O inóculo dos cultivos foi conduzido em shaker de bancada a 200 rpm e 37°C em erlenmeyers de 50 mL com 25 mL de meio. Para evitar uma possível fase de adaptação, o meio do inóculo era composto apenas por peptona de soja e MOPS nas concentrações já mencionadas.

Os cultivos foram feitos em duplicata em *shaker* de bancada em erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de meio, também a 200 rpm e 37°C . Garantiu-se que o inóculo estava no meio da fase exponencial do crescimento antes de se realizar o aumento de escala.

4.2.3 Métodos analíticos, separação e purificação de ácido hialurônico

Para acompanhar o crescimento celular e a concentração de ácido hialurônico, seguiu-se o mesmo procedimento do tópico 3.2.4, sendo que o procedimento para separação e purificação do ácido hialurônico foi o mesmo do tópico 3.2.3.

A concentração das fontes de carbono foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando a coluna de troca iônica SugarPak™ I (6,5 x 300 mm) (Waters, Estados Unidos) usando o detector de índice de refração (RID 6A, Shimadzu, Japão) a 80°C . A fase móvel utilizada era composta por EDTA Cálcio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) dissolvida em água ultrapura com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL .

4.2.4 Métodos matemáticos

Calculou-se da velocidade específica de crescimento celular máxima ($\mu_{\text{máx}} [\text{h}^{-1}]$) através de regressão linear dos dados de logaritmo natural de concentração celular ($\ln C_X$) em função do tempo ($t - t_0$), conforme mostra a equação a seguir.

$$\ln C_X = \mu_{\text{máx}}(t - t_0) + \ln C_{X0}$$

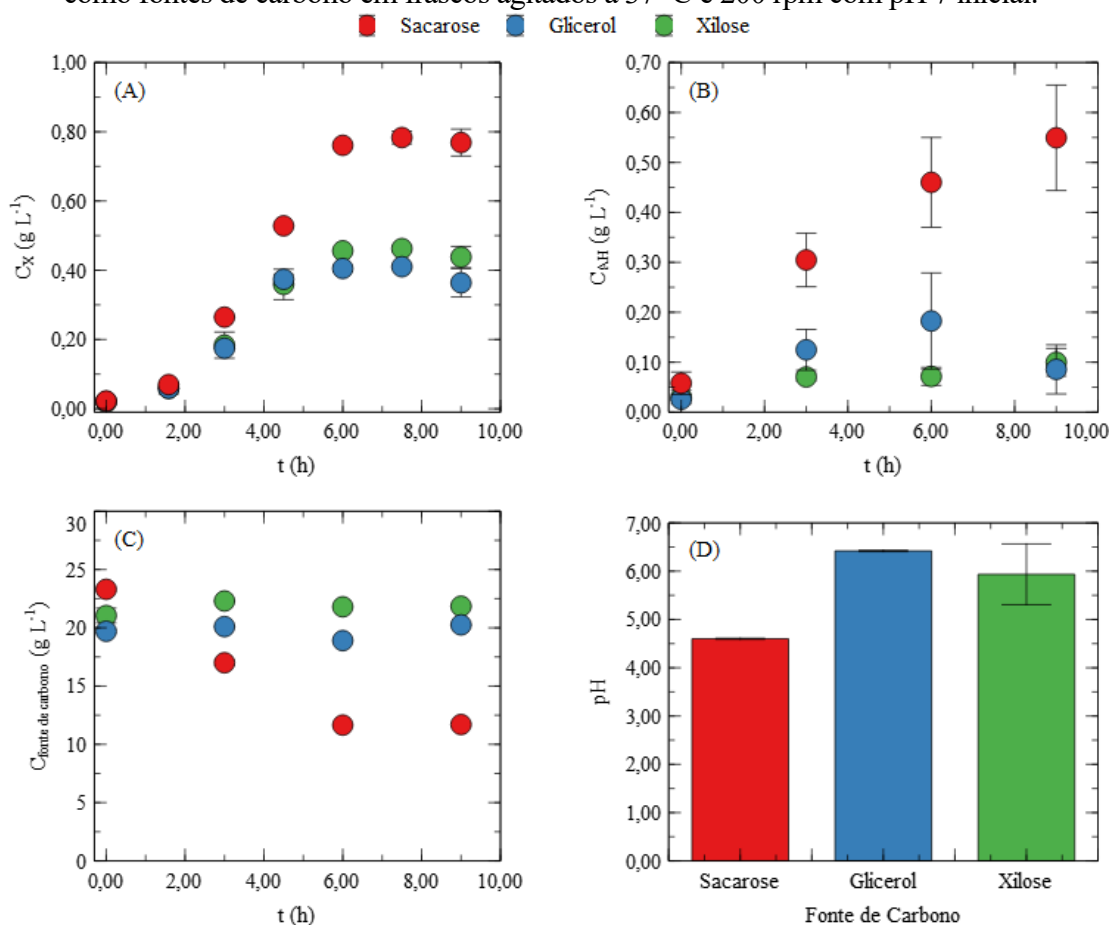
Considerou-se que o cultivo foi isotérmico, uniforme (ou seja, a concentração de *S. zooepidemicus* e ácido hialurônico era a mesma independentemente da posição de amostragem), sem alterações significativas no volume reacional e $t_0 = 0$.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Escolha da fonte de carbono

Dentre as fontes de carbono avaliadas, a sacarose se mostrou como a mais promissora ao atingir $0,5 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ de ácido hialurônico, um resultado quase seis vezes maior que para a xilose e o glicerol (Figura 4.1b). De fato, estudos que compararam a produção de ácido hialurônico microbiano usando diferentes fontes de carbono mostraram que sacarose é um substrato eficaz para este fim (IM et al., 2009; ZAKERI; RASAEI, 2018).

Figura 4.1. Perfil de concentração de (a) *Streptococcus zooepidemicus*, (b) ácido hialurônico, (c) fontes de carbono e (d) pH de cultivos em duplicata usando sacarose, xilose e glicerol como fontes de carbono em frascos agitados a 37 °C e 200 rpm com pH 7 inicial.



Fonte: Acervo pessoal.

O perfil de crescimento celular mostrou a mesma tendência que o de produção de ácido hialurônico, com sacarose atingindo os melhores resultados, porém sem uma diferença tão grande entre elas (Figura 4.1a). No entanto, é importante destacar que a concentração de *S. zooepidemicus* ainda é baixa, independente da fonte carbono utilizada. No caso da sacarose esta ocorrência relaciona-se com a queda do pH (Figura 4.1d), porém o mesmo não pode ser afirmado para os cultivos com xilose e glicerol.

Os perfis de concentração de xilose e glicerol chamam a atenção por indicarem que o microrganismo não consumiu estas fontes de carbono (Figura 4.1c). De fato, analisando o metabolismo de *S. zooepidemicus*, não existem evidências experimentais de que a célula consiga transportar estes carboidratos e, mesmo que conseguisse através de outros transportadores, não possuem vias metabólicas completas de catabolismo (CASPI et al., 2014; KANEHISA; GOTO, 2000). Além disso, um cultivo realizado apenas com peptona de soja e MOPS atingiu patamares semelhantes de velocidade específica máxima de crescimento, pH e concentração de *S. zooepidemicus* que os cultivos com tais fontes de carbono (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Valores de concentração celular ($C_{X,final}$ [$g L^{-1}$]), concentração de ácido hialurônico ($C_{AH,final}$ [$g L^{-1}$]), pH e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$ [h^{-1}]) para diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, glicerol e xilose) utilizados nos cultivos em frascos agitados a 37 °C, 20 rpm e pH inicial 7.

Parâmetro	Fonte de Carbono				Apenas peptona*
	Sacarose	Xilose	Glicerol	Glicose*	
$C_{X,final}$ ($g L^{-1}$)	$0,77 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,04$	$0,80 \pm 0,02$	$0,494 \pm 0,008$
$C_{AH,final}$ ($g L^{-1}$)	$0,5 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,05$	$0,56 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,09$
pH	$4,60 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,6$	$6,42 \pm 0,01$	$5,09 \pm 0,01$	$6,62 \pm 0,01$
$\mu_{máx}$ (h^{-1})	$0,72 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,04$

* Cultivos iniciados usando apenas uma única colônia isolada a partir da placa, sem passar por uma etapa de inóculo.

Nota-se que a sacarose é uma fonte de carbono tão eficiente quanto a glicose – uma das fontes de carbono mais utilizadas em estudos – em termos de produção de ácido hialurônico e crescimento celular de *S. zooepidemicus* (Tabela 4.2). Considerando que o *Streptococcus zooepidemicus* consegue assimilar a sacarose, esta fonte de carbono confere uma vantagem industrial significativa, tanto econômica quanto ambientalmente, visto que ela já está pronta para o consumo do microrganismo, não necessitando etapas prévias de pré-tratamentos, hidrólise e detoxificação.

Diante destes resultados, pode-se dizer que a xilose e o glicerol não são alternativas viáveis para a produção de ácido hialurônico usando *S. zooepidemicus*. No

entanto, eles podem ser usados para a produção heteróloga, já que a xilose pode ser usada como indutor em cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* (WESTBROOK et al., 2018) e o glicerol – proveniente de plantas de biodiesel – como fonte de carbono para cultivos de *Bacillus subtilis* recombinante (CERMINATI et al., 2021).

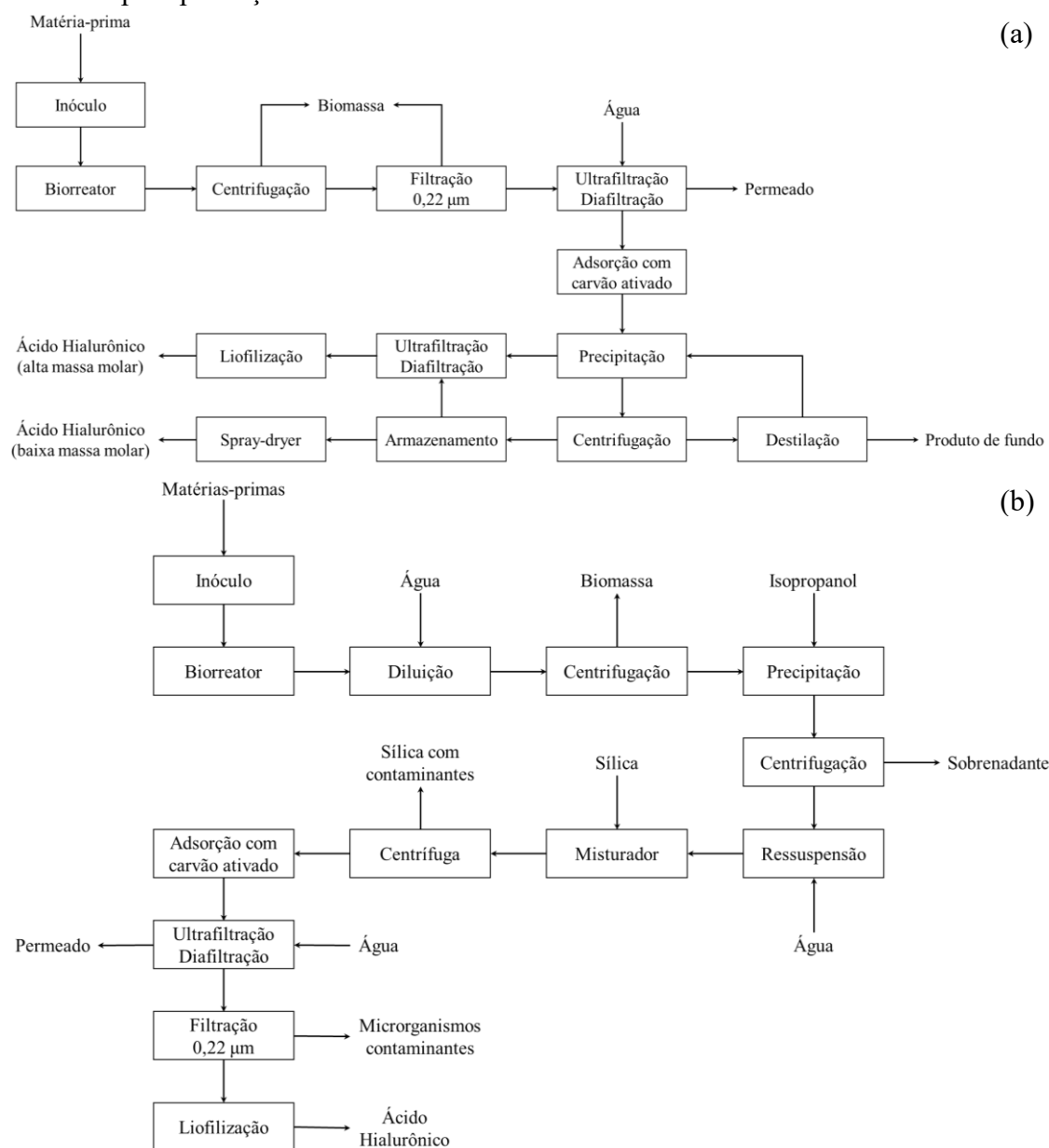
4.3.2 Escolha e desenvolvimento do processo

A produção industrial do ácido hialurônico encontra-se descrita em diferentes trabalhos prévios que também realizaram análises técnico-econômicas (CERMINATI et al., 2021; FERREIRA et al., 2021; RANGASWAMY; JAIN, 2008; TORRES-ACOSTA et al., 2021). Como o ácido hialurônico é um produto extracelular, as principais operações de tais processos são precipitação, filtração e adsorção, de forma que as duas primeiras, em geral, são utilizadas para remoção de materiais mais grosseiros, como células, debris celular e proteínas, enquanto a terceira é para o “polimento” e remoção de contaminantes em menores quantidades, como ácidos nucleicos e íons, para atingir as normas vigentes das farmacopeias (CAVALCANTI et al., 2020). Alternativas para substituir estas operações são objeto de estudo de alguns trabalhos, como o uso de sistema aquoso de duas fases (FLORES-GATICA et al., 2021), eletrodeposição (MURADO et al., 2012) e cromatografia líquida (SOUSA et al., 2009).

Após uma análise cuidadosa de tais processos, nota-se que a maioria deles não divulga informações necessárias para balanços de massa e energia, como rendimentos e recuperações. Diante disso, apenas dois trabalhos restam que divulgam maiores informações (FERREIRA et al., 2021; RANGASWAMY; JAIN, 2008).

Comparando os dois fluxogramas, nota-se que o de Ferreira et al. (2021) apresenta algumas vantagens econômicas em relação ao de Rangaswamy e Jain (2008) como uma única etapa de adsorção com carvão ativado, menor volume da solução a ser precipitada com isopropanol e menos etapas com centrifugação (Figura 4.2).

Figura 4.2. Fluxogramas de (a) Ferreira et al. (2021) e (b) Rangaswamy e Jain (2008) utilizados para produção de ácido hialurônico microbiano em escala industrial.



Fonte: Adaptados de Ferreira et al. (2021) e Rangaswamy e Jain (2008).

Por conta disto, selecionou-se o processo de Ferreira et al. (2021) como base da análise técnico-econômica-ambiental integrada a uma biorrefinaria, detalhada no próximo capítulo.

4.4 CONCLUSÕES

Dentre as fontes de carbono testadas, verificou-se que a sacarose era a que possuía maior potencial industrial, uma vez que a produção de ácido hialurônico usando xilose e glicerol foi muito baixa. Apesar da glicose oferecer um bom resultado em AH,

ela precisaria passar por mais tratamentos antes de ser adicionada ao biorreator, como inversão, pré-tratamento e/ou hidrólise, o que aumentaria os custos do bioprocesso.

Como a xilose e o glicerol não são assimilados por *Streptococcus zooepidemicus*, não se recomenda seus usos como fontes de carbono em cultivos para produção homóloga de ácido hialurônico microbiano. Diante disso, a xilose e glicerol poderiam ser incorporados a produção heteróloga de ácido hialurônico (CERMINATI et al., 2021; UTE et al., 2022; WESTBROOK et al., 2018). É preciso destacar que o uso da xilose proveniente de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar deve ser feito com cautela, uma vez que ela é obtida através de processos conhecidos por liberar compostos inibidores ao crescimento celular, necessitando avaliar a necessidade de destoxificar e/ou purificar este açúcar.

Dentre os processos avaliados, selecionou-se o de Ferreira et al. (2021) por conta de suas vantagens econômicas. No entanto, modificações precisam ser feitas, em especial na etapa de produção por utilizar sacarose como fonte de nitrogênio.

4.5 REFERÊNCIAS

ALAM, M.; TUNG, R. Injection technique in neurotoxins and fillers: Indications, products, and outcomes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, n. 3, p. 423–435, 2018.

AMADO, I. R. et al. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54–61, 2016.

AMADO, I. R. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.

ARSLAN, N. P.; AYDOGAN, M. N. Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. **Waste and Biomass Valorization**, 2020.

ASARI, A. Medical Application of Hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 457–473.

BACOS, J. T.; DAYAN, S. H. Superficial Dermal Fillers with Hyaluronic Acid. **Facial Plast Surg**, v. 35, n. 03, p. 219–223, 2019.

BAEK, J. et al. Facile strategy involving low-temperature chemical cross-linking to enhance the physical and biological properties of hyaluronic acid hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 545–553, 2018.

BALAZS, E. A. **Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof**. Estados Unidos,

1979. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4141973.html>>

BALAZS, E. A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 415–455.

BENEDINI, L. J.; SANTANA, M. H. A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 798–800, fev. 2013.

BOERIU, C. G. et al. Production Methods for Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p. 14, 2013.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D459–D471, 1 jan. 2014.

CAVALCANTI, A. D. D. et al. Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 2, p. 527–539, 2019.

CAVALCANTI, A. D. D. et al. Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 160–170, 2020.

CERMINATI, S. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3075–3086, 2021.

DEANGELIS, P. L. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 295–305, 2012.

DELLA SALA, F. et al. Advances in Hyaluronic-Acid-Based (Nano)Devices for Cancer Therapy. **Macromolecular Bioscience**, p. 2100304, 2021.

FERREIRA, R. G. et al. Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation. **Processes** , 2021.

FLORES-GATICA, M. et al. Primary recovery of hyaluronic acid produced in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* using PEG–citrate aqueous two-phase systems. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 123, 2021.

GOLD, M. H. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 3, p. 369–376, 2007.

IM, J.-H. et al. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1337, 2009.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, jan. 2000.

- MURADO, M. A. et al. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 491–498, 2012.
- PAN, N. C. et al. Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 1, p. 276–293, 2017.
- PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.
- RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 493–496, 2008.
- ROHIT, S. G. et al. Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 284–293, 2018.
- SCHIRALDI, C. et al. Hyaluronic acid degradation during initial steps of downstream processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 1, p. 83–89, 1 jan. 2010.
- SINGH, H. et al. Relative Efficacy of Intra-articular Injections in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-analysis. **The American Journal of Sports Medicine**, p. 03635465211029659, 17 ago. 2021.
- SOUSA, A. S. et al. Purification and Characterization of Microbial Hyaluronic Acid by Solvent Precipitation and Size-Exclusion Chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 906–923, 25 fev. 2009.
- TIWARI, S.; BAHADUR, P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 556–571, 2019.
- TREVISANI, V. F. M.; FIDELIX, T. S. DE A. Osteoartrite. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 12, p. 51–59, 2009.
- UTE, M. et al. A Xylose-Inducible Expression System and a CRISPR Interference Plasmid for Targeted Knockdown of Gene Expression in *Clostridioides difficile*. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 14, p. e00711-18, 2 jan. 2022.
- VÁZQUEZ, J. A. et al. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2, p. 125–130, 2009.
- VÁZQUEZ, J. A. et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 46, 2010.
- WEISSMANN, B.; MEYER, K. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord. **Journal of the American Chemical Society**, v.

76, n. 7, p. 1753–1757, abr. 1954.

WESTBROOK, A. W. et al. Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 47, p. 401–413, 2018.

ZAKERI, A.; RASAEI, M. J. Identification of Wild Type *Streptococcus Zooepidemicus* and Optimization of Culture Medium and Fermentation Conditions for Production of Hyaluronic Acid. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 15, n. 1, 2018.

ZHAO, D. et al. Intra-Articular Injections of Platelet-Rich Plasma, Adipose Mesenchymal Stem Cells, and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Associated With Better Outcomes Than Hyaluronic Acid and Saline in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-analysis. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 37, n. 7, p. 2298- 2314.e10, 2021.

5 ÁCIDO HIALURÔNICO MICROBIANO: UMA ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA-AMBIENTAL DE SUA PRODUÇÃO EM UMA BIORREFINARIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Neste capítulo apresenta-se os resultados de uma análise técnico-econômica-ambiental da produção industrial de ácido hialurônico microbiano em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. Para isso, utilizou-se os resultados do capítulo 4 anterior para escolha da fonte de carbono (sacarose) e fluxograma de processo. A simulação foi realizada em EMSO. Para avaliar o impacto ambiental, realizou-se a Análise de Ciclo de Vida (ACV), com a abordagem portão-a-portão, unidade funcional de 1 kg de ácido hialurônico e dados da base de dados *Ecoinvent 3.0*, obtidos através do *software* SimaPro 9.0.

5.1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um biopolímero de alta massa molar que, desde sua descoberta, tem atraído a atenção tanto da comunidade científica como a audiência leiga. Tal atenção se dá por conta das possibilidades de aplicações, que são consequência de suas propriedades físico-químicas, como sua viscoelasticidade, biocompatibilidade e hidrofília (FALLACARA et al., 2018; VASILE et al., 2017). Atualmente, o ácido hialurônico é usado como suplemento viscoelástico no tratamento de artrite e/artrose (WU et al., 2021), lubrificante em cirurgias oftalmológicas (ASARI, 2004), agente hidratante de produtos cosméticos para retardar o envelhecimento da pele (FALLACARA et al., 2018), entre outros.

Os primeiros processos industriais de produção de ácido hialurônico se baseavam em extraí-lo de crista de galo (BALAZS, 1979). No entanto, a dificuldade em obter matéria-prima de qualidade, altos custos para remoção de possíveis fatores alergênicos e a crescente pressão de agências reguladoras para reduzir o uso de produtos de origem animal motivaram a busca por alternativas. É neste contexto que sua produção através de cultivos com bactérias com capacidade de produzi-lo ganhou destaque (DEANGELIS, 2012).

As principais bactérias utilizadas são as do gênero *Streptococcus*, em especial a espécie *S. zooepidemicus*, que são conhecidas por seus altos rendimentos de ácido hialurônico com alta massa molar (FALLACARA et al., 2018). Existem esforços para produzi-lo em microrganismos recombinantes (BADRI; RAMAN; JAYARAMAN, 2019; GOMES et al., 2019; JEEVA et al., 2019; PUVENDRAN; JAYARAMAN, 2019;

WESTBROOK et al., 2018), porém sem conseguir reproduzir os mesmos níveis de ácido hialurônico de alta massa molar da produção homóloga. A pesquisa de ácido hialurônico microbiano tem focado mais nos aspectos técnicos, como otimização do meio de cultivo, desenvolvimento de novas linhagens ou estratégias de cultivo, sendo que existem poucos estudos com enfoque nos aspectos técnico-econômicos de sua produção, sendo encontrado em nossa pesquisa apenas 3 (CERMINATI et al., 2021; FERREIRA et al., 2021; TORRES-ACOSTA et al., 2021).

Cada um desses trabalhos teve diferentes focos. O estudo de Ferreira et al. (2021) realizou uma análise técnico-econômica da produção de ácido hialurônico, porém não avaliou o impacto ambiental que a produção industrial de ácido hialurônico possui, o que é uma métrica relevante atualmente. Torres-Acosta et al. (2021) comparou a produção homóloga e heteróloga do biopolímero e mostrou oportunidades para futuras pesquisas, mas não mostrou indicadores econômicos clássicos, como o valor presente líquido ou taxa interna de retorno. Por fim, Cerminati et al. (2021) incorporou conceitos de Economia Circular à produção de ácido hialurônico, porém com uma análise técnico-econômica mais simplificada e não calculou o impacto ambiental.

Diante disto, o presente trabalho possui como objetivo preencher simultaneamente as lacunas que os três trabalhos não abordaram: realizar uma análise técnico-econômica de uma indústria de ácido hialurônico microbiano acoplado a uma biorrefinaria de etanol de primeira geração e avaliar o impacto ambiental que ela possui através da Análise de Ciclo de Vida.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Descrição do processo

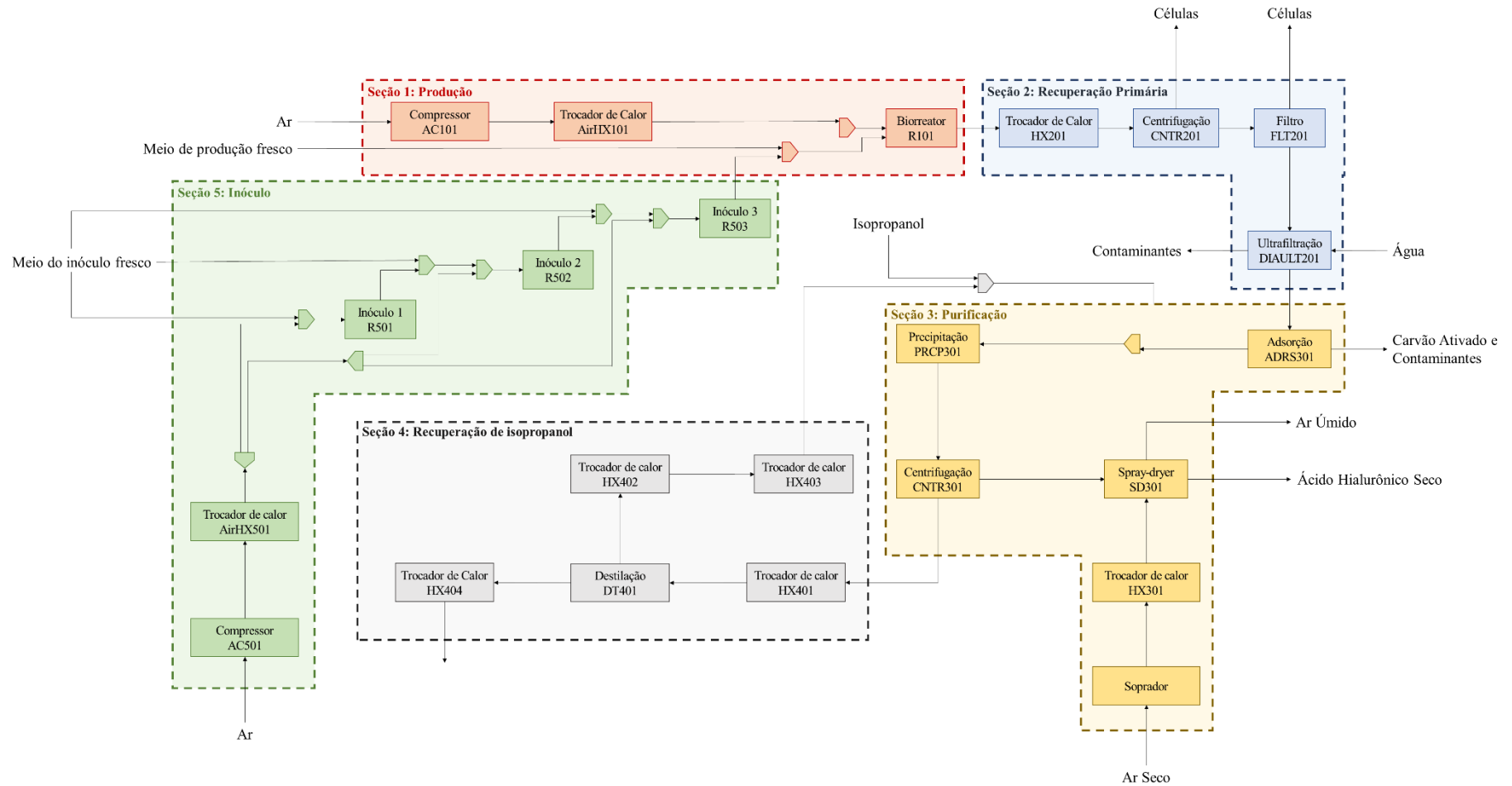
Este processo trata da avaliação técnico-econômica da produção de ácido hialurônico, integrada a uma biorrefinaria de etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. O fluxograma desta biorrefinaria foi descrito em detalhes por Longati et al. (2018). Supôs-se que sua capacidade de produção de AH anual seja de 20 t ano^{-1} , que é equivalente a aproximadamente 3% da demanda mundial (FERREIRA et al., 2021).

Por estar acoplado a uma biorrefinaria de etanol vários itens vieram da referida biorrefinaria, tais como o vapor utilizado em utilidades quentes a 1,5 bar, a energia

elétrica e a sacarose como caldo de cana não-concentrado. O custo de cada um desses produtos foi considerado como custo de oportunidade da biorrefinaria.

O fluxograma selecionado para este estudo de caso foi baseado na patente de Pagliuca, Ruggiero e Volpe (2015) com modificações. Ele é dividido em 6 seções: Inóculo, Produção, Recuperação Primária, Purificação, Recuperação de Solvente e Tratamento de Resíduos (Figura 5.1).

Figura 5.1. Representação simplificada do fluxograma adotado para a análise técnico-econômica-ambiental.



Fonte: Acervo pessoal.

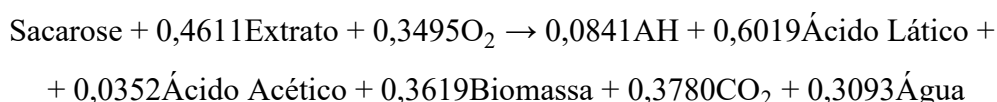
O microrganismo selecionado foi o *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24, escolha baseada nas fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, sacarose e extrato de levedura, respectivamente (LIU et al., 2009).

5.2.1.1 Inóculo e Produção

O inóculo consiste em um conjunto de 3 biorreatores em série. O meio reacional do inóculo e cultivo possuem diferentes composições. A esterilização dos meios de cultivo e do ar foi feita através de filtros. Ambos os cultivos foram realizados a 37 °C.

5.2.1.1.1 Estequiometria

A estequiometria do crescimento foi feita através do balanço elementar e dos rendimentos em C-mol de biomassa, ácidos láctico, acético e hialurônico (SHULER; KARGI, 2002), obtendo-se a equação a seguir:



Para o balanço elementar utilizou-se a fórmula mínima de cada composto, mostradas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Fórmulas mínimas e massa molecular dos compostos envolvidos na reação estequiométrica de crescimento celular de *S. zooepidemicus* WSH-24.

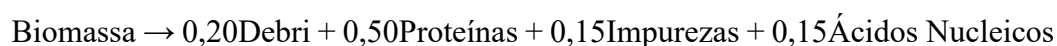
Composto	Fórmula mínima	Massa molecular (C-mol g ⁻¹)
Sacarose	CH _{1,8333} O _{0,9167}	28,5242
Extrato de levedura	CH _{1,71} O _{0,5} N _{0,17}	24,1147
Gás oxigênio	O ₂	31,9980
Ácido Hialurônico	CH _{1,5} O _{0,7857} N _{0,0714}	27,0936
Lactato	CH ₂ O	30,0254
Acetato	CH ₂ O	30,0254
Biomassa	CH _{1,666} O _{0,27} N _{0,2}	28,8108
Gás carbônico	CO ₂	44,0087
Água	H ₂ O	18,0147

Como o cultivo foi realizado em batelada, os coeficientes de rendimento (Y_{P/S}) foram obtidos através da regressão linear da equação a seguir (SHULER; KARGI, 2002):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (5.1)$$

em que ΔP a variação de concentração do produto P ao longo do tempo e ΔS a variação da concentração de substrato (sacarose) ao longo do cultivo. O mesmo procedimento foi feito para biomassa (X).

Para se avaliar a presença de contaminantes e morte celular, utilizou-se a seguinte reação estequiométrica, proposta por Ferreira et al. (2021):



Para a etapa de inóculo, supôs-se uma conversão de 68% de sacarose para garantir que o microrganismo ainda estivesse na fase exponencial do crescimento celular, o que garante a reprodutibilidade dos cultivos. Para a etapa de produção, a conversão de sacarose foi de 99% e a conversão de biomassa em contaminantes foi de 2%, referente a morte celular (FERREIRA et al., 2021).

5.2.1.2 Recuperação Primária

A Recuperação Primária inicia com o resfriamento do caldo de cultivo do biorreator R101 até 5 °C, pelo trocador de calor HX201, para interromper o crescimento celular, evitando lise celular e acúmulo de componentes intracelulares que podem contaminar o caldo.

Em seguida, remove-se a célula do caldo: primeiramente através de centrifugação (CNTR201) e depois por um filtro esterilizante de 0,22 μm (FLT201).

A próxima etapa é remoção dos principais contaminantes (proteínas e ácidos nucleicos) através de filtração tangencial em modo diafiltração com uma membrana de ultrafiltração com corte de massa molecular de 100 kDa. Adiciona-se 8 diavolumes⁴ de água nesta etapa.

⁴ Diavolume é uma grandeza adimensional obtida através da razão entre o volume consumido de solvente ou tampão e o volume inicial que foi diafiltrado.

5.2.1.3 Purificação

A purificação inicia com o permeado passando por uma coluna de adsorção (ADSR301) com carvão ativado para remoção dos contaminantes que não foram retidos na ultrafiltração (proteínas, ácidos nucleicos, debris celular, sacarose, sais e ácidos láctico e acético).

Após esta etapa de adsorção, leva-se a corrente livre de contaminantes para a precipitação (PRCP301), onde se adiciona isopropanol. O ácido hialurônico precipitado é separado do líquido através de centrifugação (CNTR301).

Finalmente, a etapa de purificação é encerrada com a secagem do precipitado em *spray-dryer* (SD301) até atingir a umidade de 99,4% (m/m).

5.2.1.4 Recuperação de Solvente

A recuperação do solvente isopropanol é feita através de destilação (DT401). Esta é a única etapa que opera em regime contínuo. A corrente de alimentação da destilação é composta por água (36,7% m/m), isopropanol (62,6% m/m) e por outros contaminantes como proteínas e ácidos nucleicos (0,7% m/m). Para fins de simulação, decidiu-se ignorar o efeito que os contaminantes possuem na destilação, de forma que todos eles saem no fundo da coluna.

5.2.1.5 Tratamento de resíduos biológicos

Como *Streptococcus zooepidemicus* é uma bactéria patogênica para animais, é preciso inativar a caldo de cultivo. A forma escolhida para esta inativação foi através de calor. Portanto, as tortas da centrífuga CNTR201 e filtro FLT201 passam por um trocador de calor (HX202) atingindo 121 °C com área de troca térmica suficiente para que o fluido mantenha tempo de residência de 15 min.

Por fim, para evitar poluição térmica de águas, o caldo inativado é resfriado até 25 °C.

5.2.2 Simulação e avaliação técnico-econômica

Escolheu-se o software EMSO (*Environment for Modelling and Optimization*) para a simulação do processo. Para isso, contou-se com a biblioteca interna do grupo com modelos que compreendem os balanços de massa e energia de cada equipamento.

As métricas econômicas selecionadas foram o Valor Presente Líquido (VPL), o Preço Mínimo de Venda e a Taxa de Retorno do Investimento. As principais considerações feitas para a simulação do processo e avaliação técnico-econômica encontram-se na Tabela 5.2.

O Valor Presente Líquido foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$VPL = \sum_{i=0}^N \frac{FC_i}{(1+r)^i} - CAPEX \quad (5.2)$$

em que N é o número total de anos de produção da indústria, FC_i é o i -ésimo fluxo de caixa, r a Taxa Mínima de Atratividade e $CAPEX$ é o custo capital total.

O Preço Mínimo de Venda foi calculado a partir da Equação (5.2), considerando o Valor Presente Líquido igual a zero. Desta forma, o Preço Mínimo de Venda considera tanto os custos diretos como os indiretos.

O custo capital e operacional foi calculado de acordo com os dados de Harrison et al. (2015).

Tabela 5.2. Principais premissas utilizadas para a produção industrial de ácido hialurônico microbiana.

(continua)

Variável	Valor	Referência
Premissas de processo		
Tempo de esterilização	1 h	(POLLARD, 2011)
Tempo de carga	1 h	Assumido
Tempo de descarga	1 h	Assumido
Tempo de limpeza	2,33 h	(FERREIRA et al., 2021)
Tempo de cultivo (biorreator principal)	24 h	(LIU et al., 2009)
Tempo de cultivo (inóculo)	8 h	Assumido
Razão comprimento/diâmetro de vasos	3	(TURTON et al., 2012)
Vazão de ar específica	0,5 vvm	(LIU et al., 2009)
Conversão de sacarose (biorreator principal)	99%	Assumido
Conversão de sacarose (inóculo)	68% ⁵	Assumido
Fator de aumento do inóculo	10 x	(FERREIRA et al., 2021)
Fluxo de filtração	400 L m ⁻² h ⁻¹	(FERREIRA et al., 2021)
Diavolumes de água	8	(FERREIRA et al., 2021)
Coefficiente de rejeição da membrana de AH	0,995	(FERREIRA et al., 2021)
Coefficiente de rejeição da membrana de proteínas	0,800	(FERREIRA et al., 2021)
Coefficiente de rejeição da membrana de ácidos nucleicos	0,995	(FERREIRA et al., 2021)
Eficiência de bombas	0,99	(TURTON et al., 2012)
Umidade da torta	50%	Assumido
Tempo de adsorção	20 h	(FERREIRA et al., 2021)
Tempo de precipitação	5 h	(FERREIRA et al., 2021)
Recuperação de ácido hialurônico na precipitação	72%	(CAVALCANTI; SANTANA, 2019)
Razão volumétrica isopropanol:caldo	1:2	(CAVALCANTI; SANTANA, 2019)
Tamanho do AH precipitado	1365 nm	(CAVALCANTI; SANTANA, 2019)

⁵ Valor assumido para garantir que o inóculo esteja no meio da fase exponencial do crescimento celular

Tabela 5.2. Principais premissas utilizadas para a produção industrial de ácido hialurônico microbiana.

(continua)

Variável	Valor	Referência
Viscosidade da solução de AH	2 cP	(KIM et al., 2018)
Eficiência do soprador	90%	(TURTON et al., 2012)
Fração evaporada de água	99,62%	(FERREIRA et al., 2021)
Fração evaporada de isopropanol	99,62%	(FERREIRA et al., 2021)
Temperatura de entrada do ar seco no <i>spray-dryer</i>	180 °C	(FERREIRA et al., 2021)
Temperatura de saída do ar do <i>spray-dryer</i>	85 °C	(FERREIRA et al., 2021)
Temperatura de saída do ácido hialurônico seco do <i>spray-dryer</i>	60 °C	(FERREIRA et al., 2021)
Tempo de residência do ar no <i>spray-dryer</i>	5 min	Assumido
Premissas de Fluxo de Caixa		
Tempo de operação anual	240 dias	(ELIAS et al., 2021)
Taxa mínima de retorno	6,90%	(ELIAS et al., 2022)
Preço Unitário de Venda	1300 US\$ kg ⁻¹	Assumido
Impostos	34%	Assumido
Tempo de depreciação	10 anos	Assumido
Tempo de operação da planta	25 anos	Assumido
Tempo de inicialização da planta	2 anos	Assumido
Taxa de câmbio do dólar americano (média dos últimos 5 anos)	4,5738 R\$ US\$ ⁻¹	(BRASIL, 2022a)
Premissas Econômicas		
Salário mensal de trabalhadores da planta	R\$ 2676,28	(BRASIL, 2022b)
Encargos trabalhistas	39,37% a.m.	
Taxa de contingência	10%	(HARRISON et al., 2015)
Custo com terreno	1,5% dos custos diretos fixos	(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2002)
Capital de giro	1,5% dos custos diretos fixos	(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2002)
Custo de manutenção	6% dos custos diretos fixos	(TURTON et al., 2012)
Custo de suprimentos de operação	10% dos custos salariais	(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2002)
Custos de laboratório	15% dos custos totais trabalhistas	(TURTON et al., 2012)
Custo de patente	3% do custo total do produto	(TURTON et al., 2012)

Tabela 5.2. Principais premissas utilizadas para a produção industrial de ácido hialurônico microbiana.

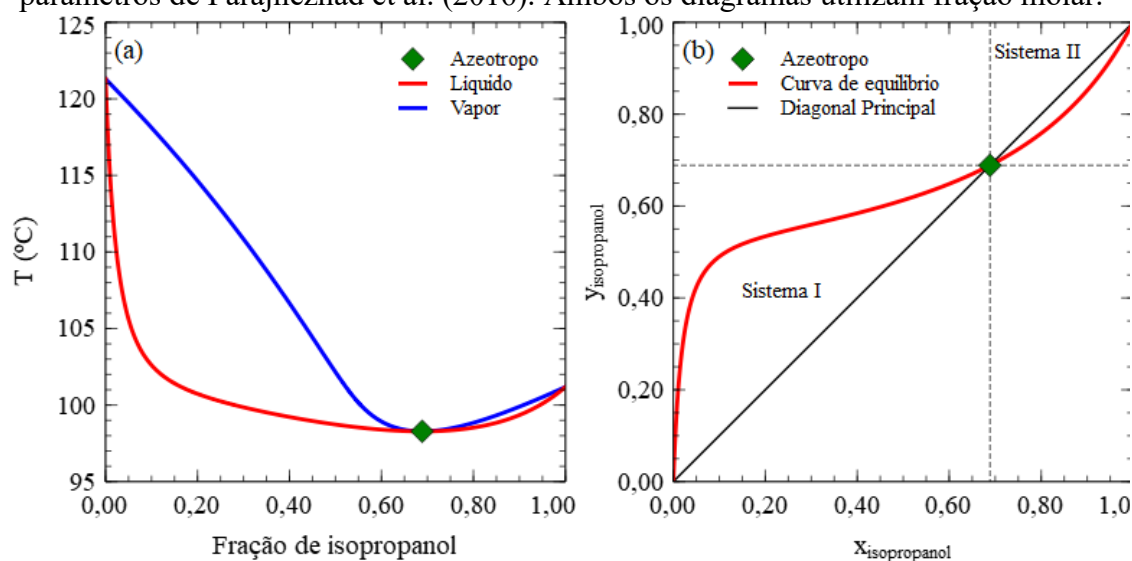
(conclusão)

Variável	Valor	Referência
Custo de pesquisa, desenvolvimento e marketing	0	Assumido
Custo de água de resfriamento a 5 °C	5,43 US\$ GJ ⁻¹	(TURTON et al., 2012)
Custo de fluido refrigerante a -20 °C	7,89 US\$ GJ ⁻¹	(TURTON et al., 2012)
Custo de utilidade quente	0,00865557 US\$ kWh ⁻¹	Calculado
Custo de energia elétrica	87,87 US\$ kWh	Calculado
CEPCI 2005	468,2	
CEPCI 2012	584,6	
CEPCI 2021	708,0	
Custos de matérias-primas		
Sacarose	0,365447 US\$ kg ⁻¹	Calculado
Extrato de Levedura	2,95 US\$ kg ⁻¹	(FERREIRA et al., 2021)
Sulfato de potássio	2,02463 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Sulfato de magnésio	0,89918 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Fosfato de dissódio	2,0684 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Sulfato de ferro II	1,04962 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Sulfato de manganês	4,78035 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Fosfato de monopotássio	4,76832 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Carbonato de cálcio	0,30250 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Cloreto de cálcio	3,71429 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Cloreto de zinco	1,83119 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Sulfato de cobre	2,54134 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Hidróxido de sódio	0,97128 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Isopropanol	1,55782 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022c)
Carvão ativado	1,55232 US\$ kg ⁻¹	Fabricante local
Água	0,01093 US\$ kg ⁻¹	
Ácido sulfúrico	1,71153 US\$ kg ⁻¹	(BRASIL, 2022b)

5.2.2.1 Dimensionamento da coluna de destilação

O sistema água-isopropanol forma um azeótropo (Figura 5.2), cuja composição varia pouco com aumento da pressão, indicando que não se trata de uma mistura ideal. Portanto, não é possível utilizar o método de Fenke-Underwood-Gilliland (FUG) para dimensionar uma coluna de destilação para purificar o isopropanol, uma vez que a equação de Fenske assume que a mistura é ideal.

Figura 5.2. Diagramas (a) T-x-y e (b) de composição do equilíbrio líquido-vapor para mistura isopropanol-água a 2,04 atm usando o modelo de Wilson de acordo com os parâmetros de Farajnezhad et al. (2016). Ambos os diagramas utilizam fração molar.



Fonte: Acervo pessoal.

No entanto, é possível considerar o azeótropo como um pseudo-componente, permitindo dividir o sistema binário isopropanol-água em dois novos sistemas: um sistema composto por isopropanol e azeótropo (sistema I) e outro composto por azeótropo e água (sistema II). Estes novos sistemas são considerados misturas ideais (Figura 5.2b), permitindo aplicar o método FUG para dimensionar a coluna (VOGELPOHL, 2002).

Para obter as frações de cada componente realizou-se a seguinte transformação linear (LIU et al., 2004):

$$\begin{bmatrix} Z_{\text{isopropanol}} \\ Z_{\text{água}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Z_{\text{azeótropo}} & 1 & 0 \\ 1-Z_{\text{azeótropo}} & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_{\text{azeótropo}} \\ S_{\text{isopropanol}} \\ S_{\text{água}} \end{bmatrix} \quad (5.1)$$

sendo z_i a fração do i -ésimo componente no sistema real e s_i a fração do i -ésimo componente no sistema transformado.

Como a fração de isopropanol na alimentação é menor que a fração de isopropanol no ponto de azeotropia, a destilação ocorre no sistema I (Figura 5.2b). Portanto, a fração de isopropanol no sistema transformado é igual a zero, o que permite que a Equação (5.1) seja resolvida.

O dimensionamento da coluna de destilação foi feito através do método de Fenske-Underwood-Gilliland. O número mínimo de estágios de equilíbrio (N_{\min}) foi obtido através da seguinte equação:

$$N_{\min} = \frac{\log[(x_i^D/x_j^D)(x_j^F/x_i^F)]}{\log \alpha_m} \quad (5.2)$$

em que x^D é a composição molar da fase líquida do destilado, x^F é a composição molar da fase líquida do produto de fundo, i é a chave leve, j é a chave pesada e α_m é a média geométrica das volatidades relativas da chave leve em relação a chave pesada calculadas no topo e no fundo da coluna (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).

Para cálculo da razão mínima de refluxo (R_{\min}), utilizou-se a equação de Underwood para separações de classe I⁶, mostrada a seguir:

$$R_{\min} = \frac{\left(\frac{x_i^D}{x_i^F}\right) - \alpha_m \left(\frac{x_j^D}{x_j^F}\right)}{\alpha_m - 1} \quad (5.3)$$

em que x^F é a composição da corrente de alimentação.

Para o cálculo do número real de estágios de equilíbrio teóricos (N) e da razão de refluxo, usou-se a correlação de Gilliland, disposta a seguir.

$$Y = 1 - \exp \left[\left(\frac{1 + 54,4X}{11 + 117,2X} \right) \left(\frac{X - 1}{X^{0,5}} \right) \right] \quad (5.4)$$

$$Y = \frac{N - N_{\min}}{N + 1} \quad (5.5)$$

$$X = \frac{R - R_{\min}}{R + 1} \quad (5.6)$$

⁶ Considera-se uma separação de classe I aquelas em que todos os componentes da alimentação estão presentes no destilado e no produto de fundo (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011).

Usou-se a seguinte relação para cálculo da razão de refluxo (R) (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011):

$$R = 1,28R_{\min} \quad (5.7)$$

5.2.2.2 Custos dos equipamentos

Os custos dos equipamentos foram estimados através do método do CAPCOST (TURTON et al., 2012). Considerou-se a unidade de produção de ácido hialurônico como uma extensão da biorrefinaria.

No método CAPCOST, não existem dados para os custos de equipamentos de ultrafiltração, centrífuga e *spray-dryer*, por isso buscou-se fontes alternativas para calculá-los.

5.2.2.2.1 Ultrafiltração em modo diafiltração

Para estimar o custo da unidade de ultrafiltração, utilizou-se de dados gráficos de custos fornecidos por Harrison et al. (2015). Estes dados foram colhidos através do *software* PegaPonto. Em posse destes dados, ajustou-se um polinômio de primeiro grau no formato $\log_{10} C_P = f(\log_{10} A)$ por regressão linear, obtendo-se a Equação (5.3).

$$\log_{10} C_P = 5,0374 + 0,1861 \log_{10} A \quad (5.3)$$

em que C_P (US\$) é o custo do equipamento e A (m²) é a área de filtração do sistema de ultrafiltração. A Equação (5.3) é referente a dados do ano de 2012.

Para determinar a relação entre a fração no retentado e o coeficiente de rejeição da membrana do componente i usou-se a seguinte relação da Equação (5.4) (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011):

$$x^R(i) = \exp(-DV(1 - \sigma_i)) \quad (5.4)$$

em que $x^R(i)$ é a fração mássica do i -ésimo componente no retentado, DV é o número de diavolumes e σ_i é o coeficiente de rejeição da membrana para o i -ésimo componente.

5.2.2.2.2 Centrífuga

O custo da centrífuga foi calculado da mesma forma que a do ultrafiltração descrito anteriormente. Obteve-se a Equação (5.5) a seguir.

$$\log_{10} C_P = 3,2778 + 0,4172 \log_{10} \Sigma \quad (5.5)$$

sendo Σ (m^2) é o fator sigma intrínseco de centrífugas. A Equação (5.5) também é referente a dados do ano de 2012.

O fator sigma foi calculado a partir das Equações(5.6) e (5.7) (HARRISON et al., 2015).

$$Q_{\text{centrífuga}} = v_s \Sigma \quad (5.6)$$

$$v_s = 2a^2 \frac{(\rho - \rho_b)g}{9\mu} \quad (5.7)$$

em que $Q_{\text{centrífuga}}$ ($m^3 h^{-1}$) é a vazão volumétrica de entrada da centrífuga, v_s ($m s^{-1}$) é a velocidade de sedimentação, a (m) é o raio de sedimentação, ρ ($kg m^{-3}$) é a massa específica da partícula a ser precipitada, ρ_b ($kg m^{-3}$) é a massa específica do meio, g ($m s^{-2}$) é a constante de aceleração da gravidade e μ ($kg m^{-1} s^{-1}$) é a viscosidade dinâmica do meio.

5.2.2.2.3 Spray-dryer

No caso do *spray-dryer*, utilizou-se a Equação (5.8) a seguir, definida por Kudra (2015):

$$C_P = (MS) 47 V^{0,52} \quad (5.8)$$

em que C_P (US\$) é o custo do *spray-dryer*, MS é o índice Marshall & Swift do ano de análise e V (m^3) o volume do secador, que foi obtido a partir da seguinte relação (HECHT et al., 2019):

$$V = \frac{\dot{m}_G \tau}{\rho_G^{\text{out}}} \quad (5.9)$$

sendo \dot{m}_G ($kg min^{-1}$) a vazão mássica de ar seco, τ (min^{-1}) o tempo de residência do gás no secador e $\rho_G^{\text{saída}}$ ($kg m^{-3}$) a massa específica do gás úmido.

5.2.2.3 Cálculo do volume e potência de agitação do biorreator

Um parâmetro a ser considerado no cálculo do volume de um biorreator de cultivos submersos aerados é o *hold-up*, que é a “expansão” do líquido devido a agitação e aeração do vaso. Como este é um dado puramente experimental, é preciso recorrer a correlações para este cálculo. Utilizou-se a correlação de Pinelli, Nocentini e Magelli (1994) apud Gogate, Beenackers e Pandit (2000), mostrada na Equação (5.10) a seguir:

$$\varepsilon = 0,278 \left(\frac{P_G}{V_L} \right)^{0,217} (v)^{0,662} \quad (5.10)$$

sendo ε o *hold-up*, P_G (W) a potência aerada, V_L (m³) o volume de líquido do biorreator e v (m/s) a velocidade de escoamento superficial do gás.

O cálculo da potência aerada foi feito através das Equações (5.11), (5.12) e (5.13) (CARDOSO et al., 2020), conforme metodologia descrita em Cardoso et al. (2020):

$$\frac{P_G}{P_{NG}} = \begin{cases} 1 - 12,2 \frac{Q_G}{ND_i^3}, \text{ se } \frac{Q_G}{ND_i^3} < 0,037 \\ 0,62 - 1,85 \frac{Q_G}{ND_i^3}, \text{ se } \frac{Q_G}{ND_i^3} > 0,037 \end{cases} \quad (5.11)$$

$$P = 3f_c P_o \rho_b N^3 D_i^5 \quad (5.12)$$

$$f_c = \sqrt{\frac{(D_R/D_i)(H_L/D_i)}{(D_R/D_i)(H_L/D_i)}} \quad (5.13)$$

em que P_{NG} (W) é a potência não-aerada, Q_G (m³/s) a vazão volumétrica de ar que circula o biorreator, N (s⁻¹) a velocidade de agitação do impelidor, D_i (m) o diâmetro do turbina do impelidor, f_c o fator de correção geométrico, P_o o número de potência para um impelidor do tipo Rushton com 3 pás em regime turbulento (5,2), ρ_b (kg m⁻³) a massa específica do caldo de cultivo, D_R (m) o diâmetro do biorreator e H_L (m) a altura da coluna de líquido sem agitação e aeração. O sobrescrito “^” denota valores para geometrias padrão.

5.2.3 Análise de Ciclo de Vida

Para avaliar os impactos ambientais, utilizou-se o método da Análise do Ciclo de Vida, através da abordagem portão-a-portão. A unidade funcional selecionada foi de 1 kg de ácido hialurônico, uma vez que ele é o produto de interesse.

Utilizou-se o *software* SimaPro 9.0 com a base de dados Ecoinvent 3.0 (WERNET et al., 2016) para o conjunto de dados para as principais entradas, exceto para o fosfato de monopotássio e cloreto de zinco, em que se utilizou os dados de Sinka et al. (2018) e Heidari et al. (2019), respectivamente. Desconsiderou-se o impacto ambiental da infraestrutura por conta da longa vida útil da unidade industrial.

O impacto da análise de ciclo de vida foi feito através do método CML-IA baseline V3.04 (World 2000). As categorias de impacto selecionadas foram Esgotamento Abiótico (AD, do inglês *Abiotic Depletion*), Potencial de Aquecimento Global para o horizonte de 100 anos (GWP100, do inglês *Global Warming Potential over 100 years*), Potencial de Esgotamento da Camada de Ozônio (ODP, do inglês *Ozone Depletion Potential*), Toxicidade Humana (HT, do inglês *Human Toxicity*), Ecotoxicidade Aquática de Água Doce (FWAET, do inglês *Freshwater Aquatic Ecotoxicity*), Ecotoxicidade Aquática Marinha (MAET, do inglês *Marine Aquatic Ecotoxicity*), Ecotoxicidade Terrestre (TET, do inglês *Terrestrial Ecotoxicity*), Oxidação Fotoquímica (PO, do inglês *Photochemical Oxidation*), Acidificação (AC, do inglês *Acidification*) e Eutrofização (EU, do inglês *Eutrophication*).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Aspectos de processo

Para planejar um processo industrial, é necessário conhecer as suas demandas de matérias-primas. No caso do ácido hialurônico aqui estudado, a matéria-prima que é mais consumida é a água com 19,4 t/ano/kg_{AH}, enquanto os sais da solução de traços (CaCl₂, ZnCl₂ e CuSO₄) são os que são menos consumidos (Tabela 5.3). Destaca-se que a diferença no consumo de matérias-primas na seção de Produção e Inóculo se dá porque utilizam-se meios com diferentes composições em cada seção.

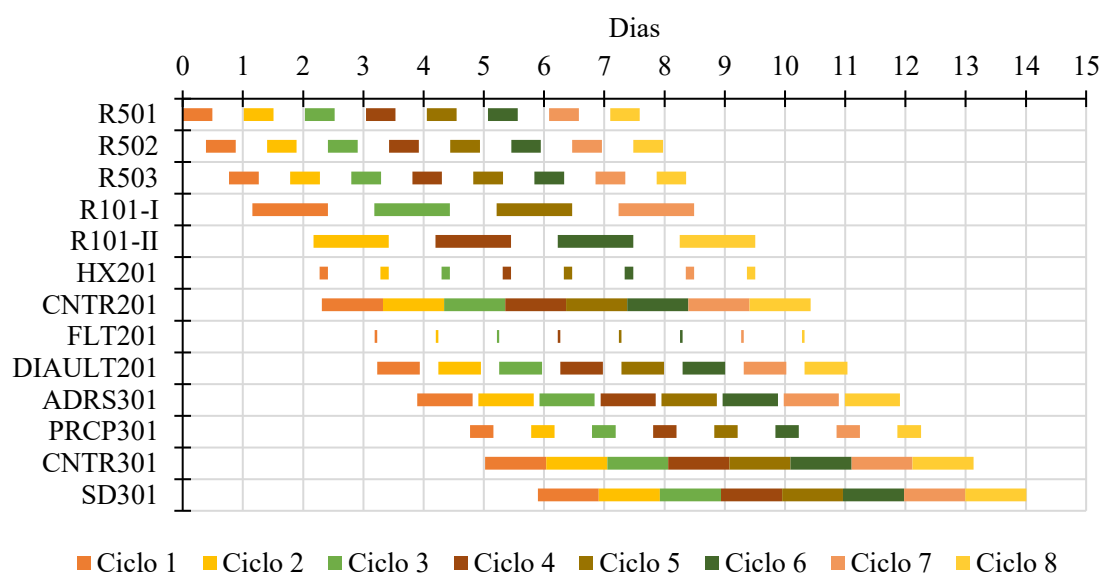
Tabela 5.3. Entradas de matérias-primas, energia elétrica e vapor de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.

Entradas	Unidade	Seção					Total
		Produção	Recuperação Primária	Purificação	Recuperação do Solvente	Inóculo	
Sacarose	kg/kg _{AH}	45,76	0	0	0	1,70	47,46
Extrato de Levedura	kg/kg _{AH}	16,34	0	0	0	1,70	18,04
K ₂ SO ₄	kg/kg _{AH}	1,37	0	0	0	3,45E-22	1,37
MgSO ₄	kg/kg _{AH}	2,11	0	0	0	0,23	2,34
Na ₂ HPO ₄	kg/kg _{AH}	6,53	0	0	0	0	6,53
FeSO ₄	kg/kg _{AH}	0,005	0	0	0	0	0,005
MnSO ₄	kg/kg _{AH}	0	0	0	0	0,012	0,012
KH ₂ PO ₄	kg/kg _{AH}	0	0	0	0	0,23	0,23
CaCO ₃	kg/kg _{AH}	0	0	0	0	0,23	0,23
CaCl ₂	kg/kg _{AH}	0,001	0	0	0	0,000 ^a	0,002
ZnCl ₂	kg/kg _{AH}	0,000 ^a	0	0	0	0,000 ^a	0,000 ^a
CuSO ₄	kg/kg _{AH}	0,000 ^a	0	0	0	0,000 ^a	0,000 ^a
Isopropanol	kg/kg _{AH}	0	0	0	14,54	0	14,54
Base	kg/kg _{AH}	50,74	0	107,38	0	4,72	162,85
Carvão Ativado	kg/kg _{AH}	0	0	0,34	0	0	0,34
Água	kg/kg _{AH}	19460,10	9643,75	71,59	0	1880,65	31056,09
Ar	kg/kg _{AH}	1121,16	0	535,80	0	124,45	1781,40
H ₂ SO ₄	kg/kg _{AH}	15,09	0	34,81	0	1,50	51,40
Energia Elétrica	kJ/kg _{AH}	1015230,00	234204,50	8077,50	737,30	22212,15	1280461,45

^a menor do que 0,0001 kg/kg_{AH}

O gráfico de ocupação de equipamentos (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**) mostra que com dois biorreatores operando em modo escalonado é possível otimizar a ocupação individual dos equipamentos, de forma que ocorrem 230 ciclos em um ano operacional. Caso não se opere em modo escalado, apenas 189 ciclos são possíveis.

Figura 5.3. Gráfico de ocupação de equipamentos para a produção de ácido hialurônico. As barras indicam o tempo total de operação do equipamento, incluindo tempos de carga, descarga, operação, limpeza e esterilização, quando necessário.



LEGENDA:			
R: biorreator	HX: trocador de calor	FLT: filtro	CNTR: centrífuga
DIAULT: ultrafiltração em diafiltração	ADRS: torre de adsorção	PRCP: precipitador	SD: <i>spray-dryer</i>

Fonte: Acervo pessoal.

5.3.1.1 Destilação e dimensionamentos

A partir desta modificação, foi possível utilizar o método de FUG, obtendo-se 11 pratos teóricos (Tabela 5.4) e uma razão de refluxo de 0,61. Ferreira et al. (2021) obtiveram 10 pratos teóricos e uma razão de 1,50 ao realizar uma simulação rigorosa de uma torre de destilação sob condições semelhantes. Esta ocorrência mostra que o método de Fenske-Underwood-Gilliland conseguiu calcular com eficiência o número de pratos, falhando apenas no cálculo de razão de refluxo. Usando a razão de refluxo de Ferreira et al. (2021) obtém-se 13 pratos teóricos. Destaca-se que Seader, Henley e Roper (2011) reportam que a separação de isopropanol e água requer 12 pratos no ambiente industrial.

Tabela 5.4. Resumo dos parâmetros de dimensionamentos de todos os equipamentos utilizados na indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.

Equipamento	Tipo de Equipamento	Parâmetro de Dimensionamento	Valor	Unidade
AC101	Compressor de ar	Potência	134,60	kW
AirHX101	Resfriador de ar	Área	17,75	m ²
AirFilter	Filtro de Ar Esterilizante	Área	0,59	m ²
SterileFilter	Filtro Esterilizante	Área	7,12	m ²
R101	Biorreator	Volume	136,86	m ³
HX201	Resfriador	Área	9,98	m ²
CNTR201	Centrífuga	Sigma	9241,18	m ²
FLT201	Filtro	Área	18,88	m ²
PMP201	Bomba	Potência de Eixo	295,28	kW
DIAULT201	Diafiltração	Área	0,37	m ²
ADRS301	Coluna de adsorção	Volume	14,81	m ³
PRCP301	Precipitador	Volume	15,72	m ³
CNTR301	Centrífuga	Sigma	284,91	m ²
Soprador	-	Vazão	2052,45	m ³ /h
Motor do Soprador	-	Potência	10,14	kW
HX301	Aquecedor de ar	Área	15,28	m ²
SD301	<i>Spray-dryer</i>	Volume	211,47	m ³
HX401	Aquecedor	Área	13,62	m ²
DT401 - pratos	Pratos da coluna de destilação	Quantidade	11	-
DT401 - torre	Coluna de destilação	Volume	0,98	m ³
HX402	Aquecedor	Área	8,20	m ²
HX403	Resfriador	Área	2,43	m ²
HX404	Resfriador	Área	5,95	m ²
PMP401	Bomba	Potência de Eixo	0,17	kW
AC501	Compressor de ar	Potência	14,94	kW
AirHX501	Resfriador de ar	Área	1,97	m ²
SeedAirFilter	Filtro de ar esterilizante	Área	0,59	m ²
SeedSterileFilter	Filtro esterilizante	Área	2,99	m ²
R501	Biorreator	Volume	0,12	m ³
R502	Biorreator	Volume	1,22	m ³
R503	Biorreator	Volume	12,23	m ³
HX202	Aquecedor	Área	36,94	m ²
HX203	Aquecedor	Área	34,46	m ²

Dentre os parâmetros de dimensionamento, o volume do biorreator destaca-se dos demais ao atingir o valor de 136,86 m³, visto que se reporta biorreatores de 35 m³ para a produção de ácido hialurônico microbiano (FERREIRA et al., 2021). Esta diferença atribui-se ao menor tempo de operação anual por se limitar à safra da cana-de-açúcar, menor recuperação de ácido hialurônico e menor rendimento específico em ácido hialurônico por massa de celular.

5.3.2 Aspectos econômicos

O investimento capital para implementar uma unidade industrial de produção de ácido hialurônico é de US\$ 42,31 milhões (Tabela 5.5), valor este que é 19% menor que o obtido por Ferreira et al. (2021) – US\$ 53,5 milhões. Um possível motivo para tal diferença pode ser o método utilizado para o custo dos equipamentos: este trabalho utiliza o método do CAPCOST e Ferreira et al. (2021) utilizaram a biblioteca interna do SuperPro, que é baseada em dados de fabricantes.

Tabela 5.5. Resumo dos indicadores econômicos utilizados para analisar uma indústria de produção de ácido hialurônico microbiano: investimento capital, valor presente líquido, custo unitário de produção, preço mínimo de venda, retorno sobre o investimento e tempo de retorno do investimento.

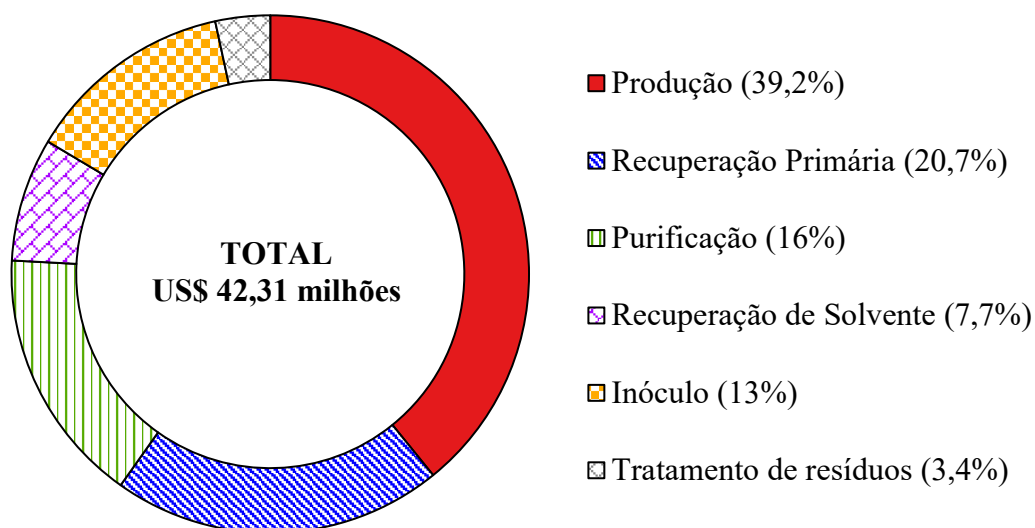
Critério	Valor
Investimento capital (milhões US\$)	42,31
Valor Presente Líquido (milhões US\$)	18,43
Custo de Produção Unitário (US\$/kg)	932,96
Preço Mínimo de Venda (\$/kg)	1168,35
Retorno sobre o Investimento (%)	12,50
Tempo de Retorno do Investimento (anos)	1,63

O Valor Presente Líquido mostra que a produção de ácido hialurônico pelo processo aqui selecionado é viável economicamente (Tabela 5.5). No entanto, ainda é aproximadamente 3 vezes menor que o encontrado de Ferreira et al. (2021). Atribui-se tal divergência entre os valores presentes líquido ao preço de venda do produto por quilograma, visto que os autores utilizaram US\$ 2000,00. Precisa-se destacar que este valor pode ser considerado desatualizado visto que é baseado em dados de 2005 (CHONG et al., 2005). Além disso, fornecedores brasileiros indicaram que hoje compra-se 1 kg de ácido hialurônico bruto por US\$ 1300, aproximadamente.

O Preço Mínimo de Venda mostra que o lucro na venda do ácido hialurônico é de 11,2%, em relação ao preço de venda, que pode ser considerado alto. Destaca-se que indústrias farmacêuticas tipicamente possuem margem de lucro maior que as demais (LEDLEY et al., 2020), visto que seus produtos são tipicamente de alto valor agregado.

O fluxo de caixa (Figura 5.4) mostra que, a partir do quarto ano de operação, o fluxo de caixa é positivo, de forma de já é esperado que se inicie o lucro do investimento. De fato, esta informação faz sentido, visto que o tempo de retorno do investimento é de 1,63 anos (Tabela 5.5).

Figura 5.5. Distribuição dos custos capitais de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.

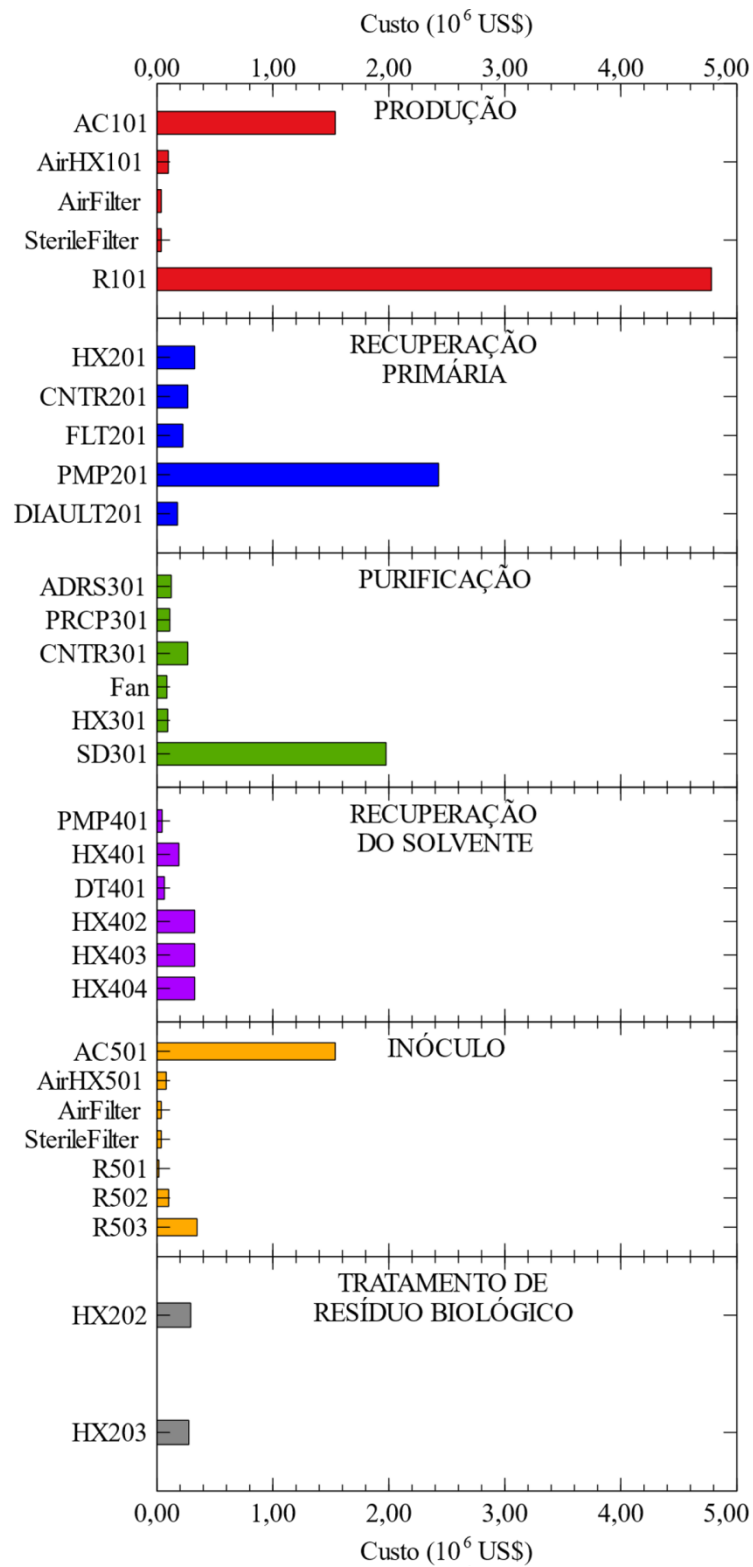


Fonte: Acervo pessoal

Os Custos Diretos Fixos representam a maioria do investimento capital (mais de 85%). Diante disto, é importante, analisar com mais profundidade os custos de compras dos equipamentos. Tal análise mostra que os maiores custos estão nos compressores AC101 e AC501, biorreator principal R101⁷, a bomba PMP201 e o *spray-dryer* SD301 (Figura 5.6). A bomba PMP201 faz parte do sistema de ultrafiltração e lida com um volume alto de líquidos por operar em modo diafiltração, que requer um alto volume de água adicionado.

⁷ Considerou-se o custo de aquisição de dois biorreatores de mesmo volume que operam de modo escalonado para aumentar a produção anual.

Figura 5.6. Custos dos equipamentos de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas separados por seções para o ano de 2021.

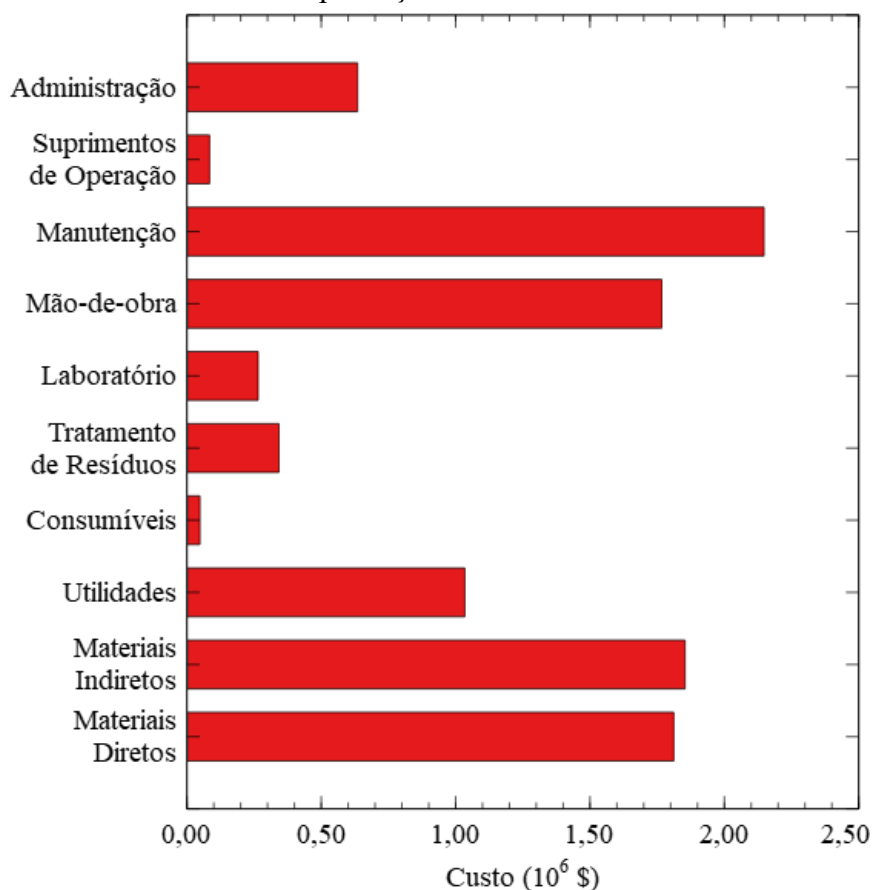


Fonte: Acervo pessoal

O alto custo do *spray-dryer* SD301 relaciona-se com o grande volume de água e isopropanol que deve ser evaporado (mais de 164 kg h^{-1}). Portanto, para reduzir este custo seria necessário concentrar ainda mais a corrente de ácido hialurônico. No entanto, soluções muito concentradas de ácido hialurônico são altamente viscosas, o que dificulta o transporte do fluido. Não foram encontrados trabalhos com alternativas a secagem, além da liofilização, o que também possui seus custos relacionados ao congelamento da corrente e sublimação da água.

Os custos operacionais são tão importantes quanto os capitais. Ao analisá-los, nota-se que a maior parte deles se concentram nos materiais diretos, manutenção, mão-de-obra e as utilidades (Figura 5.7). Vale destacar que os custos com utilidades podem ser reduzidos ao se realizar integração energética entre as correntes da seção de Recuperação de Solvente ou até mesmo com a usina de etanol.

Figura 5.7. Custos operacionais de uma indústria produtora de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas.

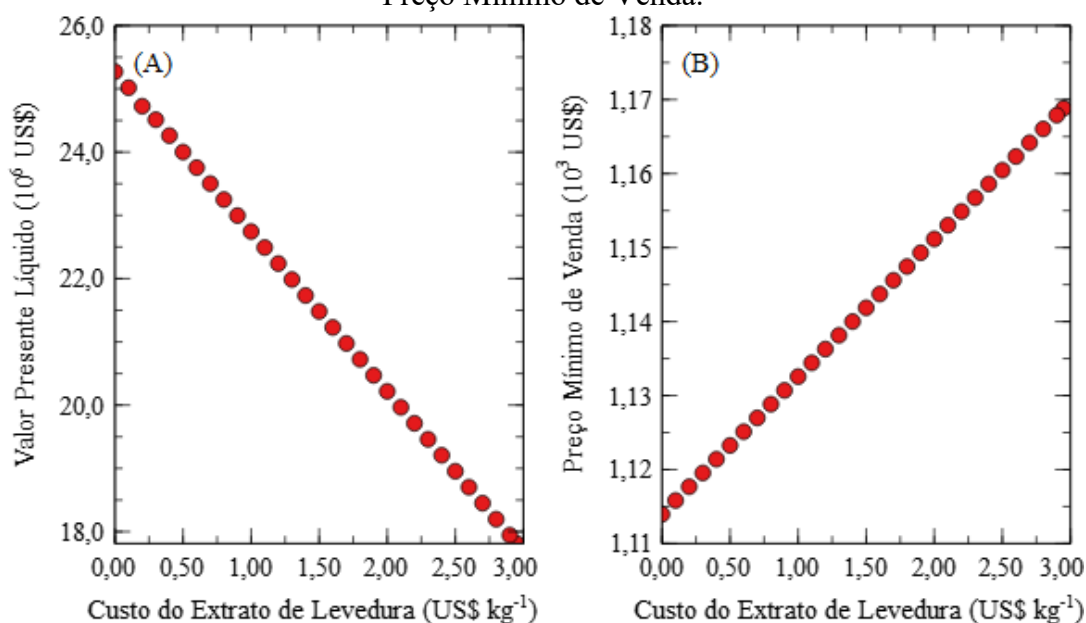


Fonte: Acervo pessoal

Como a indústria deste estudo de caso faz parte de uma biorrefinaria de bioetanol de cana-de-açúcar, é possível reduzir ainda mais os custos de materiais diretos ao se utilizar a levedura excedente da fermentação alcóolica para produzir extrato de levedura e ao se suprimir a adição de sais, visto que o caldo de cana-de-açúcar é rico em macro e micronutrientes (DE SOUZA et al., 2015).

Para a produção do extrato de levedura, é necessário adição de novas etapas no processo, como uma de lise celular, filtração, correção do pH e concentração do extrato (ALEXANDRE, 2011). Por conta disto, o custo total da adição de tais etapas não pode ultrapassar o preço de compra do quilograma do extrato de levedura (US\$ 2,95). Variando-se o custo do extrato de levedura entre o valor mínimo de zero e o máximo de US\$ 2,95, obtém-se que o VPL pode atingir o valor máximo de US\$ 25,27 milhões e o preço mínimo de venda de US\$ 1113,96, variações de 37,1% e 4,65%, respectivamente. Isso mostra que esta é uma etapa importante a ser considerada no futuro (Figura 5.8).

Figura 5.8. Efeito do custo do extrato de levedura no (a) Valor Presente Líquido e (b) Preço Mínimo de Venda.



Fonte: Acervo pessoal

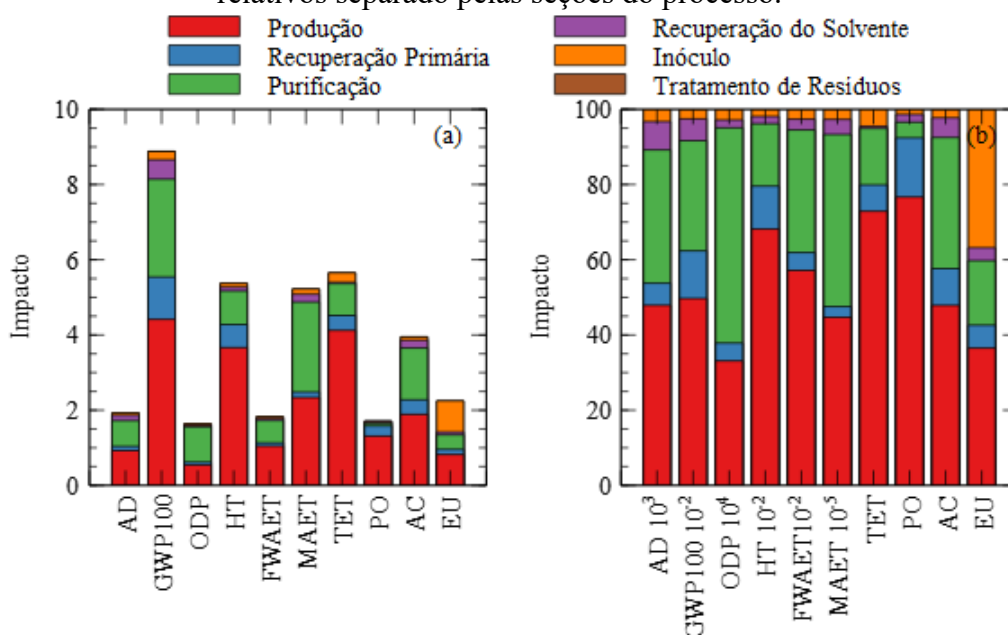
Agora, ao se suprimir a adição dos sais ao meio de cultivo, obtém-se um VPL de US\$ 20,56 milhões, o que representa um aumento de quase US\$ 2 milhões (11,6%). É importante ressaltar que para se remover tais sais do meio de cultivo e substituir o extrato de levedura comercial é necessário a condução de experimentos em biorreator para avaliar se a produção de ácido hialurônico é impactada.

É importante lembrar que a esterilização das correntes líquidas que entram nos biorreatores é feita através de filtração, por isso existe um gasto com consumíveis relacionados a troca dos cartuchos dos filtros. Este custo pode ser suprimido caso substitua-se por esterilização por calor. No entanto, seria necessária a instalação de, pelo menos, três aquecedores e três resfriadores, uma vez que não é possível misturar as correntes de sacarose (que possui um quantidade pequena de açúcares redutores), extrato de levedura e sais antes da esterilização, para evitar a formação de precipitados por reação de Maillard ou qualquer outra, prejudicando a troca de calor ou até mesmo interrompendo a operação da planta para a limpeza. Além disso, a adição de novos trocadores de calor resultaria no aumento do consumo de utilidades quentes e frias.

5.3.3 Aspectos ambientais

Ao se realizar a análise de ciclo de vida para o atual processo industrial de ácido hialurônico microbiano baseado no inventário da Tabela 5.3, nota-se que a etapa que possui maior impacto ambiental é a de Produção para todos os indicadores, exceto ODP (Potencial de Esgotamento de Ozônio), em que a seção de Purificação teve o maior impacto, e EU, em que o Inóculo teve um impacto tão grande quanto a Produção, conforme mostra a Figura 5.9.

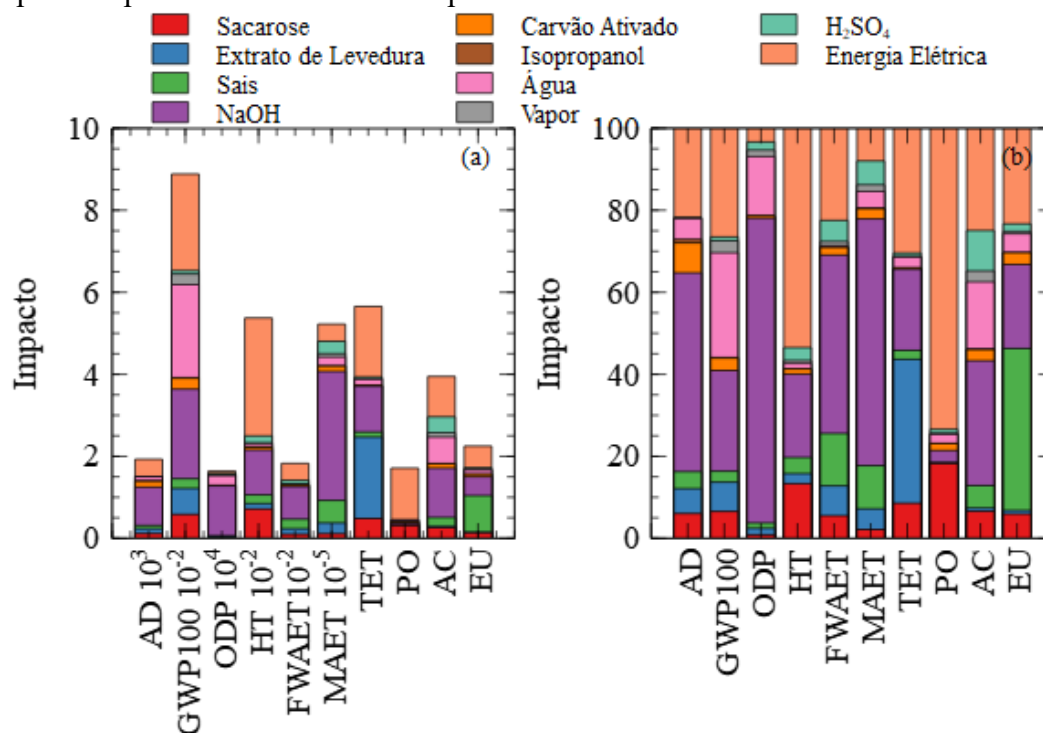
Figura 5.9. Avaliação do impacto ambiental de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas em valores (a) absolutos e (b) relativos separado pelas seções do processo.



Fonte: Acervo pessoal

Ao se analisar o efeito individual de cada entrada, nota-se que o hidróxido de sódio (NaOH) e a energia elétrica consumida possuem os impactos mais significativos (Figura 5.10). Tal ocorrência, de certa forma, faz sentido visto a grande quantidade consumida de energia elétrica, feita pelo uso de equipamentos com longos períodos de operação, como bombas, compressores de ar, motores de impelidores e soprador.

Figura 5.10. Avaliação do impacto ambiental de uma indústria de ácido hialurônico microbiano com produção anual de 20 toneladas em valores (a) absolutos e (b) relativos separados pelos fluxos de cada componente do inventário.



Fonte: Acervo pessoal

O consumo de hidróxido de sódio também é alto, visto que ele não é apenas usado para manutenção do pH, mas também em soluções de lavagem nos processos de limpeza CIP. Como o ácido hialurônico possui fins estéticos e/ou farmacêuticos, é preciso garantir que ele não esteja contaminado com microrganismos oportunistas e que possui altos graus de pureza, de forma que é muito difícil reduzir o consumo de hidróxido de sódio neste aspecto.

Para compreender o grande impacto que o hidróxido de sódio possui, é preciso entender sua produção industrial. Tipicamente, ele é obtido a partir de processos eletroquímicos com altas demandas energéticas. As principais tecnologias empregadas hoje são: o eletrodo de mercúrio, o de diafragma e o de membrana. Dentre estes três tipos de eletrodos dois deles utilizam substâncias nocivas: o de mercúrio e o de diafragma, que

usa amianto em sua fabricação. Apesar do número de fábricas que utiliza o mercúrio ter reduzido consideravelmente, a transição do eletrodo de diafragma para o de membrana ainda não foi completa, de forma que muitas unidades ainda operam com esta tecnologia. Além disso, também deve-se lembrar que a indústria do cloro-álcali – responsável pela produção do hidróxido de sódio – é uma notória poluidora (LAKSHMANAN; MURUGESAN, 2014).

Com relação ao controle de pH, encontra-se um impasse semelhante, visto que apenas não controlar o pH inviabiliza a produção de ácido hialurônico, em termos técnico-econômicos. Pode-se buscar outras bases para realizar o controle do pH, como o hidróxido de amônio, que pode aumentar a produção do biopolímero ao custo de reduzir sua massa molar (JAGANNATH; RAMACHANDRAN, 2010).

Uma alternativa é identificar uma condição do metabolismo de *S. zooepidemicus* em que a produção dos ácidos lácticos e acéticos seja menor sem prejudicar a formação do biopolímero, quer seja através de estratégias de Biologia Molecular ou de condições de cultivo. Além disso, não se deve descartar a busca de novas plataformas, quer sejam elas microrganismos recombinantes que não dependam da produção de ácidos para geração de energia ou através de processos enzimáticos.

Destaca-se também o impacto que os sais possuem no indicador de eutrofização (EU). Neste caso, a solução para mitigá-lo é mais simples. Conforme já dito anteriormente, é preciso verificar se realmente existe a necessidade de adição deles. Além disso, pode-se trocar a própria fonte de nitrogênio por outra rica em sais, como a água de maceração de milho, que é rica em aminoácidos, peptídeos e íons importantes para o crescimento celular. De fato, estudos mostram que água de maceração de milho é uma fonte de nitrogênio eficiente para a produção de ácido hialurônico (AMADO et al., 2017).

5.3.4 Impacto técnico-econômico de cultivos sem controle de pH

Como os resultados da Análise de Ciclo de Vida mostraram o alto impacto que a base possui, avaliou-se a viabilidade técnico-econômica de não se controlar o pH dos cultivos. Para isso, alterou-se a conversão de sacarose para 50%, baseado nos dados experimentais apresentados no capítulo anterior, e a recuperação de precipitação para 51% e raio de precipitação para 874 nm.

Com essas modificações o processo mostra-se inviável, uma vez que o Valor Presente Líquido é negativo, em consequência do alto Preço Mínimo de Venda (ou a baixa produção anual (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Principais indicadores econômicos (Valor Presente Anual, Preço Mínimo de Venda e CAPEX) caso não se controle o pH com produção anual de 7,56 e 20 t ano⁻¹;

Indicador Econômico	Produção Anual (t ano ⁻¹)	
	7,56	20
VPL (milhões US\$)	-129,54	-194,29
Preço Mínimo de Venda (US\$ kg ⁻¹)	3078,28	2330,36
CAPEX (milhões US\$)	41,70	83,50

Mesmo aumentando a produção anual para 20 t ano⁻¹, o processo sem controle de pH continua inviável, apesar do Preço Mínimo de Venda reduzir 24,3%. O motivo disto acontecer é que a fonte de carbono não é totalmente assimilada pelo microrganismo, de forma que o CAPEX para a produção de 20 t ano⁻¹ seja aproximadamente o dobro. Como a fonte de carbono não é totalmente assimilada, é preciso aumentar a entrada de sacarose. Com a maior entrada de sacarose, o volume dos equipamentos e os seus custos também aumentam.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que a produção microbiana de ácido hialurônico é viável, sendo inclusive uma boa alternativa para ser incorporada a uma biorrefinaria de etanol de primeira geração, em vista de seu alto Valor Presente Líquido e sua Taxa de Retorno do Investimento. Inclusive, tais vantagens podem aumentar ainda mais ao se utilizar a levedura excedente para produção de extrato de levedura, agregando maior valor a um resíduo que seria utilizado como ração ou fertilizante.

Como a indústria limita-se a operar apenas durante a safra da cana-de-açúcar, o tamanho dos equipamentos tem que ser maior do que se ela operasse durante o ano todo. Diante disto, uma forma de aumentar a produtividade, e abaixar os custos capitais, é a escolha de uma segunda fonte de carbono de origem vegetal a ser utilizada durante o período de entressafra da cana-de-açúcar ou, até mesmo, armazenar uma parte da produção de açúcar para ser posteriormente usada na produção de ácido hialurônico.

A Análise de Ciclo de Vida mostrou que a etapa com maior impacto é a da produção, destacando-se o consumo de base como sendo um dos maiores responsáveis pelo impacto ambiental. Numa tentativa de reduzir o impacto ambiental, estudou-se a viabilidade de não se controlar o pH durante o cultivo. Esta rota se mostrou inviável do ponto de vista econômico, no entanto também mostrou a importância de um sistema eficaz de controle de pH para este biopolímero.

5.5 REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, H. Autolysis of Yeasts. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). . **Comprehensive Biotechnology 2: Engineering Fundamentals of Biotechnology**. 2. ed. Burlington: Academic Press, 2011. p. 641–649.

AMADO, I. R. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.

ASARI, A. Medical Application of Hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 457–473.

BADRI, A.; RAMAN, K.; JAYARAMAN, G. Uncovering Novel Pathways for Enhancing Hyaluronan Synthesis in Recombinant *Lactococcus lactis*: Genome-Scale Metabolic Modeling and Experimental Validation. **Processes**, v. 7, n. 6, p. 343, 2019.

BALAZS, E. A. **Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof**. Estados Unidos, 1979. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4141973.html>>

BRASIL. **Taxa de câmbio - Livre - Dólar americano (venda) - diário**. Brasília: [s.n.]. 2022a.

BRASIL. **Anuário Estatístico da RAIS**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://bi.mte.gov.br/bgcaged/caged_anuario_rais/anuario.htm>. 2022b.

BRASIL. **Exportação e Importação Geral**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/67999>>. 2022c.

CARDOSO, V. M. et al. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21(DE3). **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00441, 2020.

CAVALCANTI, A. D. D.; SANTANA, M. H. A. Structural and surface properties control the recovery and purity of bio- hyaluronic acid upon precipitation with isopropyl alcohol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 573, p. 112–118, 2019.

CERMINATI, S. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3075–3086, 2021.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.

DE SOUZA, R. B. et al. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2015.

DEANGELIS, P. L. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 295–

305, 2012.

ELIAS, A. M. et al. Techno-Economic-Environmental Analysis of Sophorolipid Biosurfactant Production from Sugarcane Bagasse. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 27, p. 9833–9850, 14 jul. 2021.

ELIAS, A. M. et al. Economic Aspects on the Production of Biofertilizers as Granular Composites. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 31, p. 10426–10438, 8 ago. 2022.

FALLACARA, A. et al. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. **Polymers**, 2018.

FARAJNEZHAD, A. et al. Correlation of interaction parameters in Wilson, NRTL and UNIQUAC models using theoretical methods. **Fluid Phase Equilibria**, v. 417, p. 181 – 186, 2016.

FERREIRA, R. G. et al. Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation. **Processes** , 2021.

GOGATE, P. R.; BEENACKERS, A. A. C. M.; PANDIT, A. B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 109–144, 2000.

GOMES, A. M. V. et al. Heterologous Hyaluronic Acid Production in *Kluyveromyces lactis*. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 294, 2019.

HARRISON, R. E. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HECHT, J. P. et al. Psychrometry, Evaporative Cooling, and Solids Drying. In: GREEN, D. W.; SOUTHARD, M. S. (Eds.). . **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2019. p. 2272.

HEIDARI, A. et al. Evaluation of fast and slow pyrolysis methods for bio-oil and activated carbon production from eucalyptus wastes using a life cycle assessment approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 241, p. 118394, 2019.

JAGANNATH, S.; RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 148–158, 15 jan. 2010.

JEEVA, P. et al. Production of controlled molecular weight hyaluronic acid by glucostat strategy using recombinant *Lactococcus lactis* cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4363–4375, 2019.

KIM, J. et al. Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase. **Archives of Oral Biology**, v. 89, p. 55–64, 2018.

KUDRA, T. Cost-Estimation Methods for Dryers and Drying Processes. In: MUJUMDAR, A. S. (Ed.). . **Handbook of Industrial Drying**. 4. ed. Boca Raton: CRC

Press, 2015. p. 10.

LAKSHMANAN, S.; MURUGESAN, T. The chlor-alkali process: Work in Progress. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 16, n. 2, p. 225 – 234, 2014.

LEDLEY, F. D. et al. Profitability of Large Pharmaceutical Companies Compared with Other Large Public Companies. **JAMA**, v. 323, n. 9, p. 834–843, 2020.

LIU, G. et al. Shortcut Design Method for Columns Separating Azeotropic Mixtures. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 14, p. 3908–3923, 1 jul. 2004.

LIU, L. et al. Enhanced Hyaluronic Acid Production of *Streptococcus zooepidemicus* by Shifting Dissolved Oxygen Level Based on Broth Rheology and Oxygen Mass Transfer Characteristics. **Food Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 148–161, 11 maio 2009.

LOGSDON, J. E.; LOKE, R. A. Isopropyl Alcohol. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

LONGATI, A. A. et al. Defining research & development process targets through retro-techno-economic analysis: The sugarcane biorefinery case. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 1–9, 2018.

PAGLIUCA, M.; RUGGIERO, A.; VOLPE, F. **Production of Highly Purified Sodium Hyaluronate (HANA) with Controlled Molecular Weight**. United States, 2015.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D.; WEST, R. E. Analysis of Cost Estimation. In: **Plant Design and Economics for Chemical Engineers**. 5. ed. New York: McGraw Hill, 2002. p. 226–275.

PINELLI, D.; NOCENTINI, M.; MAGELLI, F. **Hold-Up in Low Viscosity Gas-Liquid Systems Stirred with Multiple Impellers. Comparison of Different Agitators Types and Sets**. 8th Euro. Conf. on Mixing, Cambridge, UK (1994). *Anais...*1994

POLLARD, D. Aseptic Operations. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). . **Comprehensive Biotechnology 2: Engineering Fundamentals of Biotechnology**. 2. ed. Burlington: Academic Press, 2011. p. 933–945.

PUVENDRAN, K.; JAYARAMAN, G. Enhancement of acetyl-CoA by acetate co-utilization in recombinant *Lactococcus lactis* cultures enables the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 6989–7001, set. 2019.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations**. 3. ed. Danvers - MA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.

SINKA, M. et al. Comparative life cycle assessment of magnesium binders as an alternative for hemp concrete. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 133, p. 288–299, 2018.

TORRES-ACOSTA, M. A. et al. Comparative Economic Analysis Between Endogenous and Recombinant Production of Hyaluronic Acid. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 659, 2021.

TURTON, R. et al. **Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes**. 4. ed. Ann Arbor: Pearson Education, 2012.

VASILE, D. et al. Chemo-physical Properties and Biomedical Applications of Hyaluronic Acid in Medicine. **REVISTA DE CHIMIE**, v. 68, n. 2, p. 384–386, 2017.

VOGELPOHL, A. On the Relation between Ideal and Real Mixtures in Multicomponent Distillation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 25, n. 9, p. 869–872, 10 set. 2002.

WERNET, G. et al. The Ecoinvent database version 3 (part I): overview and methodology. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 21, n. 9, p. 1218–1230, 2016.

WESTBROOK, A. W. et al. Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 47, p. 401–413, 2018.

WU, Y.-Z. et al. Molecular Weight of Hyaluronic Acid Has Major Influence on Its Efficacy and Safety for Viscosupplementation in Hip Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **CARTILAGE**, p. 19476035211021904, 10 jun. 2021.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, nota-se que o ácido hialurônico microbiano é um produto que pode ser facilmente incorporado a uma biorrefinaria de etanol, apresentando grande viabilidade econômica, sendo a sacarose a fonte de carbono mais promissora dentre as disponíveis em biorrefinarias de etanol ou biodiesel (glicose, sacarose, xilose e glicerol). Além disso, o lucro pode aumentar ainda mais ao se incorporar mais frações da biorrefinaria como resíduo de leveduras após sua autólise e não se adicionar sais ao meio de cultivo, uma vez que o próprio caldo é rico em nutrientes.

Outro ponto que a análise técnico-econômica apresentou foi que o tempo de operação anual é menor do que outros trabalhos por estar atrelado à safra da cana-de-açúcar. O aumento do tempo operacional poderia levar a menores custos capitais ou no aumento da produção anual, sendo uma rota possível de ser investigada.

Os resultados também mostraram que a queda no pH em cultivos de *Streptococcus zooepidemicus* para a produção de ácido hialurônico é inevitável, mesmo com a adição de agentes tamponantes ao meio de cultivo. Dessa forma, o único meio viável de controlar o pH é através da adição contínua de base. No entanto, mesmo utilizando um controlador automático, esta adição de base representa um dos principais impactos ambientais. Verificou-se o impacto econômico que o não-controle teria e confirmou-se que esta estratégia também é economicamente inviável. Dessa forma, otimizar o consumo de base vai impactar significativamente a viabilidade ambiental do processo e elevar o nível de sustentabilidade.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados e das conclusões obtidas, ficam as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- i. desenvolvimento de novas estratégias de cultivo que reduzam a produção dos ácidos orgânicos para diminuir o consumo de base;
- ii. desenvolvimento de novas cepas, de *Streptococcus zooepidemicus* ou outros microrganismos, que produzam menos ácidos orgânicos;
- iii. estudar o uso de outras bases, além do hidróxido de sódio, para controle do pH durante cultivos;
- iv. integrar ainda mais o processo a biorrefinaria de etanol através do uso da levedura excedente para produzir o extrato de levedura e de integração energética;
- v. utilizar o bagaço hidrolisado na produção de ácido hialurônico, quer seja através da glicose como fonte de carbono ou então com a xilose como indutor em microrganismos recombinantes;
- vi. avaliar a viabilidade técnico-econômica-ambiental de integrar a produção de ácido hialurônico a outras indústrias de beneficiamento de matérias-primas agropecuárias, como o milho (para utilizar água de maceração de milho) ou soja (para uso de peptona de soja) e soro de leite.

8 APÊNDICE

8.1 APÊNDICE A

Na Tabela A.1 a seguir encontra-se listados os itens do inventário usados na Análise de Ciclo de Vida da produção de ácido hialurônico com o nome de seus produtos na base de dados Ecoinvent. Destaca-se que se utilizou dados de energia elétrica e sacarose provenientes da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil para representar com maior acurácia a biorrefinaria, uma vez que ambos os itens eram provenientes de uma usina de etanol de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.

Tabela A.1. Relação de itens e nome de seus produtos na base de dados Ecoinvent.

Item	Produto
Ácido Sulfúrico	Sulfuric Acid {GLO} market for Alloc Rec, U
Água	Process Water, ion exchange, production mix, at plant, from groundwater RER S
Carbonato de cálcio	Calcium Carbonate > 63 microns, production, at plant EU-27 S
Carvão ativado	Activated Carbon, granular {GLO} market for activated carbon, granular Alloc Rec U
Cloreto de cálcio	Calcium chloride {GLO} market for Alloc Rec, U
Energia elétrica	Electricity, high voltage {BR} ethanol production from sugarcane Alloc Rec, U
Extrato de levedura	Protein feed, 100% crude {GLO} fodder yeast to generic market for protein feed Alloc Rec U
Fosfato de sódio	Sodium phosphate {GLO} market for Alloc Rec U
Isopropanol	Isopropanol {GLO} market for Alloc Rec U
NaOH	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state
Sacarose	Sugar, from sugarcane {BR} cane sugar production with ethanol by-product Alloc Def U
Sulfato de cobre	Copper sulfate {GLO} market for Alloc Def U
Sulfato de ferro	Iron sulfate {GLO} market for Alloc Rec U
Sulfato de magnésio	Magnesium sulfate {GLO} market for Alloc Rec U
Sulfato de manganês	Manganese sulfate {GLO} market for Alloc Rec U
Sulfato de potássio	Potassium sulfate {GLO} market for Alloc Rec U
Vapor	Steam, in chemical industry {GLO} market for Alloc Rec U

Outro ponto importante é que se utilizou dados de hidróxido de sódio que compreendem uma combinação das três formas atuais de produzi-lo (o eletrodo de mercúrio, o de diafragma e o de membrana).

É importante destacar que os produtos relacionados ao carbonato de cálcio, carvão ativado e extrato de levedura não consideravam o impacto ambiental que o frete

possui. Por isso, novos produtos foram criados para estes itens adicionando-se o frete, conforme descrito na Tabela A.2.

Tabela A.2. Dados adicionados de frete ao carbonato de cálcio, carvão ativado e extrato de levedura.

Produto de Frete	Valor (tkm)
Transport, freight train {GLO} market group for Alloc Rec, U	0,3091
Transport, freight, sea, transoceanic ship market for Alloc Rec, U	0,599
Transport, freight, lorry, unspecified {GLO} market for Alloc Rec, U	0,2088
Transport, freight, inland waterways, barge {GLO} market for Alloc Rec, U	0,0246