

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO P(3HB) COM SOLVENTE  
RENOVÁVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIANA PACHECO CORRÊA

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO P(3HB) COM SOLVENTE  
RENOVÁVEL**

MARIANA PACHECO CORRÊA

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia.  
Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de  
Processos

Orientador: Prof. Nilo Sergio Medeiros Cardozo

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Rosane Rech

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO P(3HB) COM SOLVENTE RENOVÁVEL*, elaborada por Mariana Pacheco Corrêa, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Dra. Liliana Amaral Feris

---

Profa. Dra. Márcia Martinelli

---

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcilio

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Engenharia Química, pelo apoio que permitiu a realização do curso de mestrado.

Aos professores pelo convívio e pelos ensinamentos.

Aos orientadores, Nilo e Rosane e a amiga Débora, pela competência, pelos conselhos e pela paciência, indispensáveis à execução do trabalho.

À família, pelo apoio e carinho, propiciando um bem estar emocional.

## Resumo

No cenário mundial – e também nacional, com iniciativas de implementação da Política Nacional de Resíduos Sólidos – a indústria de materiais poliméricos tem buscado soluções para processos industriais mais sustentáveis, melhorias de infraestrutura-logística e destinos adequados para embalagens plásticas pós-consumo; promovendo um melhor aproveitamento do ciclo de vida desses materiais. Neste sentido, os biopolímeros têm sido alvo de atenção por serem polímeros biodegradáveis, ou produzidos a partir de matéria-prima renovável, ou ambos. Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeras bactérias e armazenados em corpos de inclusão nas células como reserva de energia, sendo produzidos a partir de fontes renováveis e apresentando como principal característica a biodegradabilidade. Um dos grandes entraves à utilização mais difundida dos PHAs é o seu custo elevado, sendo que um dos fatores que contribui para este custo é a dificuldade de extração do biopolímero da célula. O principal método utilizado é a extração com clorofórmio, que além de cara, em função da alta quantidade de solvente requerida, apresenta também problemas do ponto de vista ambiental. O objetivo do presente trabalho é encontrar um solvente renovável, ou seja, que seja oriundo de matéria-prima renovável (de preferência cana de açúcar) e que apresente bom desempenho no processo de extração de P(3HB) do interior da *B.megaterium*, bactéria Gram-positiva. Os isômeros *n* e *iso* de butanol e pentanol e acetato de etila – que no Brasil é fabricado a partir de etanol de cana de açúcar – foram os solventes renováveis testados. Também foram realizados experimentos com clorofórmio e hipoclorito, como base de comparação. Os resultados obtidos na extração com clorofórmio, hipoclorito e combinação de ambos apresentaram-se semelhantes a literatura, porém, não são recomendados para uso pois vão de encontro aos cuidados ambientais e tecnologias sustentáveis. Já os solventes alcoólicos testados, apesar de sustentáveis, apresentaram baixíssima solubilidade do P(3HB), não configurando solventes indicados para esse sistema. Na etapa inicial do estudo da extração com acetato de etila, obteve-se resultados de extração da mesma ordem daqueles obtidos com clorofórmio. Sendo assim, foi feito um conjunto de experimentos adicionais com base em um planejamento composto central rotacional dividido em blocos, visando-se estabelecer as condições de tempo, temperatura e razão volume de solvente: massa de biopolímero que maximizam o rendimento e a pureza do produto na extração do P(3HB) com acetato de etila, obtendo-se, na condição ótima, rendimento de extração de 78 % e grau de pureza de 65 %. Adicionalmente, considerando origem renovável e menor preço –

frente a outros ésteres - o acetato de etila se destaca como solvente potencial para uso em escala industrial na extração do P(3HB).

## Abstract

Based on the world scenario – and also on Brazilian context as initiatives to implement the Solid Waste National Policy - the industry of polymeric materials has sought solutions in order to achieve more sustainable industrial processes, infrastructure improvements, logistics and suitable destinations for post-consumer plastic packaging; promoting better life cycle use of these materials. In view of sustainable demand, biopolymers have gained attention once they are biodegradable, or produced from renewable raw materials, or both. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized by diverse bacteria and stored in cells inclusion as an energy reserve. PHAs are produced from renewable sources and their main feature is their biodegradability. One key barrier against the widespread use of PHAs is their high production costs, aside from the extraction step challenge to recover biopolymer from the cell. The ordinary extraction method is the chloroform extraction, which besides being costly, due to high volume of solvent required, it also presents problems from an environmental perspective. The objective of this study is to find a solvent made from renewable raw materials (preferably sugar cane) and which shows good extraction performance of P(3HB) from inside the *B.megaterium*, Gram-positive bacteria. Isomers *n* and *iso* butanol and pentanol and ethyl acetate - which in Brazil is produced from sugar cane ethanol – are the renewable solvents tested in this Project. In addition, chloroform and sodium hypochlorite were tested as a comparison base line. The results obtained in the extraction with chloroform, hypochlorite and combination of both were similar to the literature, however, their application is not recommended because that goes against environmental care and sustainable technologies. On the other hand, alcoholic solvents tested, although sustainable, showed very low solubility of P(3HB), and do not reach result targets for this system. During the initial study of extraction with ethyl acetate, results showed the same order of magnitude from those obtained with chloroform. Thus, an additional set of experiments based on a rotational central design divided into blocks was developed - it aims to establish the conditions of time, temperature and ratio solvent volume:biomass that maximize yield and purity of the product in the ethyl acetate extraction. Therefore, the optimum condition was reached 78 % P(3HB) extraction yield and 65 % purity. In addition, considering its renewable nature and lower price, with relation to the other esters, it can be stated that ethyl acetate has potential to be used as solvent for P(3HB) extraction in industrial processes.

## Sumário

Lista de Figuras .....	i
Lista de Tabelas .....	iii
Capítulo 1 – Introdução .....	1
Capítulo 2 - Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 Biopolímeros: definição e exemplos comerciais .....	3
2.2 Polihidroxicanoatos (PHAs) .....	5
2.1.1 Características e aplicações.....	5
2.1.2 Propriedades .....	8
2.2 Microrganismos produtores de PHAs .....	11
2.3 Produção de PHAs e fabricantes mundiais.....	13
2.4 Parede Celular de Gram-Positivas e Gram-Negativas.....	18
2.5 Métodos de Extração.....	19
2.5.1 Métodos mecânicos de extração .....	20
2.5.2 Métodos químicos de extração .....	22
2.5.3 Métodos biológicos de extração .....	25
2.5.4 Outros métodos de extração.....	26
2.5.5 Escolha do método extrativo de trabalho.....	27
Capítulo 3 - Materiais e Métodos .....	28
3.1 Materiais Utilizados.....	29
3.2 Microrganismo.....	29
3.3 Cultivo em biorreator para produção do P(3HB).....	29
3.4 Preparo da Biomassa.....	31
3.5 Extração do P(3HB).....	33
3.5.1 Testes com solventes mais comuns da literatura para referência comparativa .....	33
3.5.2 Testes preliminares com solventes alcoólicos renováveis .....	34
3.5.3 Testes de solubilidade via índice de refração.....	34
3.5.4 Testes preliminares com acetato de etila .....	35
3.5.5 Planejamento de Experimentos com solvente escolhido .....	36
3.6 Métodos Analíticos .....	38
3.6.1 Determinação de biomassa resultante da fermentação.....	38
3.6.2 Determinação do teor biopolímero P(3HB) e do rendimento de biopolímero P(3HB) na extração.....	38
Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	40
4.1 Extração com solventes mais comuns citados na literatura .....	40
4.2 Testes com solventes alcoólicos renováveis .....	41
4.3 Testes preliminares com acetato de etila .....	44
4.4 Resultados do planejamento de experimentos com o solvente escolhido .....	45
Capítulo 5 – Conclusões .....	55
5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros .....	55

ANEXO 1 .....	57
ANEXO 2 .....	58
Referências Bibliográficas .....	59
<i>ASTM D6866 Standard Test Methods for Determining the Biobased Content of Solid, Liquid, and Gaseous Samples Using Radiocarbon Analysis</i> , disponível em: <a href="http://www.astm.org/Standards">http://www.astm.org/Standards</a> . Acesso em 01/12/2013 .....	59

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Classificação dos polímeros quanto a origem da matéria-prima e quanto a biodegradabilidade.....	4
Figura 2.2: Fórmula estrutural geral dos PHAs.....	6
Figura 2.3. Unidade repetitiva do P(3HB).....	6
Figura 2.4: (a) chapas para cartões, (b) canetas, (c) tubetes para reflorestamento, (d) marcadores para uso agrícola, (e) componentes injetados para automóveis, (f) utensílios domésticos.....	8
Figura 2.5: Degradação de embalagem de P(3HB-co-3HV) em lodo de tratamento de efluentes.....	11
Figura 2.6: Fluxograma simplificado da produção de PHB em escala industrial.....	15
Figura 2.7: Microscopia de transmissão de elétrons ( $\times 30.000$ ) de células de <i>B. megaterium</i> em diferentes tempos de cultivo.....	18
Figura 2.8: Comparativo das paredes celulares entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	19
Figura 2.9: Resumo esquemático dos métodos de extração.....	20
Figura 2.10: Esquema de um moinho com pellets de vidro.....	21
Figura 2.11: Esquema simplificado do sistema chave-fechadura do complexo enzima-substrato.....	25
Figura 3.1: Fluxograma Geral das etapas desenvolvidas experimentalmente.....	28
Figura 3.2. Produção de P(3HB) em biorreator.....	31
Figura 3.3: Liofilização da Biomassa.....	32
Figura 3.4: (a) biomassa liofilizada retirada dos tubos falcons. (b) biomassa em cadinho de cerâmica homogeneizada.....	32
Figura 4.1: Ilustração de filme de P(3HB) resultante da extração com combinação clorofórmio e hipoclorito.....	40

Figura 4.2: Ensaio com solventes alcoólicos – inchamento da biomassa, (A) fração de inchamento após 1 h.....	42
Figura 4.3: Produtos da extração com butanol: (a) fase refinada (Tubo 15) e material sólido obtido após evaporação do solvente da fase extrato (Tubo 03) e (b) ampliação do pellet do Tubo 03.....	42
Figura 4.4: Massa de P(3HB) comercial solubilizada em função da temperatura para tempos de contato de 2 h e 12 h.....	44
Figura 4.5: Superfícies de resposta para o rendimento de extração de P(3HB): a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura.....	48
Figura 4.6: Superfícies de resposta para a pureza de extração de P(3HB): a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura.....	49
Figura 4.7: Efeito das variáveis V/M e tempo na solubilização de P(3HB) comercial.....	50
Figura 4.8: Superfícies de resposta para fração R/S. a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura.....	53

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Classificação de biopolímero comerciais.....	5
Tabela 2.2: Potencial de substituição dos polímeros convencionais por biopolímeros.....	7
Tabela 2.3: Aplicações do P(3HB) por processo, indústria e produto.....	7
Tabela 2.4: Temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e transição vítrea ( $T_g$ ).....	9
Tabela 2.5: Propriedades de PHAs e polímeros petroquímicos.....	10
Tabela 2.6: Produção de PHAs por diferentes bactérias.....	13
Tabela 2.7: Produtores mundiais de PHAs.....	17
Tabela 2.8: Resultados das extrações com clorofórmio puro e combinado com hipoclorito de sódio .....	24
Tabela 2.9: Métodos extrativos com solvente.....	25
Tabela 3.1. Composição do meio mineral e da solução de micronutrientes utilizados no cultivo.....	30
Tabela 3.2: Condições dos cultivos em biorreator.....	30
Tabela 3.3: Condições dos ensaios de solventes da literatura para referência.....	33
Tabela 3.4: Condições dos ensaios de solventes renováveis.....	34
Tabela 3.5: Condições utilizadas nos ensaios de solubilidade.....	35
Tabela 3.6. Experimentos Preliminares de Pontos de Saturação.....	35
Tabela 3.7: Pontos do Planejamento fatorial $2^3$ .....	36
Tabela 3.8: Planejamento fatorial $2^3$ dividido em blocos.....	37
Tabela 4.1: Resultados com clorofórmio, hipoclorito e combinação.....	41
Tabela 4.2: Resultados de IR (índice de refração) e % Brix.....	43
Tabela 4.3: Coeficientes de regressão das variáveis codificadas para rendimento, pureza de P(3HB) de biomassa de <i>B. megaterium</i> e solubilização de P(3HB) comercial.....	46
Tabela 4.4: Coeficientes de regressão das variáveis codificadas para a fração entre R/S .....	52



## Capítulo 1 – Introdução

Os materiais poliméricos apresentam como vantagens as características e as propriedades de baixa massa específica, resistência, durabilidade e flexibilidade de processamento desses materiais. Por outro lado, a maioria dos polímeros comercialmente utilizados é sintetizada a partir de uma fonte fóssil, como o petróleo, e apresenta baixas taxas de degradação na natureza. Sendo assim, os polímeros são acumulados quase que permanentemente no meio ambiente, levando a um efeito econômico-ambiental dentro de um fluxo quase unidirecional: a produção em grande quantidade para atender a alta demanda de materiais poliméricos e a subsequente geração de uma grande quantidade de resíduos que em sua maioria ainda não são descartados de forma correta. A Política Nacional de Resíduos Sólidos, instituída em agosto de 2010, estabelece normas que devem levar a melhoria nas condições de gerenciamento de resíduos.

Nesse panorama, os biopolímeros têm sido alvo de atenção por serem materiais poliméricos sustentáveis. Segundo a instituição European Bioplastics, um biopolímero pode ser definido como um polímero biodegradável, ou um polímero produzido a partir de matéria-prima renovável, ou ambos. Os biopolímeros biodegradáveis são polímeros que podem ser degradados por microrganismos de modo aeróbio, resultando em gás carbônico, água e biomassa. Na categoria de polímeros produzidos a partir de matérias-primas renováveis se enquadram aqueles que podem ser produzidos totalmente ou parcialmente por essas matérias-primas (etanol e açúcares de cana de açúcar, óleos vegetais, entre outros).

Uma das famílias de biopolímeros mais estudada é a dos polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres produzidos por microrganismos a partir de matérias-primas de fontes renováveis. As propriedades dos PHAs dependem de diversos fatores como: tipo de microrganismo utilizado para sua produção, tipo de substrato, condições operacionais e reacionais do processo, obtenção de homo ou copolímero, bem como de etapas posteriores à síntese, como extração, purificação ou produção de blendas, ou seja, misturas com outros polímeros.

O PHA mais abordado na literatura é o poli(3-hidroxiбутирато) (P3HB), material de interesse do presente trabalho. O P(3HB) é sintetizado por microrganismos e acumulado sob a

forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono e energia. Por ser um produto intracelular, a extração do polímero é um fator importante para a viabilidade econômica em escala comercial e também na obtenção de um material com qualidade e propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas. Com isso, a avaliação de métodos de extração do P(3HB) é de fundamental importância para um aumento efetivo do potencial de utilização deste material. Cabe ressaltar que um processo adequado de extração para este material deve ter como características sustentabilidade, capacidade para aumentar o grau de pureza do P(3HB) e alto rendimento da extração com uso de solvente oriundo de matéria-prima renovável.

Assim, inserido neste contexto, esse trabalho tem como objetivo principal encontrar um solvente que seja oriundo de matéria-prima renovável (de preferência cana de açúcar) e que apresente bom desempenho no processo de extração do P(3HB) do interior de células da bactéria *Bacillus megaterium*. Com base a este objetivo principal foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- analisar os métodos de extração de biopolímeros intracelulares existentes na literatura;
- selecionar e testar solventes mais usados na literatura como informação de referência comparativa;
- selecionar e testar a solubilização de P(3HB) comercial em solventes oriundos de matérias-primas renováveis;
- estabelecer, através de experimentos, a condição mais adequada de extração com o solvente renovável mais promissor dentre os testados. Experimentos para P(3HB) comercial e biomassa.

Essa dissertação está dividida em 5 capítulos, sendo que o conteúdo dos outros quatro capítulos é descrito sucintamente a seguir. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica e conceitos fundamentais, envolvendo definições e normas técnicas para biopolímeros, características, aplicações e propriedades dos PHAs; microrganismos produtores; produção de PHAs e métodos extrativos. O Capítulo 3 aborda os materiais e métodos utilizados, englobando o microrganismo, cultivos em biorreator, preparo da biomassa, extração e métodos analíticos. Os resultados e sua discussão são apresentados no Capítulo 4. E, por fim, as conclusões e sugestões para trabalhos futuros no Capítulo 5.

## Capítulo 2 - Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica

### 2.1 Biopolímeros: definição e exemplos comerciais

Segundo a instituição European Bioplastics, um biopolímero pode ser definido como um polímero biodegradável, ou um polímero produzido a partir de matéria-prima renovável, ou ambos. Os biopolímeros biodegradáveis são materiais que podem ser degradados por microrganismos na presença de oxigênio (processo aeróbio) e umidade, resultando na transformação do biopolímero em gás carbônico, água e húmus (matéria orgânica estabilizada). Os biopolímeros a partir de matérias-primas renováveis são aqueles que podem ser produzidos totalmente ou parcialmente por essas matérias-primas (por exemplo: etanol e açúcares de cana de açúcar, óleos vegetais, dentre outros) (SHEN et al., 2009). A Figura 2.1 mostra a classificação de alguns biopolímeros e polímeros convencionais dentro desse conceito.

Cabe ressaltar que um biopolímero pode ser obtido de matéria-prima renovável e não ser biodegradável, como por exemplo, o bio-polietileno (bioPE) oriundo da polimerização do eteno de etanol. Nesse caso, o monômero eteno produzido a partir da desidratação do etanol apresenta a mesma especificação do eteno resultante do craqueamento de uma fonte fóssil (nafta ou gás), sendo ambos recicláveis, porém não biodegradáveis. A diferenciação entre os produtos de matéria-prima renovável e de matéria-prima fóssil é possível através da análise dos radioisótopos de carbono, conforme ASTM D6866. Essa norma define o princípio de determinação do conteúdo renovável de certo material através da contagem da quantidade de radioisótopos de carbono  $^{14}\text{C}$  (indicativo de base renovável) e  $^{12}\text{C}$  (indicativo de base fóssil) presentes na amostra.

Há também biopolímeros de fontes fósseis que podem ser biodegradáveis, como é o caso de copoliésteres alifáticos-aromáticos produzidos com 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico (PTA) BASF (2006). A Tabela 2.1 resume as classes de biopolímeros bem como exemplos comerciais.

Para fins de determinação da biodegradabilidade e compostagem de polímeros a norma de referencia é a ASTM D6400-04 (*Standard Specification for Compostable Plastics*), cujo

propósito é de estabelecer padrões para identificar plásticos e produtos plásticos destinados à compostagem em instalações de compostagem aeróbia municipais e industriais.

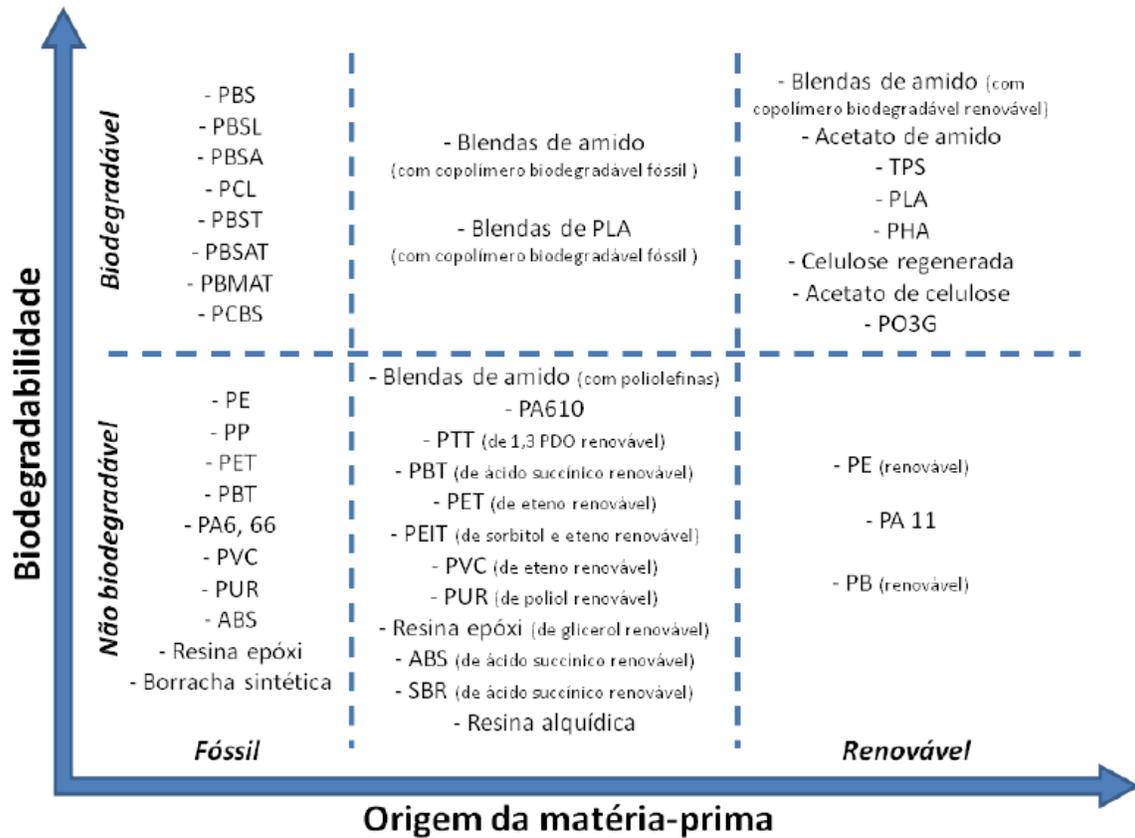


Figura 2.1: Classificação dos polímeros quanto a origem da matéria-prima e quanto a biodegradabilidade (SHEN et al., 2009)

Tabela 2.1: Classificação de biopolímero comerciais

<b>Classes</b>	<b>Exemplos Comerciais</b>
De fonte renovável e biodegradável	Ácido polilático (PLA), Ingeo, da NatureWorks; polihidroxicanoato (PHA), como o Biocycle
De fonte renovável e não biodegradável	Polietileno de etanol, como o bioPE da Braskem
Parcialmente de fonte renovável e biodegradável	Blendas de PLA ou amido com copolímeros de base fóssil, como o Ecobras, da Basf
Parcialmente de fonte renovável e não biodegradável	PET com 30 % de bioMEG oriundo de etanol e 70 % de PTA (como o PlantBottle da Coca-Cola)
Fonte fóssil e biodegradável	Copoliésteres alifáticos-aromáticos como o Ecoflex, da Basf

Fonte: Revista Embalagem Marca, outubro 2010

## 2.2 Polihidroxicanoatos (PHAs)

### 2.1.1 Características e aplicações

Uma das famílias de biopolímeros mais estudada é a dos polihidroxicanoatos (PHAs), que são poliésteres sintetizados por microrganismos a partir de matérias-primas renováveis. Os PHAs são acumulados sob a forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono e energia, ou seja, o microrganismo não excreta o biopolímero para o meio. Uma característica interessante desse polímero é a biodegradabilidade. Dentro dessa família, pode-se encontrar em torno de 125 monômeros diferentes constituintes de PHAs. A maioria destes monômeros possui o grupo hidroxila na posição 3, embora em alguns PHAs o grupo hidroxila encontre-se nas posições 4, 5 ou 6. Dentre a grande variedade de ácidos hidroxicanoatos já detectados como constituintes dos PHAs, incluem-se monômeros de cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas, halogenadas, ramificadas com grupos substituintes lineares, cíclicos ou aromáticos, entre outros (MADISON and HUISMAN, 1999; REHM, 2003). Os PHAs possuem a fórmula estrutural mostrada na Figura 2.2.

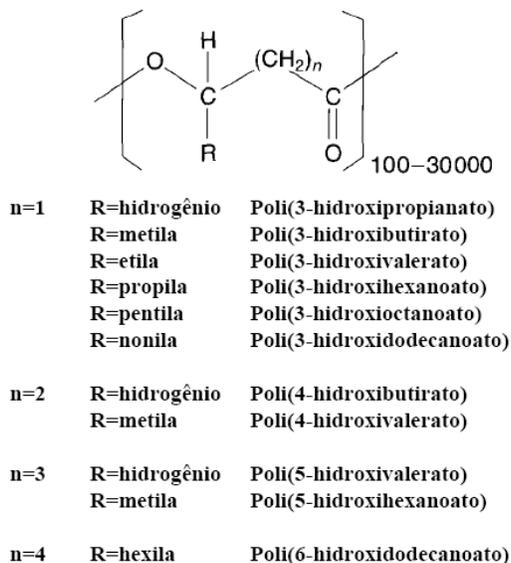


Figura 2.2: Fórmula estrutural geral dos PHAs (LEE, 1996)

A diversidade de polímeros da família dos PHAs e seu vasto potencial de aplicação estão associados às amplas possibilidades de variação do comprimento e da composição das cadeias. O poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é o principal representante dessa família e juntamente com o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-valerato) P(3HB-co-3HV) são os mais estudados. A unidade repetitiva (UR) do polímero P(3HB) está representada na Figura 2.3.

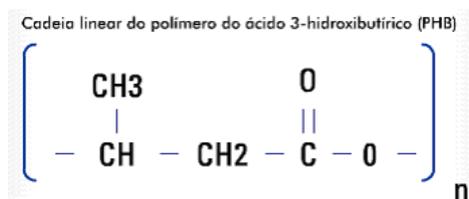


Figura 2.3. Unidade repetitiva do P(3HB) (Adaptado LEE, 1996)

Devido ao grande número de PHAs que podem ser obtidos e às similaridades encontradas entre suas propriedades e as dos plásticos petroquímicos, os PHAs podem ser usados substituindo polímeros convencionais em um grande número de aplicações, tais como, utilização em sacolas, aparelhos de barbear descartáveis, fraldas, produtos higiênicos femininos, embalagens de cosméticos, entre outras (LEE, 1996; MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY et al., 2003). Verifica-se que o copolímero P(3HB-co-3HV) apresenta alto potencial de substituição de polietilenos e polipropileno conforme apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Potencial de substituição dos polímeros convencionais por biopolímeros.

	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PC
PA	-	+	+	+	+	-	-	-	-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PHA (PHB/HH)	+	++	++	++	+	-	-	+	-

++ alto potencial de substituição    + potencial de substituição parcial    - não substituição

Fonte: Adaptada de PRADELLA, 2006

Na área médica, os PHAs encontram aplicação devido à sua biocompatibilidade, podendo ser utilizados em tratamento de ferimentos (suturas, malhas cirúrgicas e grampos), sistema vascular (válvulas cardíacas), ortopedia (estrutura para engenharia de cartilagens, regeneração de meniscos), urologia (tubo urológico) e na liberação controlada de medicamentos (LEE e CHANG, 1995; ZINN et al., 2001; MARTIN e WILLIAMS, 2003). A Tabela 2.3 e a Figura 2.4 apresentam informações relativas a esse biopolímero em termos de tipo de processo, setor industrial e tipo de produto em que pode ser utilizado, segundo a PHB Industrial (2012).

Tabela 2.3: Aplicações do P(3HB) por processo, indústria e produto

APLICAÇÕES DO P(3HB)		
PROCESSOS	INDÚSTRIA	PRODUTOS
Extrusão de Chapas	Cartões/Informação	Telefones/Crédito/Débito
		Bandejas Termoformadas Chapas separadoras
Injeção	Veterinária	DLH (dispositivo de liberação hormonal)
		Marcadores (brincos de boi/local)
	Agrícola	Tubetes para reflorestamento
		Barbeadores
	Higiene pessoal	Escovas de dentes
		Tampas de frascos
	Embalagens	Potes em geral
		Brinquedos
	Escolar/Escritório	Canetas
		Lápis
Réguas		
Automobilística	Componentes injetados	
	Coating Paper	Embalagens
		Cartonados

Fonte: PHB Industrial (2012)

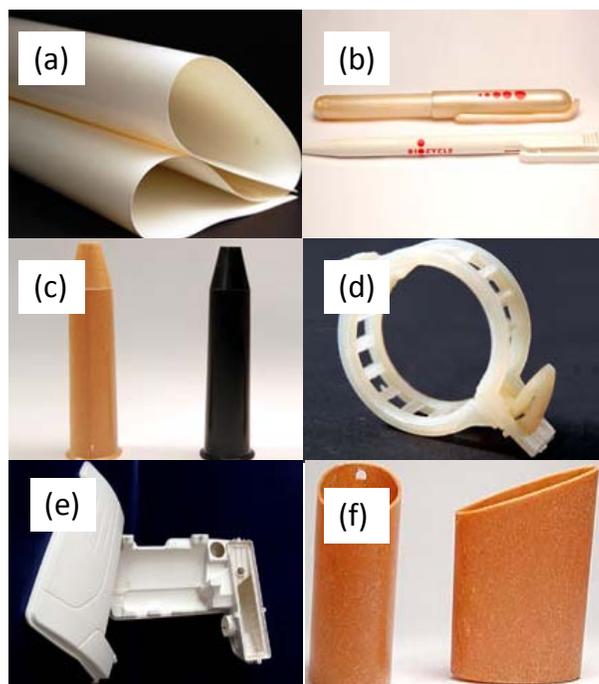


Figura 2.4: Produtos que podem utilizar PHAs(a) chapas para cartões, (b) canetas, (c) tubetes para reflorestamento, (d) marcadores para uso agrícola, (e) componentes injetados para automóveis, (f) utensílios domésticos. Fonte: PHB Industrial (2012)

### 2.1.2 Propriedades

O P(3HB) apresenta uma faixa de massa molar variando de  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> e um índice de polidispersão em torno de 2 (DOI, 1990). Analisando as propriedades, a Tabela 2.4 mostra a comparação entre as temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e de transição vítrea ( $T_g$ ) de alguns PHAs e polímeros petroquímicos. Pode-se observar que o P(3HB) possui uma temperatura de transição vítrea maior que a do polipropileno, porém, a adição de 3HV no P(3HB), na forma de copolímero P(3HB-co-71%3HV), diminui o valor da  $T_g$ , ficando mais próximo à do polipropileno.

Tabela 2.4: Temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e transição vítrea ( $T_g$ ) (SUDESH et al., 2000)

<b>Polímero</b>	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)
P(3HB) <sup>1</sup>	180	4
P(3HB-co-71%3HV) <sup>2</sup>	83	-13
P(4HB) <sup>3</sup>	53	-48
PHA <sub>MCL</sub> <sup>4</sup>	45-54	- 25 a - 40
Poliacrilato	-	-106
Polipropileno	176	-10
Poliestireno	240	100

<sup>1</sup> Poli(3-hidroxiobutirato); <sup>2</sup> Poli(3-hidroxiobutirato-co-71%-3-hidroxiacetalto);<sup>3</sup> Poli(4-hidroxiobutirato); <sup>4</sup> Polihidroxiacetoato de cadeia média

A Tabela 2.5 mostra propriedades mecânicas dos PHAs, onde se observa que o P(3HB) tem propriedades próximas às do polipropileno. O P(3HB) possui menor resistência a solventes, porém, maior resistência quando exposto à radiação ultravioleta. Filmes de P(3HB) possuem excelente propriedade de barreira a gás e são tão eficientes quanto os filmes de polipropileno, porém, não tão eficientes como os filmes de polietilenotereftalato (PET) (HOLMES, 1985).

Tabela 2.5: Propriedades de PHAs e polímeros petroquímicos (LEE, 1996)

<b>Polímero</b>	<b>Temperatura de Fusão (°C)</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>	<b>Tensão de Cisalhamento (MPa)</b>	<b>Resistência à Ruptura (%)</b>	<b>Resistência ao Impacto (Izod) (J/m)</b>
P(3HB) <sup>1</sup>	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV) <sup>2</sup>					
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-	60
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-	95
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-	120
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-	200
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-	400
P(4HB) <sup>3</sup>	53	149	104	1000	-
P(3HB-co-4HB) <sup>4</sup>					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(3HHx-co-3HO) <sup>5</sup>	61	-	10	300	-
Polipropileno	170	1,7	34,5	400	45
Polietilenotereftalato	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	-	21

<sup>1</sup> Poli(3-hidroxiбутирато); <sup>2</sup> Poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiвалерато); <sup>3</sup> Poli(4-hidroxiвалерато); <sup>4</sup> Poli(3-hidroxiбутирато-co-4-hidroxiбутирато); <sup>5</sup> Poli(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxiocetanoato)

A resistência à ruptura do P(3HB) é muito inferior à do polipropileno, porém, esta propriedade pode ser melhorada pela adição de 4-hidroxiбутирато (4HB) ao poli(3-hidroxiбутирато) na forma de copolímero, como observado na Tabela 2.5 (LEE, 1996).

Um ponto desfavorável ao P(3HB) é o fato da sua temperatura de degradação térmica, próxima a 200 °C, ser muito próxima da temperatura de fusão. O decréscimo da temperatura de fusão com o aumento da fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero. Além disso, o aumento da fração de 3HV torna o polímero mais flexível (pelo decréscimo do Módulo de Young) e aumenta sua resistência ao

impacto. Assim, as propriedades do P(3HB-co-3HV) podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante o cultivo em biorreator (LEE, 1996).

A biodegradabilidade é uma característica que destaca os PHAs como materiais de interesse industrial uma vez que é possível fechar o ciclo de carbono do material. A Figura 2.5 mostra a degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) em lodo de tratamento de efluentes. O progresso da degradação é demonstrado com os frascos após 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (da esquerda para a direita) (MADISON e HUISMAN, 1999).



Figura 2.5: Degradação de embalagem de P(3HB-co-3HV) em lodo de tratamento de efluentes (MADISON e HUISMAN, 1999).

## 2.2 Microrganismos produtores de PHAs

Os PHAs são sintetizados naturalmente por pelo menos 75 gêneros diferentes de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (REDDY et al., 2003). Além disso, com o desenvolvimento da genética, outras bactérias que não acumulam PHAs naturalmente podem ser modificadas geneticamente passando, assim, a acumular biopolímeros. Algumas leveduras recombinantes também já foram utilizadas experimentalmente para a produção de biopolímeros (REDDY et al., 2003; STEINBUCHER et al., 2001; SUDESH et al., 2000).

Os custos de produção dos PHAs estão diretamente ligados à seleção do tipo de microrganismo, do substrato (fonte de nutrientes para o microrganismo). É desejável que as

cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevadas, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma alta porcentagem de PHA em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA elevado (RAMSAY et al., 1994; MARANGONI, 2000).

Dependendo da fonte de carbono e da espécie da bactéria, podem-se obter tipos diferentes de PHAs, como é ilustrado na Tabela 2.6, onde se observa a produção de PHAs por tipos diferentes de bactérias isoladas naturalmente e também modificadas geneticamente, para diferentes fontes de carbono.

Tabela 2.6: Produção de PHAs por diferentes bactérias (REDDY et al., 2003)

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>PHA</b>	<b>PHA (%w/v)</b>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gliconato	P(3HB) <sup>1</sup>	46-85
	Propionato	P(3HB)	26-36
	Octanoato	P(3HB)	38-45
<i>B. megaterium</i> QMB 1551	Glicose	P(3HB)	20
<i>Klebsiella aerogenes recombinante</i>	Melaço	P(3HB)	65
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 127	Frutose/Metanol	P(3HB)	30
<i>Methylobacterium extorquens</i> (ATCC55366)	Metanol	P(3HB)	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia e Óleo de rícino	PHA <sup>2</sup>	20-30
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Pentanol	P(3HV) <sup>3</sup>	55
<i>Pseudomonas olearans</i>	Gliconato	P(3HB)	1,1-5
	Octanoato	P(3HB)	50-68
<i>Pseudomona. Putida</i> GPp104	Octanoato	P(3HB)	14-22
<i>P. putida</i>	Óleo de semente de palma	PHA	37
	Ácido láurico	PHA	25
	Ácido mirístico	PHA	28
	Ácido Oléico	PHA	19
<i>P. putida</i> BM01	Ácido fenoxi-decanóico	5POHV <sup>4</sup>	15-35
<i>Sphaerotilos natans</i>	Glicose	P(3HB)	40

<sup>1</sup> Poli(3-hidroxi-butilato); <sup>2</sup> Polihidroxi-alcenoato; <sup>3</sup> Poli(3-hidroxi-valerato); <sup>4</sup> Poli(3-hidroxi-5-fenilvalerato)

Os PHAs são obtidos por microrganismos em cultivos onde haja, geralmente, excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, oxigênio ou magnésio (DAWES e SENIOR, 1973; STEINBUCHER et al., 2001). Porém, existem algumas bactérias capazes de acumular biopolímeros sem restrições a nutrientes. (FACCIN et al., 2009; FACCIN et al., 2011; McCOOL and CANNON, 2001; McCOOL et al., 1996).

### 2.3 Produção de PHAs e fabricantes mundiais

As etapas de um processo industrial da produção de PHAs envolvem, em linhas gerais:

- **Preparo do meio de cultivo:** entende-se meio de cultivo como um conjunto de substâncias químicas consumidas pelo microrganismo. O preparo deste meio tem como finalidade preparar o substrato para duas finalidades – o crescimento do microrganismo e a produção propriamente dita, obtenção do produto desejado;
- **Esterilização do meio de cultivo e equipamentos:** no sentido de evitar a proliferação de contaminantes e perda de rendimento do processo;
- **Preparo do inóculo:** entende-se inóculo como um conjunto de células de microrganismos. O preparo do inóculo se dá pela multiplicação do microrganismo até uma concentração adequada para obter o produto em condições econômicas e competitivas, minimizando a fase lag;
- **Cultivo em biorreator:** obtenção ou transformação de produtos orgânicos (substratos) pela ação microbiana;
- **Separação dos produtos e subprodutos:** consiste na utilização de operações unitárias (por exemplo, centrifugação) para a purificação do produto desejado;
- **Tratamento de resíduos:** esta etapa visa a evitar agressão ao meio ambiente e/ou permitir a reutilização do microrganismo, que às vezes é caro.

A Figura 2.6 apresenta o fluxograma do processo produtivo em escala industrial para produção de biopolímero, conforme divulgado pela empresa PHB Industrial (2012). A produção é feita pelo cultivo do microrganismo da espécie *Alcaligenes s.p.* utilizando o açúcar de cana de açúcar que inicialmente é invertido por um processo enzimático transformando-se em um xarope

de glicose e frutose. No processo de extração do biopolímero utiliza-se um álcool superior (álcool que apresenta mais de dois carbonos em sua estrutura química, como por exemplo, butanol e pentanol) como solvente. No seu processo de produção, o bagaço de cana é usado como fonte para a produção de energia elétrica e vapor. Os efluentes são basicamente água e matéria orgânica da bactéria que por sua vez é lançada na lavoura de cana de açúcar, como fertilizante orgânico (MANTELATTO, 2011)

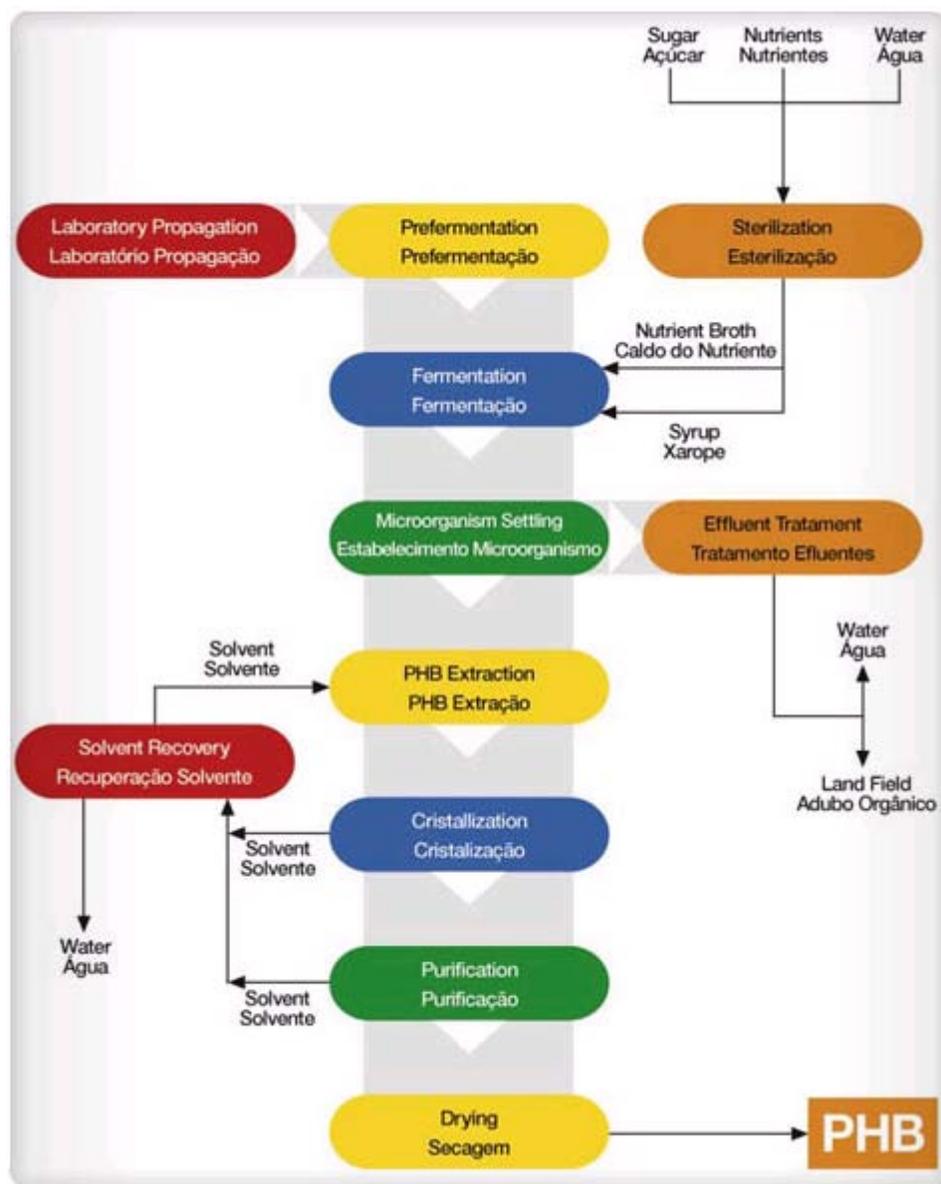


Figura 2.6: Fluxograma simplificado da produção de PHB em escala industrial. (Fonte: PHB Industrial, 2012)

O Brasil possui uma planta piloto de P(3HB), desde 1995, no município de Serrana interior de São Paulo. Essa unidade é pertencente à PHB Industrial, proprietária da marca BIOCYCLE®, e controlada pelas empresas Pedra Agroindustrial e Grupo Balbo. A produção do biopolímero é integrada a produção de açúcar da usina. No total são sete usinas que produzem cerca de 520 mil toneladas de açúcar e 840 milhões de litros de etanol por ano. (NONATO et al., 2001).

Atualmente, outras empresas de diversas partes do mundo já estão operando e produzindo P(3HB) e seus co-polímeros em diferentes escalas. Os principais fabricantes são:

- **Telles:** uma joint venture entre as americanas Metabolix e Archer Daniels Midland, é a principal produtora de PHAs no mundo. A unidade produtiva, integrada em matéria-prima com a planta de processamento de milho da ADM em Clinton (Iowa, EUA), tem capacidade instalada de 50 mil toneladas anuais de PHB. O biopolímero, comercializado sob o nome Mirel™, é direcionado para aplicações aquáticas, em agricultura e na produção de embalagens.
- **Green Bio:** empresa chinesa produtora de copolímero de 3-hidróxibutirato e 4-hidróxibutirato, denominado P(3/4HB). A companhia tem unidade industrial com capacidade instalada de cerca de 10 mil toneladas anuais do biopolímero.
- **Kaneka:** empresa japonesa fabricante de biopolímero polihidroxibutirato a base de óleos vegetais. A capacidade instalada da unidade é de 1000 toneladas anuais para produção do biopolímero AONILEX®.
- **Tianan Biologic:** empresa chinesa líder mundial na produção de P(HBV), co-polímero de 3-hidróxibutirato e 3-hidróxivalerato. Em 2009, a empresa, localizada em Ningbo (China), possuía capacidade instalada de 2 mil toneladas do biopolímero. O P(HBV) é comercializado sob a denominação Enmat®.
- **Tepha:** empresa americana em Lexington (Massachusetts, EUA) especializada na produção de P(4HB) para aplicações médicas. O biopolímero é comercializado sob o nome TephaFLEXT.
- **Bio-On:** empresa italiana que comercializa tecnologias de produção de PHAs sob a denominação MINERV®. A companhia dispõe de tecnologias produtoras com capacidade de produção de até 10 mil toneladas anuais do biopolímero, que pode ser

obtido tanto a partir de açúcares de beterraba (MINERV-SBTM) quanto de cana de açúcar (MINERV-SCTM). (Relatório MaxiQuim Market Outlook Biopolímeros, 2011)

A Tabela 2.7 resume os principais fabricantes de biopolímeros, localização, tipo de matéria-prima renovável utilizada, nome comercial e capacidades atual e futura.

Tabela 2.7: Produtores mundiais de PHAs

Capacidade Instalada de Produtores Mundiais de PHAs							
Empresa	Localização	Matéria-prima	Nome Comercial	PHAs	Capacidade	Capac. anunciada (A) ou esperada (E)	
					- toneladas/ano -		
					2007	2010	2020
Tianan	China	Açúcar de milho	Enmat	P(3HB-co-3HV)	2,000	10.000 (A)	50.000 (A)
Telles	Estados Unidos	Açúcar de milho	Mirel	PHB copolímeros	250	50.000 (A)	500.000 (E)
Kaneka	Japão	Óleo vegetal	AONILEX	P(3HB-co-3HHx)	100	1.000 (A)	50.000 (E)
Green Bio / DSM	China	Açúcares em geral	Green Bio	P(3HB-co-4HB)	nd	10.000 (A)	nd
PHB Industrial	Brasil	Açúcar de cana-de-açúcar	Biocycle	P(3HB) P(3HB-co-3HV)	50	10.000 (E)	10.000 (E)
Biomer	Alemanha	Açúcares em geral	Biomer	P(3HB)	nd	nd	nd
Mitubishi Gas Chemical	Japão	Metanol (de gás natural)	Biogreen	P(3HB)	10	nd	nd
Meredian	Estados Unidos	Açúcar de milho	Meredian PHA	nd	-	nd	272.000 (A)
Tepha	Estados Unidos	nd	TephaFlex, TephElast	P(4HB) , nd	nd	nd	nd
Beijing Tianzhu	China	nd	PHBH Tianzhu	P(3HB-co-3HHx)	Piloto	nd	nd

Fonte: Relatório MaxiQuim Market Outlook Biopolímeros, 2011. Nota: nd = não disponível

## 2.4 Parede Celular de Gram-Positivas e Gram-Negativas

A Figura 2.7 mostra a microscopia de células de *Bacillus megaterium*, microrganismo utilizado no presente estudo, em diferentes tempos de cultivos. Nota-se que, com o aumento do acúmulo, as células que têm forma de bastonetes vão ficando mais arredondadas para acomodar melhor o polímero.

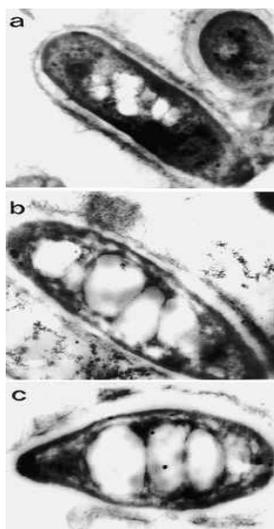


Figura 2.7: Microscopia de transmissão de elétrons ( $\times 30.000$ ) de células de *B. megaterium* em diferentes tempos de cultivo (GOUDA et al., 2001)

Os microrganismos são capazes de se adaptar às mudanças de condições do meio em que estão inseridos. As propriedades celulares, tais como o tamanho e estrutura de parede alteram durante o processo de adaptação, e isso pode afetar o rompimento da parede celular (MIDDELBERG, 1995).

As bactérias Gram-positivas apresentam – do interior para o exterior da célula – a membrana citoplasmática; o periplasma e o peptidoglicano. Já as Gram-negativas, apresentam ainda uma quarta camada, chamada de membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS). A produção de PHAs por Gram-negativas pode apresentar uma desvantagem em aplicações médicas devido à presença de LPS na membrana externa que pode ser extraído junto com o biopolímero. O LPS é uma endotoxina que causa reações imunológicas (PHILIP et al., 2009; VALAPPIL et al., 2007). A Figura 2.8 ilustra ambos tipos. Nota-se que a camada de

peptideoglicano nas Gram-positivas apresentam espessura bem maior que as de Gram-negativas, sendo a primeira cerca de 10 a 20 vezes mais espessa. Esse fato pode ser um dos motivos pelo qual o uso de métodos extrativos aplicados em bactérias Gram-negativas nem sempre apresentam similaridade de resultados e performance quando aplicados em Gram-positivas (BOS et al. 2007; ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; SCHEFFERS e PINHO, 2005).

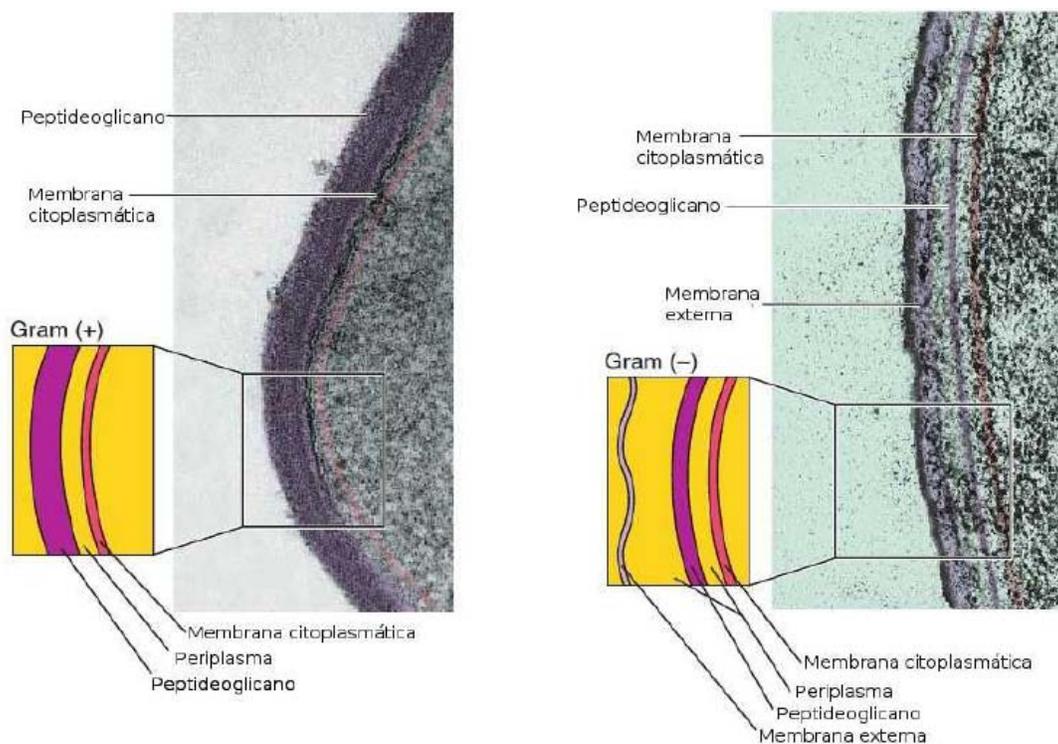
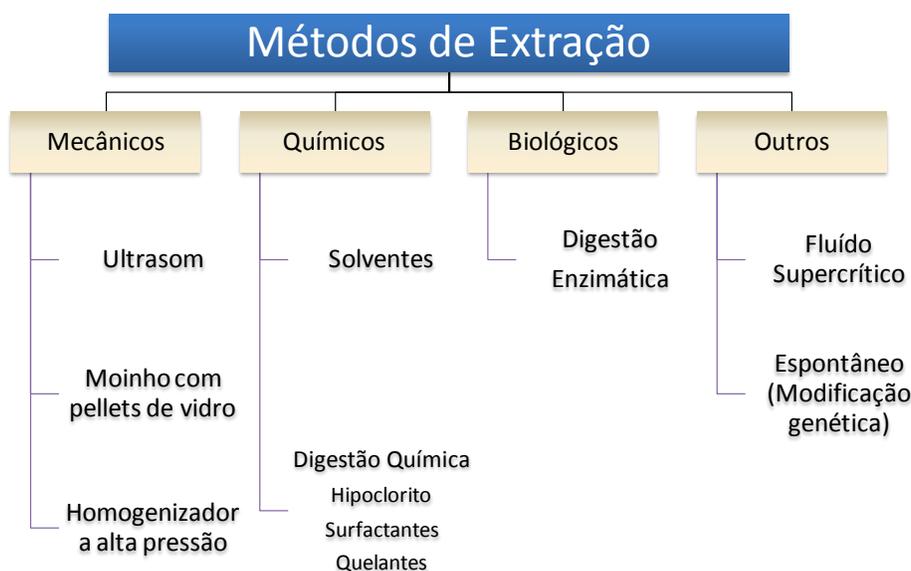


Figura 2.8: Comparativo das paredes celulares entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BENYS, 2013)

## 2.5 Métodos de Extração

Por ser um produto intracelular, a extração do polímero é um fator importante para a viabilidade econômica em escala comercial e também na obtenção de um material com qualidade e propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas (RAMSAY et al., 1994). Com isso, a avaliação de métodos de extração do P(3HB) é de fundamental importância para um aumento efetivo do potencial de utilização deste material.

Os métodos de extração envolvem processos químicos, mecânicos ou biológicos. Dentre os químicos se destacam o uso de solventes orgânicos (RAMSAY et al., 1994) (HAHN et al., 1995;) e surfactantes (CHEN et al., 2001; KIM et al., 2003); dentre os mecânicos o ultrassom, moinhos com pellets de vidro e homogeneizador a alta pressão (TAMER et al., 1998) GHATNEKAR et al., 2002); dentre os biológicos está o uso de enzimas (KAPRITCHKOFF et al., 2006; YASOTHA et al., 2006). Há também outros métodos de extração como o uso de fluídos supercríticos (HEJAZI et al., 2003, apud, JACQUEL et al., 2008) e o método espontâneo no qual o rompimento da parede celular de microrganismos geneticamente modificados ocorre de modo espontâneo quando a concentração de substrato glicose tende a zero, liberando P(3HB) para o meio (HORI et al., 2002). A Figura 2.9 mostra um esquema geral dos métodos extrativos.



Nota: o termo digestão é empregado quando há o “ataque” a parede celular, ou seja, material não PHAs

Figura 2.9: Resumo esquemático dos métodos de extração

### 2.5.1 Métodos mecânicos de extração

O uso de processos mecânicos para extração de biopolímeros produzidos por microrganismos é mais difícil do que processos de extração convencionais, como por exemplo na obtenção de óleos vegetais. Isto se deve ao fato que o esmagamento de microrganismos para obtenção de plásticos apresenta baixa eficiência, pois devido ao seu tamanho molecular o polímero praticamente não escoar para fora da célula via compressão mecânica (NODA et al.,

1999). Assim, os métodos mecânicos de extração de biopolímeros devem geralmente prover ação mecânica suficiente para promover a ruptura da parede celular.

Os métodos de rompimento da parede celular por procedimentos mecânicos são largamente utilizados na recuperação de proteínas intracelulares (TAMER e MOO-YOUNG, 1998; TAMER et al., 1998). Em Tamer et al., e Tamer and Moo-Young (1998), pode-se verificar estudos para o rompimento celular e recuperação de P(3HB) produzido pela bactéria *A. latus*. Para isso, foi utilizado um moinho com esferas de vidro conforme Figura 2.10, onde as células entram no equipamento e preenchem o espaço anular entre o rotor e o estator já previamente carregado com as esferas de vidro. O princípio de ação dessa extração envolve a agitação, o impacto e o atrito da parede celular com as esferas. Foi quantificado o teor de proteínas recuperadas e verificou-se correlação linear entre proteínas e biopolímero, sendo estimado o teor de P(3HB) recuperado pela equação Equação 1 (TAMER et al., 1998):

$$Rp = \alpha + \beta * Rs \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $Rs$ : massa de proteína por biomassa seca (g/kg);  $Rp$ : massa de P(3HB) por biomassa seca (g/kg);  $\alpha$  e  $\beta$ : coeficientes. O teor máximo de proteína recuperada foi de 90 g/kg, correspondendo a cerca de 1,3 g/kg de P(3HB) .

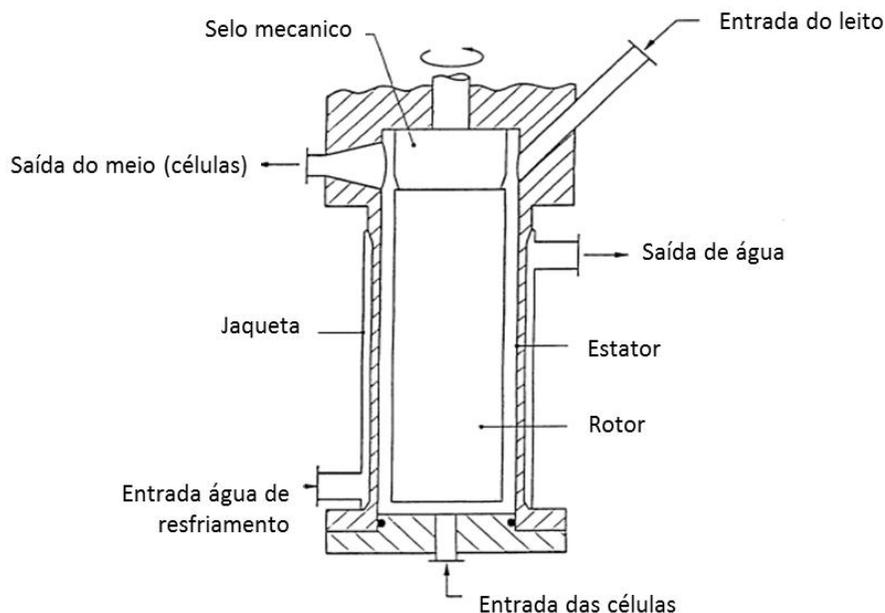


Figura 2.10: Esquema de um moinho com pellets de vidro

Outro método usado em Tamer et al., (1998) foi o homogeneizador a alta pressão, no qual o princípio de ação consiste na passagem forçada das células por um pequeno orifício onde a pressão de entrada é muito maior que a da saída (atmosférica) provocando o rompimento da parede celular. Porém, esse procedimento é fortemente dependente da concentração de biomassa e foram observados problemas operacionais devido aos frequentes entupimentos do orifício. Em Tamer et al., (1998) recomenda-se o uso de moinhos com pellets de vidro.

Ghatnekar et al. (2002) avaliaram a extração do P(3HB) da *Methylobacterium* sp V49 pelo homogeneizador a alta pressão com e sem a presença de solução com dodecil sulfato de sódio (SDS) 5 %. O melhor resultado apresentado foi com pressão de 400 kgf/cm<sup>2</sup> em dois ciclos, gerando 98 % de rendimento de extração e 95 % de pureza em P(3HB).

### 2.5.2 Métodos químicos de extração

Os métodos químicos podem ser divididos em dois grandes grupos:

- a) **Agentes solventes:** substâncias químicas que solubilizam preferencialmente o P(3HB);
- b) **Agentes digestores:** substâncias químicas que solubilizam material não P(3HB) – biomassa residual – ou apresentam maior afinidade com a parede celular da bactéria.

O princípio básico de ação dos solventes é primeiro modificar a permeabilidade da membrana celular e depois solubilizar o P(3HB). Na literatura foram encontrados diversos tipos de solventes, sendo os mais empregados: os clorados, como o cloforórmio 1,2-dicloroetano, cloreto de metila; as cetonas cíclicas e acíclicas; além de 1,2 propileno carbonato, carbonatos cíclicos, os álcoois superiores como o butanol, pentanol e o óleo fusel – coproduto das usinas sucroalcooleiras brasileiras, rico em álcool iso-amílico e iso-butílico; e alguns ésteres como acetato isoamílico, acetato de butila e propionato de propila. No Brasil, somente o acetato isoamílico é obtido majoritariamente por matéria-prima renovável, ao passo que o acetato de butila e o propionato de propila são obtidos majoritariamente por fonte fóssil. (JACQUEL et al. 2008; MANTELATTO et al., 2005; MANTELATTO *et at*, 2009; KURDIKAR, 2000; MDIC, 2014).

O uso de solventes foi inicialmente descrito por Lemoigne (LEMOIGNE, 1926) e Baptist (BAPTIST, 1962), utilizando, respectivamente, *Bacillus megaterium* e *Rhodospirillum rubrum*. Segundo Byrom (1987) a solução extraída do polímero que contém mais de 5 % em massa/volume é muito viscosa e a remoção dos debrís celulares fica bastante trabalhosa. Logo, é indicado o uso de cerca de 20 partes do solvente para extrair uma parte de polímero. A separação do PHB é realizada por evaporação do solvente ou por precipitação com um não solvente. Em maior escala, recomenda-se o reciclo desse solvente para reduzir os custos de produção e o impacto ambiental.

Os agentes digestores envolvem: o hipoclorito de sódio, os surfactantes e os quelantes. O hipoclorito de sódio solubiliza material residual de biomassa, ou seja, material não PHAs. O princípio de ação dos surfactantes na parede celular de bactérias é descrito por Chen et al., 1999. O surfactante é incorporado na dupla camada de fosfolipídios da parede celular, e, quando saturado, causa o rompimento da camada seguida pela formação de miscelas. Atua como agente de solubilização de proteínas e material não PHB. Os surfactantes mais utilizados são: SDS, Triton X-100 e betaína, sendo o SDS o de melhor desempenho. Já o mecanismo de ação dos agentes quelantes envolve a formação de complexos com cátions divalentes  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , o que resulta em uma desestabilização da membrana externa liberando os lipopolissacarídeos. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é o agente mais utilizado. Essa desestabilização da membrana externa causa também um enfraquecimento da membrana interna, facilitando o processo de extração. Observa-se que o uso de agentes quelantes apresenta validade somente para as bactérias Gram-negativas (MIDDELBERG 1995 e CHEN, 1999).

A metodologia mais antiga para o uso de hipoclorito de sódio na extração de PHAs foi desenvolvida por Williamson e Wilkinson (1958). Berger et al. (1989) obtiveram uma pureza de 95 % de polímero, mas houve degradação e a massa molar do polímero foi reduzida em 50 %. Em 1990, Ramsay et al. (1990) utilizaram hipoclorito e tratamento prévio com surfactante, contudo também ocorreu degradação do material resultando em redução de até 39 % de massa molar.

Hahn *et. al* (1995) utilizaram hipoclorito de sódio (concentração 3 %, 5 %, 10 % e 20 %) e clorofórmio na proporção 1:1 a 30 °C com 1 h de tempo de extração. Na sequência o material foi centrifugado e foram formadas 3 fases, sendo a superior composta majoritariamente por hipoclorito de sódio, a fase intermediária por material não P(3HB) e a fase inferior por

clorofórmio e P(3HB). Com a mistura clorofórmio - hipoclorito 12 %, a massa molar média em número ( $\bar{M}_n$ ) foi de 770 kDa ao passo que somente com hipoclorito 12 % foi de 350 kDa, logo, a mistura apresentou menor degradação do material. Conforme Hanh et al., (1994) o clorofórmio protege as moléculas do P(3HB) da degradação causada pelo hipoclorito. Contrário ao raciocínio de “proteção” do clorofórmio, Ramsay et al. (1994) reportam degradação do polímero e extração parcial com o uso de solventes clorados (clorofórmio e 1,2-dicloroetano), atingindo de 12,5 % a 22,5 % de degradação da cadeia polimérica. Adicionalmente, conforme as curvas de distribuição de massa molar apresentadas por Gambetta (2006), existe indicação de que o clorofórmio solubilize preferencialmente as frações de baixa massa molar.

Valappil et al (2007) realizaram um dos poucos trabalhos encontrados na literatura sobre extração com clorofórmio e com a mistura clorofórmio:hipoclorito de sódio para bactérias Gram-positivas, nesse caso *Bacillus cereus*. Foram utilizadas as mesmas condições de Hanh et al., 1995. A etapa de fermentação resultou em concentração de P(3HB) acumulado no interior da bactéria de 38 % base seca.

Os resultados da extração podem ser verificados na Tabela 2.8. Valappil et al. observaram que o PHB sofreu menos degradação em *B. cereus* que nas bactérias Gram-negativas da literatura. E ainda comentam que as diferenças entre as paredes celulares Gram-positivas e negativas devem ser investigadas para um melhor entendimento.

Tabela 2.8: Resultados das extrações com clorofórmio puro e combinado com hipoclorito de sódio

<b>Extração</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Pureza (%)</b>	$\bar{M}_w$	<b>IPD</b>
Clorofórmio	82	92	882000	2,6
Hipoclorito e Clorofórmio	79	95	885000	3,1

Mw: massa molar média em peso

Fonte: VALAPPIL et al., (2007)

A Tabela 2.9 apresenta um os principais métodos de extração e parâmetros fundamentais para tomada de decisões, como tempo, custo, escala produtiva, rendimento, pureza e impacto na massa molar do biopolímero.

Tabela 2.9: Métodos extrativos com solvente

Método	Interação	Tempo Extração	Custo do produto para extração	Escala Industrial	Rendimento	Pureza	Impacto na Massa Molar
Clorofórmio	I	médio	alto	não	alto	alto	baixo
Carbonatos Cíclicos	I	médio	médio	não	médio	alto	alto
Álcoois Superiores	I	alto	(disponível na unidade como co-produto)	sim	médio	baixo-médio	médio-alto
Hipoclorito	II	médio	médio	não	médio	médio-alto	médio-alto
Clorofórmio e Hipoclorito	I e II	médio	médio-alto	não	médio-alto	alto	baixo
Ésteres	I	médio	baixo (integrado)	não	médio-alto	médio-alto	n.d.
Enzimas	II	baixo	alto	sim	alto	baixo (antes de refino)	não

Fonte: KOLLER, 2010 ; POSADA et al., 2011 , MANTELATTO *et al*, 2005; MANTELATTO et al., 2009.

Nota: interação I: solubiliza P(3HB); interação II: solubiliza material não-P(3HB); n.d. não disponível

Considerando o princípio de que “semelhante dissolve semelhante”, ésteres como solvente são uma interessante opção na extração. Mantelatto et al., 2009, reportam teores de recuperação de 62%; 88% e 86% utilizando acetato isoamílico, acetato butílico e propionato de propila, respectivamente, na extração de PHB de bactérias Gram-negativas. Em relação aos indicadores de preço, o acetato isoamílico apresenta um valor de US\$ 1380 / tonelada (t), o acetato de butila cerca de US\$ 1240 / t, propionato de propila US\$ 1410 / t e o acetato de etila US\$ 1035 / t; sendo esse último obtido totalmente por fonte de cana-de-açúcar no Brasil (Abiquim 2012; MDIC 2014).

### 2.5.3 Métodos biológicos de extração

Os métodos biológicos de extração compreendem o uso de enzimas como digestores da parede celular da bactéria. O mecanismo de ação das enzimas envolve o sistema chave-fechadura, onde cada enzima apresenta um centro ativo para “encaixe” de um substrato específico, conforme Figura 2.11. Essa especificidade das enzimas é a principal vantagem de se trabalhar com esse método. Apesar dos altos níveis de recuperação, o uso de enzimas ainda

apresenta altos custos, sendo a principal desvantagem dessa tecnologia (KAPRITCHKOFF et al., 2006).

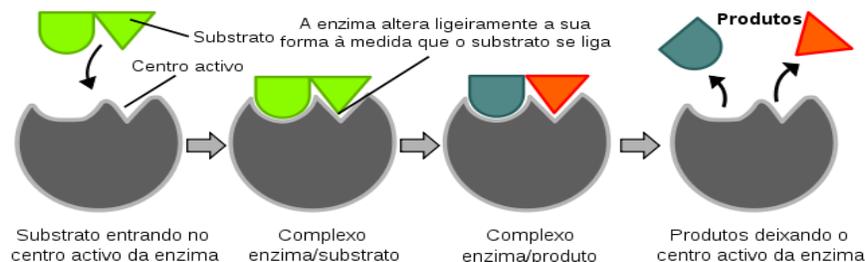


Figura 2.11: Esquema simplificado do sistema chave-fechadura do complexo enzima-substrato

A extração com enzimas foi desenvolvida pela Zeneca (subsidiária da ICI) (HOLMES, 1990) como uma alternativa para extração com solventes. Algumas variedades de enzimas como a lisozima, fosfolipase, lecitinase, proteinase e alcanase possuem ótima atividade no ataque de material não PHB e mínimos efeitos de degradação do biopolímero.

Kapritchkoff et al. (2006) investigaram a extração enzimática da biomassa de *R. eutropha*. O melhor resultado foi de 88,8 % de pureza com 2 % de bromelina (massa de enzima por biomassa), cujo custo foi de 160 R\$/kg, a 50 °C e pH 9,0.

Há estudos envolvendo métodos combinados. Utilizando protease e hipoclorito de sódio com biomassa de *Burkholderia sp.* PTU9 obteve-se rendimento de 78 % e pureza de 89 % (LU, 2006). De Koning et al. (1997) propuseram um método envolvendo tratamento por aquecimento, seguido pela enzima alcalase e SDS com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a partir de biomassa de *Pseudomonas*. Os autores obtiveram pureza superior a 95 % de PHB. Yasothe et al. (2006) utilizaram biomassa da bactéria *P. putida* com alcalase para digerir proteínas, SDS como agente para solubilizar o meio, EDTA para formação de complexos catiônicos e lisozima para digerir o peptidoglicano da parede que envolve a célula. O melhor resultado obtido apresentou 90 % de recuperação e 92,6 % de pureza em PHB.

#### 2.5.4 Outros métodos de extração

Além dos métodos discutidos nas seções prévias, outros tipos de extração já foram analisados na literatura, como o uso de fluidos em estado supercrítico – por exemplo o CO<sub>2</sub> – e métodos espontâneos de liberação do biopolímero para o meio de cultivo oriundos de modificações nos genes de microrganismos.

Fluidos supercríticos apresentam propriedades físico-químicas únicas, como alta densidade e baixa viscosidade, o que os torna muito apropriados para extrações. O gás carbônico supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) é o mais utilizado devido a sua baixa toxicidade e reatividade, temperatura e pressão críticas moderadas (31 °C e 73 atm), grande disponibilidade, baixo custo e não inflamável (HEJAZI et al., 2003, apud, JACQUEL et al., 2008). Hejazi et al. (2003) utilizaram biomassa de *Ralstonia eutropha* com CO<sub>2</sub> supercrítico para extração e obtiveram 89 % de rendimento de PHB.

O método espontâneo consiste no rompimento espontâneo da parede celular de microrganismos geneticamente modificados quando a concentração de substrato glicose tende a zero, liberando P(3HB) para o meio. Nesse caso, foi possível atingir 2 g/L de P(3HB) acumulado no interior da bactéria modificada sendo dois terços do biopolímero liberados para o meio de cultivo, ou seja, atingiu-se um rendimento de 66 % de material extraído relativo ao produzido. (HORI et al., 2002).

### **2.5.5 Escolha do método extrativo de trabalho**

O foco desse trabalho foi buscar experimentalmente um solvente oriundo de matéria-prima renovável (preferencialmente de cana-de-açúcar). A escolha pelo método de extração química com solventes frente aos métodos mecânicos e biológicos foi em função de um maior potencial em aplicação em larga escala, como na indústria. Além disso, a extração por métodos enzimáticos requer altos investimentos e são processos complexos sendo a com solventes mais competitiva do ponto de vista econômico, principalmente quando considerada a recuperação do solvente. A extração mecânica por moinho de pellets de vidro, apesar da vantagem de não necessitar da adição de produtos químicos, apresenta como desvantagem a necessidade de vários estágios de extração, o longo tempo de processo e os diversos parâmetros de controle e ajuste fino; e a mecânica por homogeneizador a alta pressão apresenta desafios como a dependência de parâmetros não somente de processo mas também de fisiologia do microrganismo e possibilidade de degradação térmica de produtos desejáveis (Kunasundari e Sudesh, 2011). Do ponto de vista técnico, a pureza e rendimento da extração variam de 60 % a 98 % para todos os métodos extrativos, sendo nesse caso o tipo de microrganismo um critério importante (JACQUEL et al., 2008). Com isso, o estudo visou também avaliar o comportamento da bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* em tais métodos.

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

O foco deste trabalho está na etapa de extração do biopolímero, porém, para obter-se biomassa pronta para avaliação da extração é primeiro necessário realizar a fermentação (cultivo) para produção do biopolímero seguida do preparo dessa biomassa. A Figura 3.1 apresenta o fluxograma geral do procedimento experimental para tal finalidade.

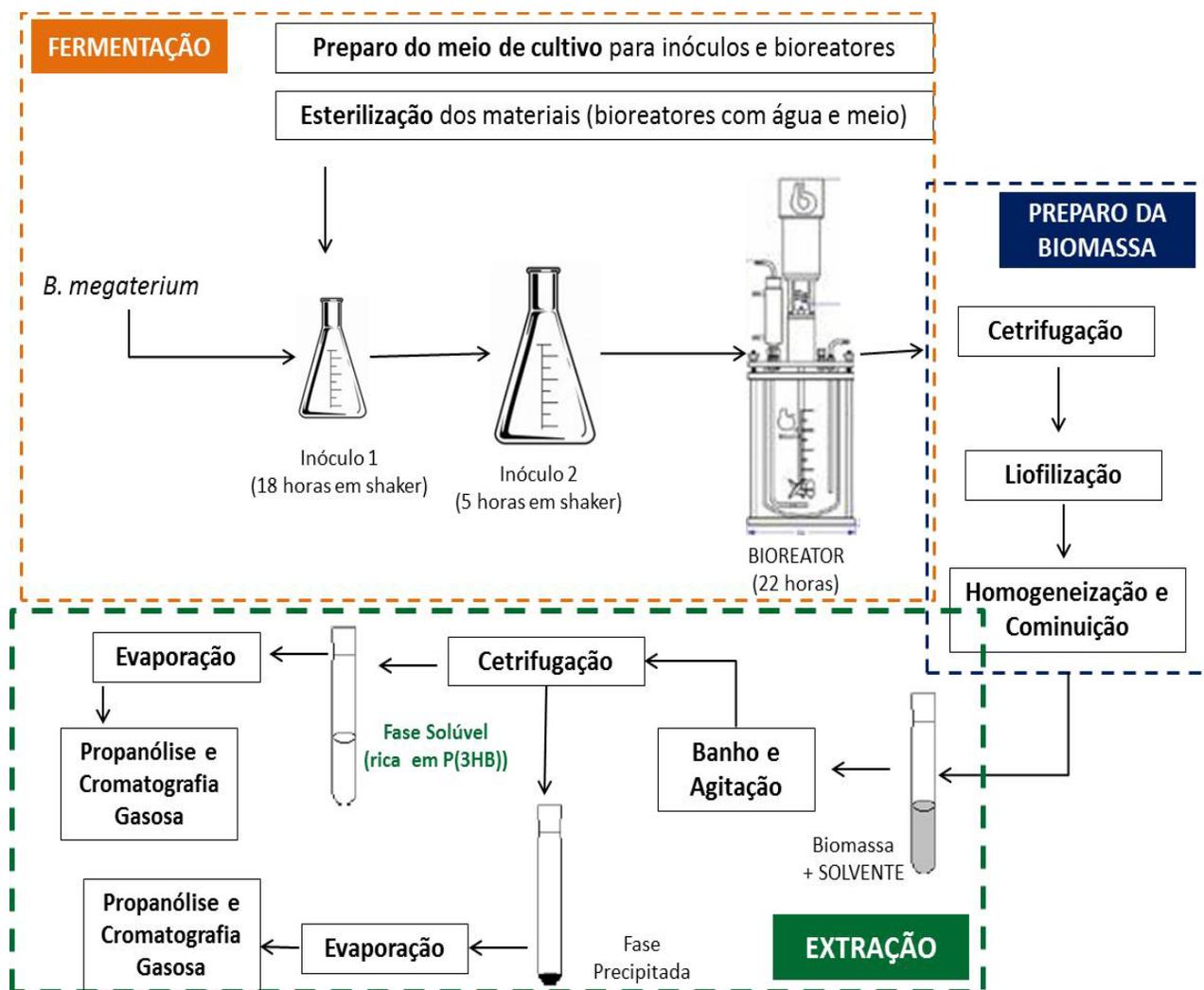


Figura 3.1: Fluxograma Geral das etapas desenvolvidas experimentalmente

Nota: exceção para hipoclorito de sódio, onde a fase solúvel é não rica em P(3HB) e a fase precipitada é rica em P(3HB)

Os materiais e métodos utilizados em cada uma das etapas descritas na Figura 3.1 são apresentados nas seções seguintes.

### **3.1 Materiais Utilizados**

Os solventes e reagentes utilizados foram o clorofórmio P.A. (ACS Vetec), álcool butílico normal P.A. (ACS Vetec), álcool isobutílico P.A. (ACS Vetec), álcool amílico normal P.A. (Vetec), álcool iso-amílico P.A. (Vetec), hipoclorito de sódio em solução 10-12% (Neon). O P(3HB) comercial poli(acido-3-hidroxi-butirico) de origem natural é do fabricante Sigma-Aldrich.

### **3.2 Microrganismo**

O microrganismo utilizado no presente estudo foi a bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* DSMZ 32<sup>T</sup> cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ pelo Prof. D.Sc Tito Lívio Moitinho Alves. A bactéria utilizada foi previamente identificada por análise de DNAr 16s. Esta bactéria é estocada em micro tubos tipo Eppendorf em solução contendo 20 % de glicerol que é utilizado como agente crio protetor e são mantidas congeladas a -18 °C. Este estoque é renovado a cada 6 meses.

### **3.3 Cultivo em biorreator para produção do P(3HB)**

Para a etapa de produção do biopolímero foi utilizada a bactéria *B. megaterium*, DSM 32<sup>T</sup>, em cultivo submerso em biorreator. Foi utilizado meio mineral com adição de sacarose (16 g/L) e sulfato de amônio (2 g/L) como fontes de carbono e nitrogênio para a bactéria, respectivamente. Adicionou-se a esse meio, 1 mL/L de solução de micronutrientes (FACCIN et al., 2012; FACCIN, 2007). A Tabela 3.1 mostra a composição do meio de cultivo empregado.

Tabela 3.1. Composição do meio mineral e da solução de micronutrientes utilizados no cultivo

<b>Meio Mineral</b>	
<b>Componente</b>	<b>Composição (g/L)</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,008
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Ácido Cítrico	0,1

<b>Solução de Micronutrientes</b>	
<b>Componente</b>	<b>Composição (g/L)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	30
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	10

Os cultivos foram realizados em biorreator de 5 L sendo 4 L de volume útil com duração de 22 h em cada batelada. A condição de operação da etapa de fermentação foi escolhida com base nos resultados de Faccin et al. (2013) temperatura de 30 °C, pH inicial igual a 7,0, rotação de 200 rpm e vazão de ar de 4 L/min, apresentados na Tabela 3.2. A Figura 3.2 ilustra o biorreator utilizado acoplado ao sistema de monitoramento e controle do processo.

Tabela 3.2: Condições dos cultivos em biorreator

<b>Condições de Cultivo em Biorreator</b>	
<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Temperatura ( °C )	30
pH inicial	7,0
Rotação ( rpm )	200
Aeração ( vvm ; L/min )	1,0; 4,0
Tempo de cultivo ( h )	22

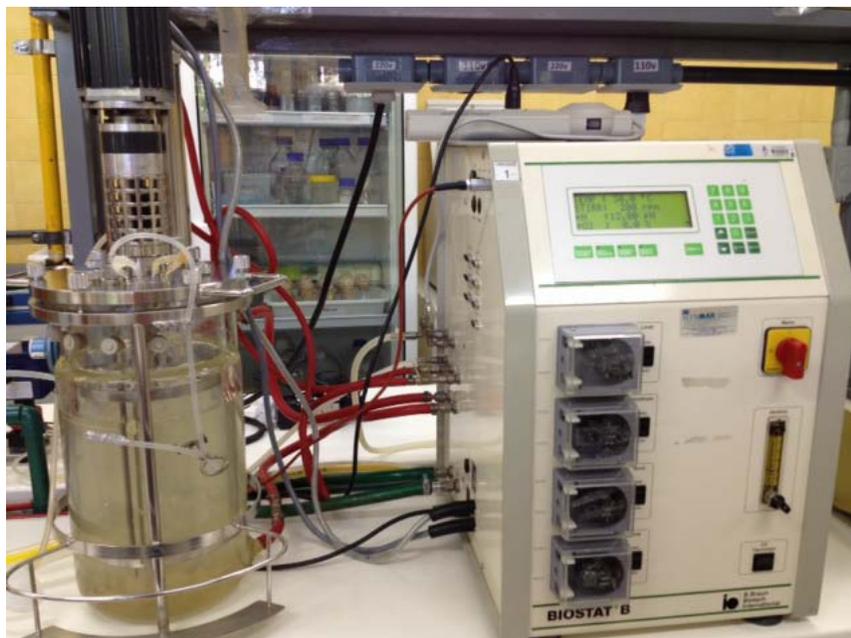


Figura 3.2. Produção de P(3HB) em biorreator

### 3.4 Preparo da Biomassa

Após as 22 h de cultivo todo o conteúdo do biorreator foi centrifugado (centrífuga Himac CR 21E Hitachi) a  $3500 \times g$  na temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, com o objetivo de se obter um precipitado composto por biomassa total, ou seja, células com biopolímeros intracelulares, e um sobrenadante composto pelo meio de cultura restante.

A biomassa foi armazenada por 48 h em ultra-freezer e logo depois liofilizada. Foi utilizado equipamento liofilizador Terroni LS6000 no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LATEPA) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS (DEQUI), mostrado na Figura 3.3.

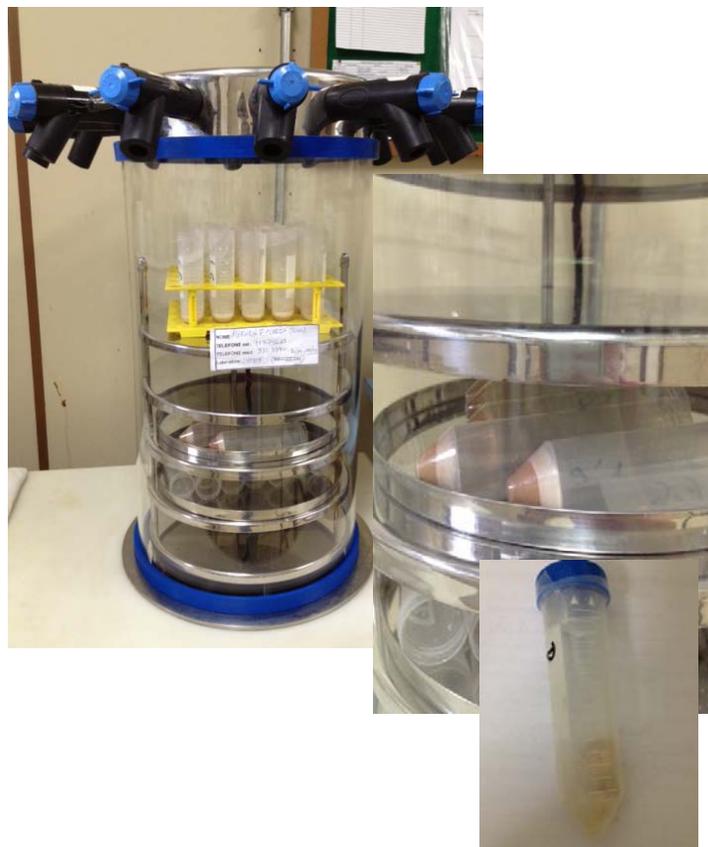


Figura 3.3: Liofilização da Biomassa

Após a liofilização a biomassa foi homogeneizada em cadinho de cerâmica e armazenada em novos tubos *falcon* a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  para os demais testes. A Figura 3.4 ilustra o estado da biomassa após cada um dos passos do preparo.



Figura 3.4: (a) biomassa liofilizada retirada dos tubos falcons. (b) biomassa em cadinho de cerâmica homogeneizada

### 3.5 Extração do P(3HB)

#### 3.5.1 Testes com solventes mais comuns da literatura para referência comparativa

Para fins comparativos, utilizou-se extração com clorofórmio, hipoclorito de sódio e a combinação dos dois solventes conforme trabalho de Valappil *et al.* (2007) com bactéria Gram-positiva. As condições dos ensaios e os principais parâmetros utilizados para temperatura ( $T$ ), volume de solvente ( $V$ ), massa inicial de biomassa ( $M_0$ ) e tempo de extração ( $t$ ) são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições dos ensaios de solventes da literatura para referência

Condição dos Ensaios	
Solventes	Parâmetros
Clorofórmio	
Hipoclorito de Sódio	$T = 37\text{ °C}; t = 1\text{ h}; V = 20\text{ mL}; M_0 = 0,2\text{ g}$
1:1 Clorofórmio: Hipoclorito de Sódio	
Clorofórmio	$T = 37\text{ °C}; t = 48\text{ h}; V = 20\text{ mL}; M_0 = 0,2\text{ g}$

A mesma metodologia experimental foi aplicada para cada solvente, conforme Figura 3.1. Esta consiste em pesagem da biomassa realizada em balança analítica seguida pela adição do volume de solvente definido em cada caso. O tubo utilizado foi de vidro borosilicato com tampa de rosca interna de teflon (fabricante Goes), para evitar ataque de solvente e para garantir boa vedação nas etapas de aquecimento, solubilização e centrifugação. Utilizou-se banho termostático Quimis nas temperaturas indicadas na Tabela 3.3. Os tubos foram agitados em vortex a cada 20 minutos. Após totalizado o tempo de extração, o conteúdo dos frascos foi centrifugado (centrífuga Cientec CT-5000R) a  $3500 \times g$  durante 15 min. O sobrenadante (fase solúvel) foi retirado com pipeta Pasteur e ambas as fases colocadas em estufa a vácuo Tecnall TE-395 até atingir peso constante. Tendo-se medido previamente o valor dos tubos vazios, as massas em cada fase foram obtidas por diferença.

### 3.5.2 Testes preliminares com solventes alcoólicos renováveis

Para solventes base renovável como isopentanol, pentanol, isobutanol e butanol foram utilizadas condições de ensaios conforme trabalho de Mantelatto et al.( 2009). As condições dos ensaios e os parâmetros utilizados são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Condições dos ensaios de solventes renováveis

Condição dos Ensaios	
Solventes	Parâmetros
Isopentanol	$T = 98\text{ }^{\circ}\text{C}; t = 1\text{ h}; V = 15\text{ mL}; M_0 = 0,5\text{ g}$
n-Pentanol	
Isobutanol	
n-Butanol	
Isopentanol	$T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}; t = 1\text{ h}; V = 15\text{ mL}; M_0 = 0,5\text{ g}$
n-Pentanol	
Isobutanol	$T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}; t = 1\text{ h}; V = 15\text{ mL}; M_0 = 0,5\text{ g}$
n-Butanol	

A metodologia foi a mesma descrita na Seção 3.5.1, salvo acima de 100 °C quando se utilizou um banho termostático Quimis - Modelo Q241M, com mistura 50:50 de glicerina e água destilada como fluido de aquecimento.

### 3.5.3 Testes de solubilidade via índice de refração

Os ensaios para análise da solubilidade do P(3HB) comercial nos solventes renováveis alcoólicos testados consistiram em colocar o biopolímero em contato com o solvente e posterior análise da fração solúvel obtida por índice de refração (Refratômetro de Abbe, Carl Zeiss/Jena). Primeiramente colocou-se 0,25 g do biopolímero comercial em contato com o solvente, mergulhados em banho com uma temperatura fixada de 25 °C e 110 °C, conforme Tabela 3.5, por um tempo de 2 h e com agitação periódica.

Tabela 3.5: Condições utilizadas nos ensaios de solubilidade

<b>Descritivo</b>
Com P(3HB) comercial e $T = 110^{\circ}\text{C}$
Com P(3HB) comercial e $T = 25^{\circ}\text{C}$
Solvente puro e $T = 110^{\circ}\text{C}$
Solvente puro e $T = 25^{\circ}\text{C}$

### 3.5.4 Testes preliminares com acetato de etila

Para avaliar o grau de solubilização do P(3HB) em acetato de etila, éster escolhido para o estudo, foi utilizado o planejamento de experimentos descrito na Tabela 3.6. A massa de polímero comercial utilizado em todos os experimentos foi de 0,1 g.

Tabela 3.6. Experimentos Preliminares de Pontos de Saturação

Número do Experimento	X1	X2	X3	X1 t (h)	X2 T ( $^{\circ}\text{C}$ )	X3 V/M (mL/g)	Número Repetições
EXP 1	-1,68	-1,68	0	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>200</b>	2
EXP 2	-1,68	-1	0	<b>2</b>	<b>46</b>	<b>200</b>	2
EXP 3	-1,68	0	0	<b>2</b>	<b>55</b>	<b>200</b>	2
EXP 4	-1,68	1	0	<b>2</b>	<b>64</b>	<b>200</b>	2
EXP 5	-1,68	1,68	0	<b>2</b>	<b>70</b>	<b>200</b>	2
EXP 6	1,68	-1,68	0	<b>12</b>	<b>40</b>	<b>200</b>	2
EXP 7	1,68	-1	0	<b>12</b>	<b>46</b>	<b>200</b>	2
EXP 8	1,68	0	0	<b>12</b>	<b>55</b>	<b>200</b>	2
EXP 9	1,68	1	0	<b>12</b>	<b>64</b>	<b>200</b>	2
EXP 10	1,68	1,68	0	<b>12</b>	<b>70</b>	<b>200</b>	2

Estes testes preliminares foram utilizados para determinar as concentrações de saturação das soluções de P(3HB) em acetato de etila nas diferentes temperaturas a serem utilizadas na etapa seguinte (planejamento fatorial completo). Assim, o cálculo da concentração máxima de biomassa a ser utilizada nos testes a serem realizados de acordo ao planejamento experimental completo foi feito com base na condição mais desfavorável (EXP1), de modo a garantir que não

ocorresse precipitação do polímero e que todos os experimentos estivessem em condições equivalentes de comparação. A equação Equação 2 expressa a massa máxima de biomassa:

$$M_{max} = M_{EXP1} * \frac{1}{R_{mPHB}} * \frac{V_{min}}{1000} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

$M_{max}$  é teor limite de massa de biomassa (g)

$M_{EXP1}$  é a massa de PHB comercial solubilizada no ponto EXP1 (g)

$R_{mPHB}$  é o rendimento médio do biopolímero na biomassa homogeneizada produzida (%)

$V_{min}$  é o volume mínimo de solvente utilizado no planejamento completo, igual a 10 mL

### 3.5.5 Planejamento de Experimentos com solvente escolhido

Com a finalidade de determinar o tempo, a temperatura e a razão volume de solvente: massa de biopolímero ótimos foi realizado um planejamento composto central ortogonal dividido em blocos. Os valores codificados e não codificados das variáveis para tal planejamento são mostrados na Tabela 3.7. Os pontos laterais e axiais foram feitos em duplicata sendo o ponto central realizado em 4 réplicas, sendo uma para cada um dos 4 blocos delas em que foi dividido o experimento, conforme representado na Tabela 3.8.

Tabela 3.7: Pontos do Planejamento fatorial  $2^3$

Variáveis	Níveis				
	-1,76	-1	0	1	1,76
tempo (h) ( $X_1$ )	2	4,1	7	9,9	12
temperatura (°C) ( $X_2$ )	40	46,3	55	63,7	70
Razão: volume de solvente por massa de biopolímero ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ) ( $X_3$ )	840	1193	1681	2168	2521

Tabela 3.8: Planejamento fatorial  $2^3$  dividido em blocos

Ensaio	Dia (bloco)	$X_1$	$X_2$	$X_3$	t (h)	T (° C)	V / M (mL / g)
1	1	-1,0	-1,0	-1,0	4	46	1193
2	1	-1,0	-1,0	1,0	4	46	2168
3	1	-1,0	1,0	-1,0	4	64	1193
4	1	-1,0	1,0	1,0	4	64	2168
5	1	1,0	-1,0	-1,0	10	46	1193
6	1	1,0	-1,0	1,0	10	46	2168
7	1	1,0	1,0	-1,0	10	64	1193
8	1	1,0	1,0	1,0	10	64	2168
9	1	0,0	0,0	0,0	7	55	1681
10	2	-1,76	0,0	0,0	2	55	1681
11	2	1,76	0,0	0,0	12	55	1681
12	2	0,0	-1,76	0,0	7	40	1681
13	2	0,0	1,76	0,0	7	70	1681
14	2	0,0	0,0	-1,76	7	55	840
15	2	0,0	0,0	1,76	7	55	2521
16	2	0,0	0,0	0,0	7	55	1681
17	3	-1,0	-1,0	-1,0	4	46	1193
18	3	-1,0	-1,0	1,0	4	46	2168
19	3	-1,0	1,0	-1,0	4	64	1193
20	3	-1,0	1,0	1,0	4	64	2168
21	3	1,0	-1,0	-1,0	10	46	1193
22	3	1,0	-1,0	1,0	10	46	2168
23	3	1,0	1,0	-1,0	10	64	1193
24	3	1,0	1,0	1,0	10	64	2168
25	3	0,0	0,0	0,0	7	55	1681
26	4	-1,76	0,0	0,0	2	55	1681
27	4	1,76	0,0	0,0	12	55	1681
28	4	0,0	-1,76	0,0	7	40	1681
29	4	0,0	1,76	0,0	7	70	1681
30	4	0,0	0,0	-1,76	7	55	840
31	4	0,0	0,0	1,76	7	55	2521
32	4	0,0	0,0	0,0	7	55	1681

O planejamento experimental descrito na Tabela 3.8 foi aplicado para biomassa e para P(3HB) comercial, para fins comparativos e avaliação da influência da parede celular da bactéria, que representa uma resistência adicional no processo de extração. No planejamento com biomassa, as variáveis de resposta foram o rendimento em P(3HB) extraído e a pureza obtida no

processo. Já para o planejamento com biopolímero comercial a variável de resposta é a quantidade de P(3HB) solubilizada na fase extrato.

Em todos os casos, a análise estatística dos resultados foi feita utilizando o software Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

### **3.6 Métodos Analíticos**

#### **3.6.1 Determinação de biomassa resultante da fermentação**

Para quantificação de biomassa total produzida nos cultivos foi utilizada medida gravimétrica (massa seca). Foram coletadas amostras em duplicata (10 mL) dos cultivos, centrifugadas a 3500×g, lavadas e colocadas em estufa a 80 °C até atingirem peso constante. Tendo-se medido previamente a massa de cada frasco vazio, o valor de biomassa total foi determinado como a diferença entre o valor pesado e o do frasco vazio.

#### **3.6.2 Determinação do teor biopolímero P(3HB) e do rendimento de biopolímero P(3HB) na extração**

A quantificação do P(3HB) é obtida através do método de propanólise seguida por cromatografia gasosa. O procedimento consiste em colocar cerca de 40 mg de células secas em um frasco, adicionar 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol e 2 µL de solução padrão interno, composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco, hermeticamente fechado, é deixado em banho a 100 °C por 2 h com agitação intermitente e, então, resfriado até atingir temperatura ambiente, quando se adiciona 4 mL de água destilada. A fase orgânica resultante é analisada por cromatografia gasosa. Foi construída uma curva de calibração, correlacionando-se as áreas de massas conhecidas de P(3HB) padrão com a área de padrão interno (RIIS e MAY, 1988). Foi utilizado o cromatógrafo gasoso da marca Perkin Elmer com detector de ionização de chama utilizando coluna capilar Pe-WAX 30 m × 0,25 mm da central analítica do DEQUI. Com essa metodologia determinou-se a quantidade (teor) de P(3HB) contido na biomassa homogeneizada resultante do cultivo bem como o teor de P(3HB) em cada

fase (solúvel e precipitada) resultante de extração, sendo que para a fase solúvel o teor de P(3HB) é denominado pureza da extração, calculada em relação a massa de biopolímero inicial.

O rendimento da extração do biopolímero é calculado como a razão entre a massa de P(3HB) da fase solúvel dividida pela massa de P(3HB) da biomassa inicial.

## Capítulo 4 - Resultados e Discussão

A partir de 9 cultivos realizados, tendo sido dois deles descartados devido à contaminação do meio, um total de 65,15 g de biomassa foi produzida. Esse total de biomassa foi homogeneizado e preparado conforme descrito na Seção 3.4. Por meio de análise por cromatografia gasosa, determinou-se que a biomassa obtida continha uma fração mássica de P(3HB) de 42,5 %, em base seca.

Nas seções seguintes são descritos os resultados obtidos nos diferentes testes de solubilização e extração utilizando a biomassa obtida e, em alguns casos específicos, P(3HB) comercial.

### 4.1 Extração com solventes mais comuns citados na literatura

Em todas as extrações realizadas (inclusive naquelas discutidas nas próximas seções), após a etapa de evaporação do solvente realizada em estufa, o P(3HB) extraído apresentava-se na forma de um filme depositado sobre a parede do tubo de centrifugação. Este filme pode em todos os casos ser removido facilmente com a utilização de uma pinça, como mostra a Figura 4.1.



Figura 4.1: Ilustração de filme de P(3HB) resultante da extração com combinação clorofórmio e hipoclorito de sódio

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de rendimento e pureza obtidos na extração com clorofórmio, hipoclorito de sódio e uma mistura 1:1 de clorofórmio com hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos na extração com clorofórmio em 48 h foram maiores que aqueles reportados por Valappil et. al (2007) nas mesmas condições (rendimento de 82,0 % e pureza de 92 %). No caso da extração com a mistura de clorofórmio e hipoclorito de sódio, a pureza obtida pelos referidos autores (95 %) foi da mesma ordem de grandeza que a apresentada na Tabela 4.1, porém o rendimento obtido foi superior (79 %). Sendo a mesma proporção de biomassa e solvente utilizadas, uma possível origem para tal diferença de rendimento poderia estar associada à saturação da solução obtida na extração, visto que a biomassa utilizada no presente trabalho apresenta maior percentual de P(3HB) acumulado, 42,5 %, que aquela utilizada por Valappil et. al (2007), 38 %.

Tabela 4.1: Resultados com clorofórmio e hipoclorito de sódio

Solvente	Tempo (h)	Rendimento		Pureza	
		Presente Trabalho	Valappil et. al (2007)	Presente Trabalho	Valappil et. al (2007)
Clorofórmio	1	23,7 %	--	87,6 %	--
Hipoclorito de sódio	1	86,1 %	--	56,9 %	--
1:1 Clorofórmio: Hipoclorito de Sódio	1	64,3 %	79,0 %	94,6 %	95,0 %
Clorofórmio	48	~ 100 %	82,0 %	~ 100 %	92,0 %

## 4.2 Testes com solventes alcoólicos renováveis

Em todos os ensaios realizados com isopentanol, n-pentanol, n-butanol e isobutanol (Tabela 4.4) observou-se que estes solventes promoveram apenas inchamento da biomassa, conforme ilustrado na Figura 4.2.

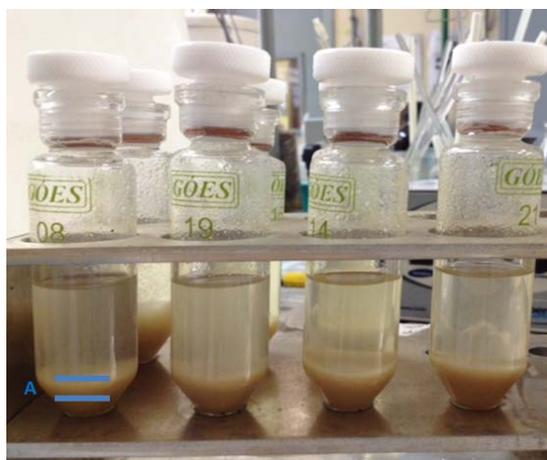


Figura 4.2: Ensaio com solventes alcoólicos – inchamento da biomassa , (A) fração de inchamento após 1 h.

O fato de que os solventes alcoólicos não promoveram extração satisfatória pode ser observado na Figura 4.3, que mostra as quantidades de fase refinado (precipitado) e de material sólido contido na fase extrato (solúvel) para o caso da extração com butanol. Observa-se que a quantidade de material extraído foi extremamente pequena. O mesmo comportamento foi observado com os outros três álcoois testados.

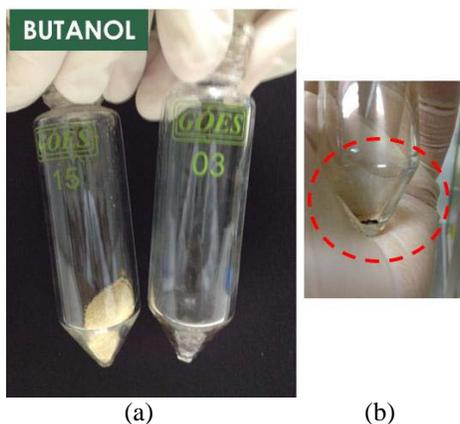


Figura 4.3: Produtos da extração com butanol: (a) fase refinado (Tubo 15) e material sólido obtido após evaporação do solvente da fase extrato (Tubo 03) e (b) ampliação do pellet do Tubo 03.

Esses resultados indicam baixa solubilidade dos solventes considerados ou tempo insuficiente de extração. Sendo assim, tentou-se primeiramente aumentar o tempo de extração para 24 h. Mesmo assim não ocorreu solubilização quantificável. Com isso, decidiu-se investigar mais detalhadamente a solubilidade do P(3HB) nos solventes em estudo.

A Tabela 4.2 mostra os valores de índice de refração e de concentração (° Brix) obtidos no refratômetro para as soluções preparadas n-pentanol e isopentanol. Observa-se que na comparação entre solvente e solução, as variações registradas nas duas variáveis consideradas foram extremamente baixas, indicando que o P(3HB) não solubiliza nos solventes testados nessas condições. Resultados similares foram obtidos com n-butanol e isobutanol.

Tabela 4.2: Resultados de IR (índice de refração) e concentração (° Brix)

Isopentanol	IR		° Brix	
	1	2	1	2
Solvente puro e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4010	1,4010	40,6	40,6
Solvente puro e $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4005	1,4008	40,4	40,5
Com P(3HB) comercial e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4000	1,4009	40,1	40,6
Com P(3HB) comercial e $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4001	1,4005	40,2	40,4
Pentanol	IR		° Brix	
	1	2	1	2
Solvente puro e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4031	1,4030	41,7	41,6
Solvente puro e $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4029	1,4030	41,5	41,6
Com P(3HB) comercial e $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4025	1,4021	41,4	41,2
Com P(3HB) comercial e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	1,4021	1,4022	41,2	41,3

Nota: onde 1 e 2 indicam o número de repetições

A literatura apresenta indicações de estudos com os solventes alcoólicos, como óleo fusel e álcool isoamílico avaliados pela empresa PHB Industrial – no qual não foi discriminado o tipo de PHA. Os trabalhos de Mantelatto et al. (2009), indicaram rendimento próximo a 95 % de extração em três estágios do PHB contido na concentração de 60-75 % no interior de *A. eutrophus* empregando álcool isomamílico – não foi reportada a pureza e nem o monômero produzido. De qualquer maneira, a solubilidade do P(3HB) em álcool isomamílico é muito baixa, conforme demonstrado por Mantelatto, (2011).

Considerando os resultados apresentados, decidiu-se buscar outro solvente oriundo de matéria-prima renovável, optando-se por testar o desempenho do acetato de etila, devido à sua similaridade de natureza química com relação ao P(3HB) e menor custo frente aos demais ésteres.

### 4.3 Testes preliminares com acetato de etila

Em nenhum dos testes preliminares de solubilização do P(3HB) comercial no acetato de etila, realizados conforme o planejamento de experimentos da Tabela 3.6, ocorreu solubilização completa da massa de polímero utilizada, observando-se a formação de precipitado. A massa solubilizada em cada uma das condições testadas é apresentada graficamente na Figura 4.4. Para todas as temperaturas, a quantidade de polímero varia como uma função do tempo, indicando que mesmo em 12 h de processo a solubilização total não foi atingida – com isso, os valores apresentados não podem ser utilizados como solubilidade do P(3HB) comercial em acetato de etila. Neste caso, os valores indicam o teor máximo de polímero solubilizado nos tempos de processamento e nas dadas temperaturas. Nota-se, por exemplo, que para a temperatura de 55 °C e 2 h de extração, o limite de biopolímero extraído no solvente é de 1,3 g/L. Na Figura 4.4, observa-se ainda que o aumento de 10 h no tempo de contato gerou, ao longo da faixa de temperaturas analisadas, um incremento médio de apenas 13 %.

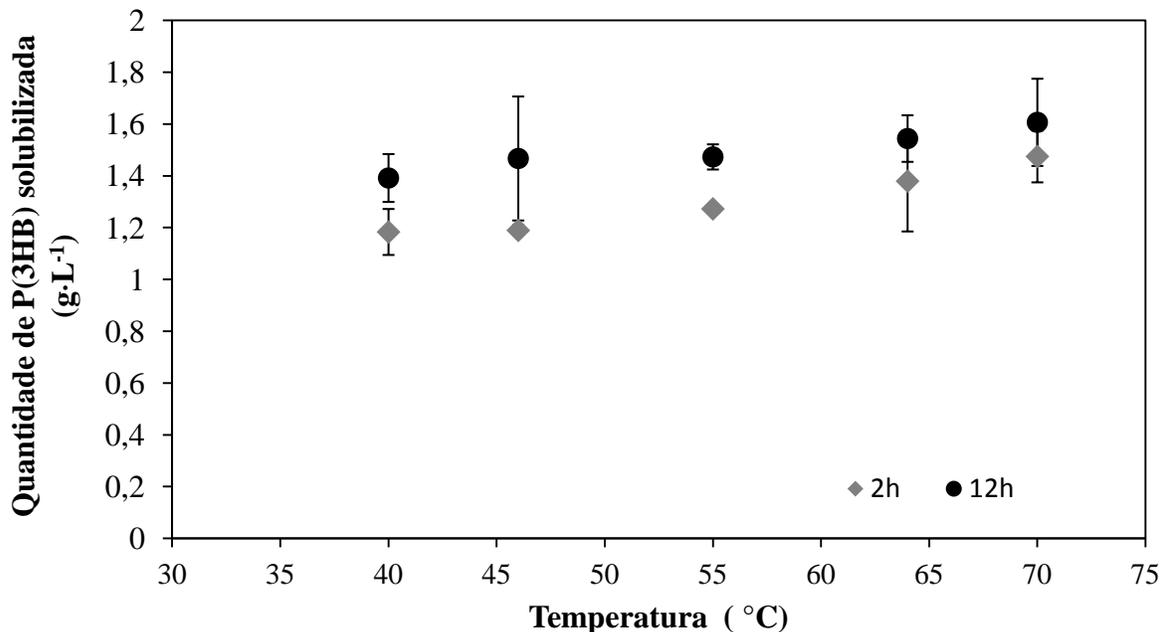


Figura 4.4: Massa de P(3HB) comercial solubilizada em função da temperatura para tempos de contato de 2 h e 12 h

Estes resultados foram tomados como referência para estabelecer a massa de biomassa a ser utilizada nos testes de extração do biopolímero com acetato de etila, aplicando-se a Equação 2. Para tal fim, utilizou-se como base de cálculo o pior cenário, ou seja, o valor de 1,2 g de P(3HB) solubilizado por litro de acetato de etila, obtido a 40 °C e 2 h de contato.

#### 4.4 Resultados do planejamento de experimentos com o solvente escolhido

Buscando-se identificar a importância de cada variável independente nas variáveis de resposta rendimento e pureza da extração do P(3HB) de biomassa, bem como solubilização de P(3HB) comercial realizou-se o planejamento de experimentos descrito na Seção 3.5.5. Obteve-se para cada variável dependente o modelo descrito pela Equação 3:

$$Z = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_{33} \cdot X_3^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $Z$  representa a variável de resposta (rendimento da extração de P(3HB) ou pureza do P(3HB) extraído ou solubilização de P(3HB) comercial) e  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são as variáveis codificadas normalizadas correspondentes a tempo ( $t$ ), temperatura ( $T$ ) e razão volume de solvente : massa de biopolímero ( $V/M$ ), respectivamente.

Os coeficientes do modelo para cada variável de resposta são apresentados na Tabela 4.3, juntamente com o valor correspondente de probabilidade  $p$ . Os coeficientes que não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ) foram descartados do modelo. Além disso, são apresentados os parâmetros para avaliar o ajuste do modelo. É importante ressaltar que os coeficientes de regressão na Tabela 4.3 foram apresentados considerando o modelo expresso em termos de variáveis codificadas, o que permite uma comparação mais direta da importância relativa de cada efeito.

Tabela 4.3: Coeficientes de regressão das variáveis codificadas para rendimento, pureza de P(3HB) de biomassa de *B. megaterium* e solubilização de P(3HB) comercial

Rendimento P(3HB) de biomassa			PurezaP(3HB) de biomassa			Solubilização P(3HB) comercial			
	Coeficiente	<i>p-value</i>		Coeficiente	<i>p-value</i>		Coeficiente	<i>p-value</i>	
$\beta_0$	$7,423 \times 10^{-01} \pm 1,3 \times 10^{-03}$	$0,0 \times 10^{-00}$		$6,450 \times 10^{-01} \pm 3,8 \times 10^{-03}$	$0,0 \times 10^{-00}$		$8,589 \times 10^{-01} \pm 1,6 \times 10^{-03}$	$0,0 \times 10^{-00}$	
$\beta_1$	$6,538 \times 10^{-03} \pm 1,4 \times 10^{-03}$	$9,9 \times 10^{-05}$	-	-	-		$5,409 \times 10^{-03} \pm 1,7 \times 10^{-03}$	$3,3 \times 10^{-03}$	
$\beta_{11}$	-	-	-	$-6,216 \times 10^{-03} \pm 1,8 \times 10^{-03}$	$2,0 \times 10^{-03}$		-	-	
$\beta_2$	$4,686 \times 10^{-03} \pm 1,4 \times 10^{-03}$	$2,8 \times 10^{-03}$		$4,308 \times 10^{-03} \pm 1,5 \times 10^{-03}$	$7,2 \times 10^{-03}$		-	-	
$\beta_{22}$	-	-	-	$-6,384 \times 10^{-03} \pm 1,8 \times 10^{-03}$	$1,6 \times 10^{-03}$		-	-	
$\beta_3$	$1,751 \times 10^{-02} \pm 1,4 \times 10^{-03}$	$3,6 \times 10^{-12}$		$1,089 \times 10^{-02} \pm 1,5 \times 10^{-03}$	$1,4 \times 10^{-07}$		$1,892 \times 10^{-02} \pm 1,7 \times 10^{-03}$	$1,5 \times 10^{-11}$	
$\beta_{33}$	-	-	-	$-8,663 \times 10^{-03} \pm 1,8 \times 10^{-03}$	$6,6 \times 10^{-05}$		-	-	
$\beta_{12}$	-	-	-	-	-		-	-	
$\beta_{13}$	-	-	-	-	-		-	-	
$\beta_{23}$	-	-	-	-	-		-	-	
<b>Blocks</b>	-	-	$1,23 \times 10^{-07}$	-	-	$4,44 \times 10^{-05}$	-	-	$3,476 \times 10^{-05}$
<b>Regressão</b>									
<b>p-value</b>	$5,119 \times 10^{-12}$			$9,497 \times 10^{-08}$			$9,354 \times 10^{-11}$		
<b>F</b>	43,303			16,150			35,041		
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9122			0,849			0,871		

Verifica-se que para o rendimento de P(3HB) os termos significativos do modelo foram os termos lineares relativos a tempo de extração, temperatura do processo e volume de solvente por grama de biomassa. Para facilitar a visualização dos efeitos, a Figura 4.5 apresenta as superfícies de resposta para o rendimento de P(3HB) obtidas com os coeficientes significativos do modelo de regressão (Equação 3) reportados na primeira coluna de coeficientes da Tabela 4.3. É importante salientar que o aumento máximo no rendimento com a variação do tempo de extração de 2 h para 12 h foi de aproximadamente 4 % (de 72 % para 76 %).

Todos os três termos influenciam na resposta de modo positivo, ou seja, aumentando as variáveis  $t$ ,  $T$ , e  $V/M$ , aumenta-se o rendimento da extração. Adicionalmente, observa-se que a variável de maior influência é o volume. Os valores obtidos para valor- $p$  da regressão ( $5,119 \times 10^{-12}$ ) e para o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,91$ ) indicam que o modelo permitiu um ajuste adequado dos dados, sendo capaz de explicar 91 % da variabilidade dos resultados experimentais.

Com relação à pureza do P(3HB), as três variáveis consideradas apresentaram efeito significativo. Para temperatura e razão volume de solvente : massa de biopolímero, tanto o termo linear como o quadrático foram significativos, enquanto que para o tempo o único efeito significativo foi o quadrático. Nota-se que todos os coeficientes dos termos quadráticos foram negativos, indicando que as curvas possuem um ponto de máximo, enquanto os lineares foram positivos. O modelo de regressão resultante apresentou 84,8 % de capacidade de descrever a variabilidade do sistema. As superfícies de resposta obtidas com o modelo de regressão são apresentadas na Figura 4.6. Diferentemente do que ocorreu para o rendimento (Figura 4.5), no caso da pureza do produto da extração observa-se a ocorrência de um ponto de máximo, em torno de 64 % de pureza, nas condições de 60 °C e 900 mL/g de solvente, com pequena influência do tempo total de extração.

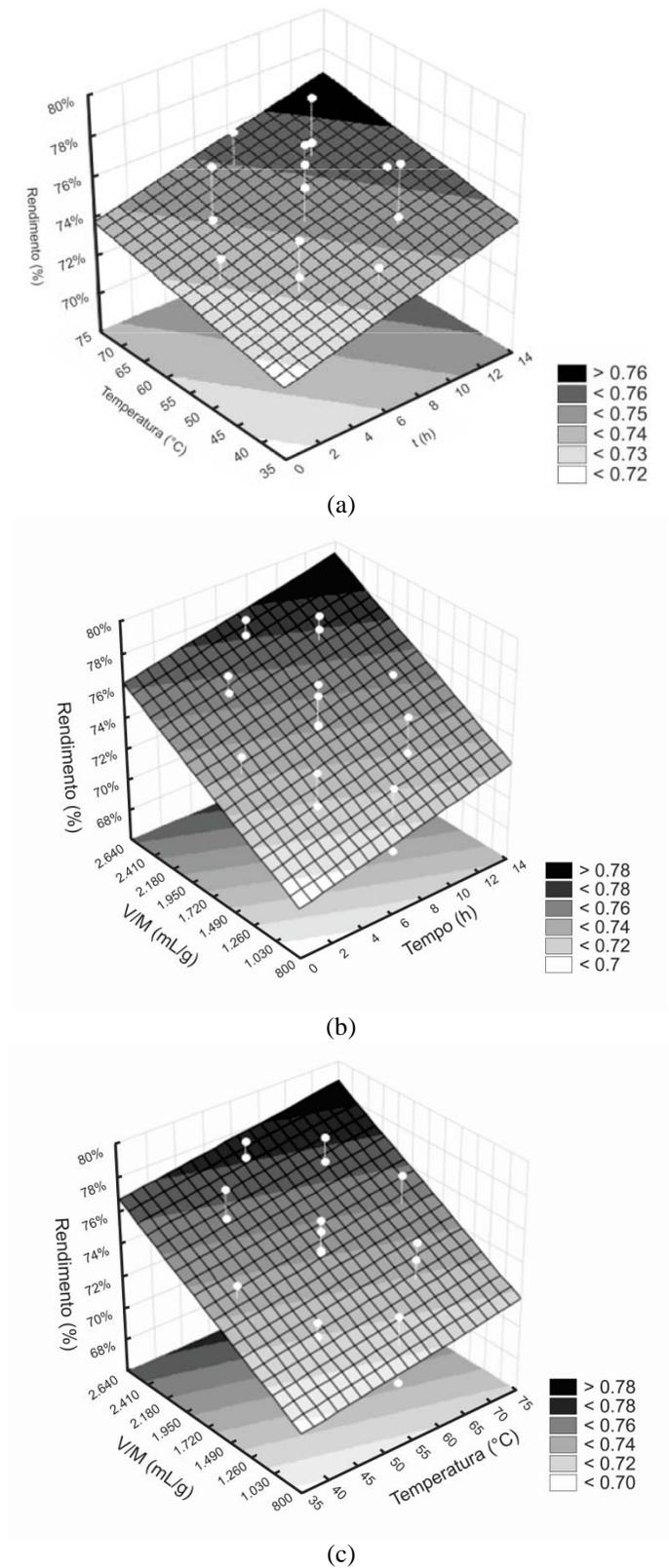


Figura 4.5: Superfícies de resposta para o rendimento de extração de P(3HB): a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura

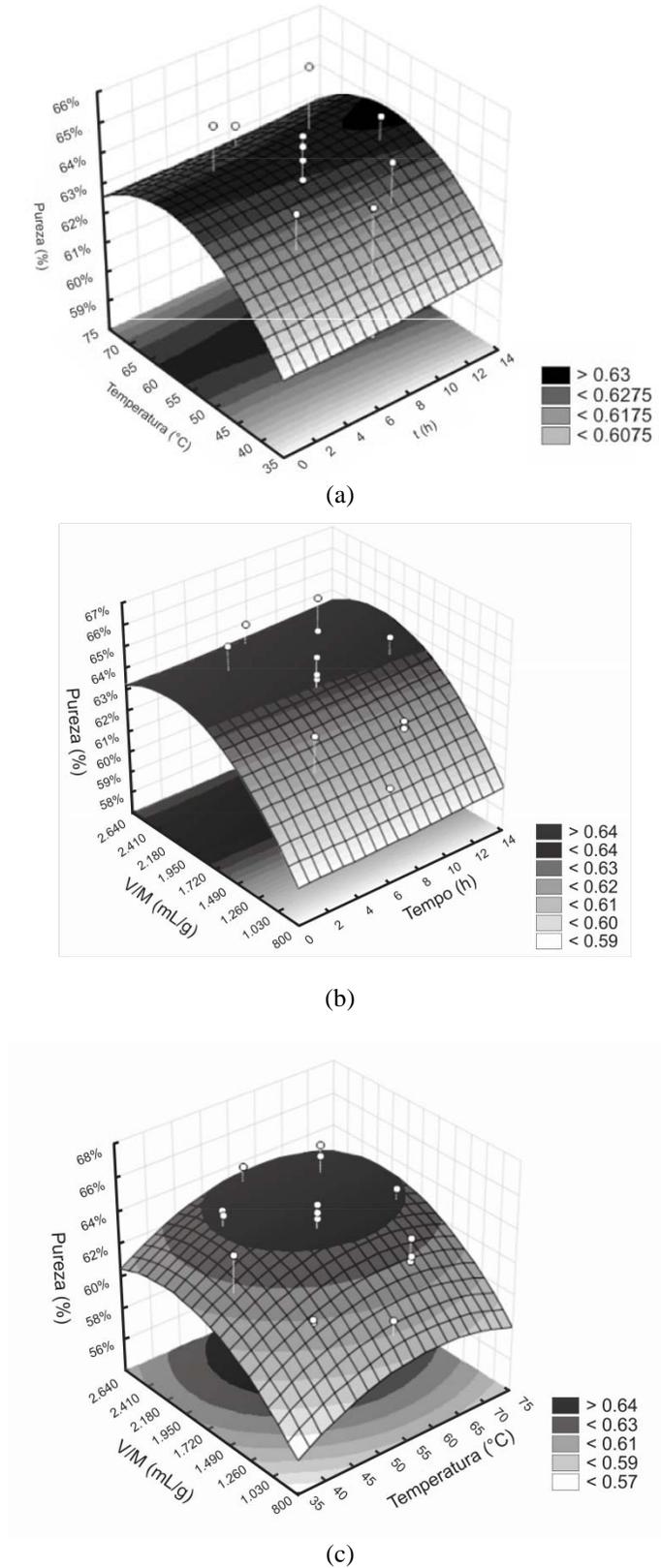


Figura 4.6: Superfícies de resposta para a pureza de extração de P(3HB): a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura

Deve-se ainda ressaltar que enquanto o modelo estatístico para o rendimento indica aumento linear desta variável de resposta com o aumento das variáveis de entrada, o modelo estatístico para a pureza indica a existência de um valor ótimo de temperatura para o processo, a partir do qual o solvente passa a solubilizar outros materiais diferentes do de interesse, reduzindo a pureza do P(3HB), o que é indesejável. Portanto, sugere-se uma avaliação econômica para auxiliar tomadas de decisão com base no ponto ótimo de produtividade do sistema e no custo operacional. Essa avaliação deve levar em consideração uma análise combinada do rendimento e da pureza de extração, uma vez que a variável temperatura é relacionada com energia consumida, o volume com consumo de solvente e o tempo com a produtividade do processo.

No caso da solubilização do P(3HB) comercial, somente os termos lineares de tempo e volume foram significativos no modelo, sendo os dois efeitos positivos. O modelo de regressão apresenta  $R^2$  de 0,87. A Figura 4.7 ilustra a superfície de resposta da solubilização, onde, semelhante a análise para rendimento, nota-se correlação linear, sendo que para essa a temperatura não apresenta influencia significativa.

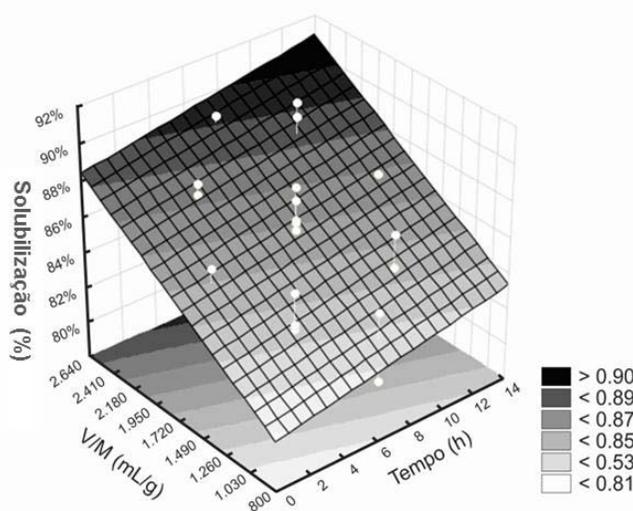


Figura 4.7: Efeito das variáveis V/M e tempo na solubilização de P(3HB) comercial

Na comparação dos modelos finais obtidos para as três variáveis de resposta, um aspecto importante que se destaca é o fato de que, apesar de tanto o rendimento da extração como a solubilização do P(3HB) comercial terem apresentado somente efeitos lineares, a temperatura foi identificada como variável de efeito significativo somente para o rendimento da extração. A

influência não significativa desta variável na solubilização do P(3HB) comercial indica que a quantidade de polímero solubilizada está limitada pela solubilidade do solvente, e que a variação do grau de solubilização com a temperatura não é suficiente para sobrepor esta limitação. Esta hipótese é suportada pelo grande efeito do volume de solvente sobre a solubilização.

Adicionalmente, deve-se lembrar que a proporção (massa inicial de polímero)/(massa de solvente disponível) utilizada, em um dado nível de solvente do planejamento, foi a mesma nos testes de extração e de solubilização. Sendo assim, o fato de que os valores de rendimento de extração foram, em todos os casos, inferiores aos de solubilização para condições equivalentes de teste e de que a diferença entre esses valores diminuiu com o aumento da temperatura sugerem que: (i) a parede celular representa uma resistência adicional significativa no processo de extração; (ii) o aumento da temperatura melhora o rendimento pelo aumento da taxa de transferência de massa através da parede celular ou mesmo a algum nível de ruptura celular provocado pelo aumento da temperatura.

A Tabela 4.4 foi obtida a partir dos resultados dos experimentos para os casos onde as variáveis tempo e razão volume de solvente:massa de biopolímero eram constantes e a temperatura variava; com isso, calculou-se a fração entre resultado de rendimento de extração e de solubilização, R/S.

Tabela 4.4: Coeficientes de regressão das variáveis codificadas para a fração entre R/S

<b>Variável de Resposta Fração R/S</b>				
	<b>Coeficiente</b>			<b>valor-p</b>
$\beta_0$	$8,63 \times 10^{-01}$	$\pm$	$9,30 \times 10^{-04}$	$0,00 \times 10^{-00}$
$\beta_1$	$2,24 \times 10^{-03}$	$\pm$	$1,44 \times 10^{-03}$	$4,93 \times 10^{-03}$
$\beta_{11}$	-		-	-
$\beta_2$	$2,50 \times 10^{-03}$	$\pm$	$1,44 \times 10^{-03}$	$2,06 \times 10^{-03}$
$\beta_{22}$	-		-	-
$\beta_3$	$1,33 \times 10^{-03}$	$\pm$	$1,44 \times 10^{-03}$	$7,83 \times 10^{-02}$
$\beta_{33}$	$1,69 \times 10^{-03}$	$\pm$	$1,54 \times 10^{-03}$	$3,756 \times 10^{-02}$
$\beta_{12}$	-		-	-
$\beta_{13}$	$-2,95 \times 10^{-03}$	$\pm$	$1,88 \times 10^{-03}$	$4,56 \times 10^{-03}$
$\beta_{23}$	-		-	-
<b>Blocks</b>	-			$2,5 \times 10^{-05}$
<b>Regressão</b>				
<b>valor-p</b>			$1,60 \times 10^{-05}$	
<b>F</b>			8,99	
<b>R<sup>2</sup></b>			0,76	

Verifica-se que para a fração R/D que os termos significativos do modelo foram os lineares relativos às três variáveis analisadas, o quadrático relativo à razão volume de solvente : massa de biopolímero e o termo combinado de tempo e razão; sendo esse último negativo. O modelo de regressão resultante apresentou 75,8 % de capacidade de descrever a variabilidade do sistema. A Figura 4.8 ilustra as superfícies de resposta para esse sistema. Nota-se que R/D aumenta com o tempo e com a temperatura, ou seja, quanto maior o tempo e a temperatura mais parecidos são os resultados entre extração do biopolímero da biomassa e solubilização do P(3HB) comercial, indicando que a resistência à extração do polímero da parede celular diminui com o aumento da temperatura. Cabe ressaltar a influência da razão volume: biopolímero para pequenos volumes de solvente onde o tempo possui grande influência, sendo que a medida que o tempo aumenta, a R/D aumenta também, ou seja, diminui a diferença entre a extração e a solubilização. Para grandes volumes de solvente, o tempo influencia pouco na relação R/D.

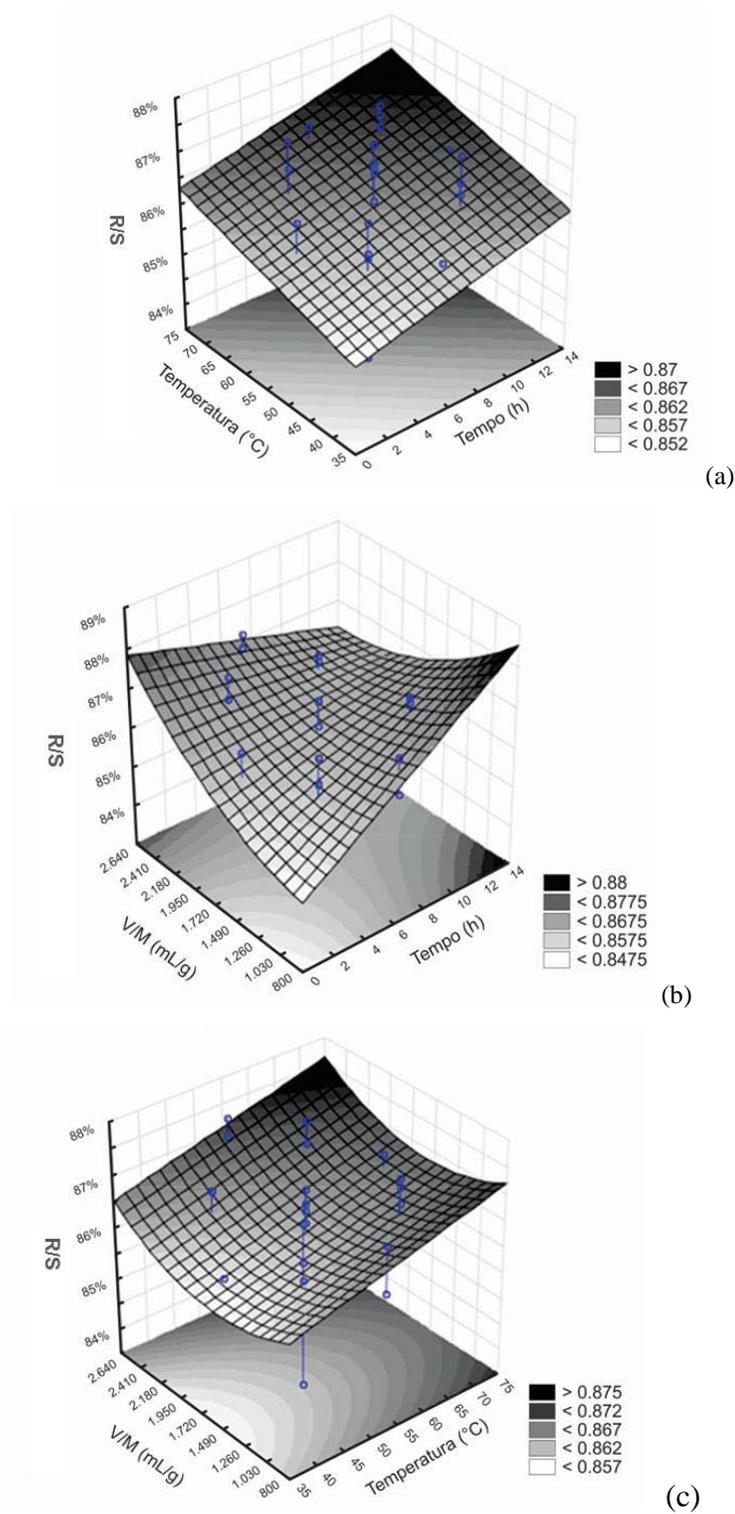


Figura 4.8: Superfícies de resposta para fração R/S. a) efeito de temperatura e tempo; b) efeito de V/M e tempo, c) efeito de V/M e temperatura

E ainda, o estudo teórico sobre parâmetros de solubilidade apresentado em Terada Marchessault, (1999) , pode auxiliar como apoio teórico para o presente trabalho experimental. O parâmetro de solubilidade  $R^j$  para o P(3HB) é igual a 8,5; sendo o parâmetro solvente-polímero  $R^{ij}$  para o clorofórmio, butanol e acetato de etila iguais a 7,8; 8,0 e 3,8; respectivamente. Com isso, nota-se que  $R^{ij}$  para o butanol é próximo do  $R^j$  do biopolímero, indicando baixa solubilidade, o que foi observado experimentalmente nesse trabalho. Já o cloroformio, apresentou  $R^{ij}$  igual a 0,7 unidade menor que o do biopolímero indicando certo poder de solvencia, também observado experimentalmente. E por fim, o acetato de etila é o solvente de maior poder de solvencia, apresentando 4,7 unidades menores que o  $R^j$  do P(3HB). É importante ressaltar que o grau de cristalinidade do polímero bem como a massa molar afetam a solubilidade do mesmo.

Por fim, em relação aos demais ésteres apresentados na literatura, é importante ressaltar que foram utilizados na extração de P(3HB) de bactérias Gram –negativas. Mantelatto et al. (2009) não reportam valores de pureza, mas para o rendimento – descrito no capítulo 2– apresenta similaridade de ordem de magnitude do presente trabalho (78%).

## Capítulo 5 – Conclusões

Os resultados obtidos para extrações com clorofórmio, hipoclorito de sódio e a combinação de ambos foram próximos aos da literatura, indicando a adequação da metodologia de extração utilizada. Já os solventes alcoólicos, apesar de sustentáveis, apresentaram baixíssima solubilidade do P(3HB), não sendo solventes indicados para esse sistema (bactérias, biopolímero, condições de extração).

O acetato de etila possibilitou rendimentos de extração menores que o maior valor reportado para solventes tradicionais não renováveis, como clorofórmio e hipoclorito de sódio. E rendimento similar ao obtido com os outros solventes base éster, apresentando-se como um solvente a base de matéria-prima renovável e de menor preço e que tem potencial real para utilização em escala comercial.

Foi possível avaliar a influência das variáveis tempo de extração, temperatura de processo e razão volume de solvente por grama de biopolímero sobre o rendimento de extração e a pureza do P(3HB) extraído. Verificou-se influência linear destas variáveis sobre o rendimento da extração e a existência de uma temperatura ótima para a pureza. Atingiu-se um rendimento de extração do biopolímero de 78 % e um grau de pureza de 65 % - para uma condição de 7 h de extração, 55 °C e 2521 mL / g.

Os resultados apresentados no presente estudo justificam a continuidade da pesquisa visando a utilização de acetato de etila como solvente potencial de extração do poli-3-hidroxi-butanato de *B. megaterium*.

### 5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

Para a continuidade deste trabalho de pesquisa podem ser apontadas os seguintes estudos prioritários:

(i) avaliação do efeito do acetato de etila sobre a distribuição da massa molar (DMM) do P(3HB) extraído, devido à influência da DMM nas propriedades finais e de processamento do polímero;

(ii) avaliação de extrações com mais de um estágio e análise econômica para avaliar a viabilidade de utilização deste solvente em processos industriais.

**ANEXO 1:**  
Resultados do planejamento experimental - duplicatas  
**RESULTADOS DAS DUPLICATAS**

EXP	BLOCOS	$X_1$	$X_2$	$X_3$	t (h)	T (°C)	V / M (mL / g)	Biomassa	Biomassa	PHB Comercial
								Pureza (%)	Rend P(3HB) (%)	Solubilização (%)
12	2	0,00	-1,76	0,00	7	40	1681	59,8	72,2	84,3
12	4	0,00	-1,76	0,00	7	40	1681	64,0	74,2	86,4
6	1	1,00	-1,00	1,00	10	46	2168	62,2	74,8	87,1
6	3	1,00	-1,00	1,00	10	46	2168	64,2	77,4	89,3
7	1	1,00	1,00	-1,00	10	64	1193	61,9	72,0	82,7
7	3	1,00	1,00	-1,00	10	64	1193	62,3	75,1	86,1
5	1	1,00	-1,00	-1,00	10	46	1193	61,0	72,4	84,2
5	3	1,00	-1,00	-1,00	10	46	1193	61,3	72,8	83,5
14	2	0,00	0,00	-1,76	7	55	840	58,8	69,0	80,3
14	4	0,00	0,00	-1,76	7	55	840	60,8	73,1	84,2
10	2	-1,76	0,00	0,00	2	55	1681	62,0	71,9	83,9
10	4	-1,76	0,00	0,00	2	55	1681	62,2	74,2	85,8
9	1	0,00	0,00	0,00	7	55	1681	64,1	74,0	86,2
13	2	0,00	1,76	0,00	7	70	1681	62,6	73,1	85,1
13	4	0,00	1,76	0,00	7	70	1681	63,9	76,7	88,2
9	2	0,00	0,00	0,00	7	55	1681	64,1	74,0	85,8
2	1	-1,00	-1,00	1,00	4	46	2168	62,1	73,9	85,9
2	3	-1,00	-1,00	1,00	4	46	2168	63,9	75,7	87,3
11	2	1,76	0,00	0,00	12	55	1681	61,8	74,1	85,9
11	4	1,76	0,00	0,00	12	55	1681	64,5	75,3	87,0
15	2	0,00	0,00	1,76	7	55	2521	63,5	77,1	88,7
15	4	0,00	0,00	1,76	7	55	2521	64,5	78,1	89,5
8	1	1,00	1,00	1,00	10	64	2168	62,1	76,0	87,7
8	3	1,00	1,00	1,00	10	64	2168	65,7	78,2	90,1
1	1	-1,00	-1,00	-1,00	4	46	1193	60,8	70,1	83,3
1	3	-1,00	-1,00	-1,00	4	46	1193	61,0	72,0	83,6
4	1	-1,00	1,00	1,00	4	64	2168	62,5	73,2	85,2

4	3	-1,00	1,00	1,00	4	64	2168	65,1	76,7	87,9
3	1	-1,00	1,00	-1,00	4	64	1193	60,7	71,3	82,9
3	3	-1,00	1,00	-1,00	4	64	1193	63,3	74,1	85,4
9	3	0,00	0,00	0,00	7	55	1681	64,9	76,0	87,5
9	4	0,00	0,00	0,00	7	55	1681	64,9	75,9	87,3

## ANEXO 2

Resultados do planejamento experimental - médias

### RESULTADOS DA MÉDIA

EXP	$X_1$	$X_2$	$X_3$	t (h)	T (°C)	V / M (mL / g)	Biomassa	Biomassa	PHB Comercial
							Pureza (%)	Rend P(3HB) (%)	Solubilização (%)
12	0,00	-1,76	0,00	7	40	1681	61,9	73,2	85,4
6	1,00	-1,00	1,00	10	46	2168	63,2	76,1	88,2
7	1,00	1,00	-1,00	10	64	1193	62,1	73,6	84,4
5	1,00	-1,00	-1,00	10	46	1193	61,2	72,6	83,9
14	0,00	0,00	-1,76	7	55	840	59,8	71,0	82,3
10	-1,76	0,00	0,00	2	55	1681	62,1	73,0	84,8
9	0,00	0,00	0,00	7	55	1681	64,4	74,7	86,5
13	0,00	1,76	0,00	7	70	1681	63,2	74,9	86,7
2	-1,00	-1,00	1,00	4	46	2168	63,0	74,8	86,6
11	1,76	0,00	0,00	12	55	1681	63,1	74,7	86,5
15	0,00	0,00	1,76	7	55	2521	64,0	77,6	89,1
8	1,00	1,00	1,00	10	64	2168	63,9	77,1	88,9
1	-1,00	-1,00	-1,00	4	46	1193	60,9	71,1	83,5
4	-1,00	1,00	1,00	4	64	2168	63,8	75,0	86,6
3	-1,00	1,00	-1,00	4	64	1193	62,0	72,7	84,1

## Referências Bibliográficas

- Alexander C. and Ernst Th. Rietschel, 2001, Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity: *Journal of Endotoxin Research*, v. 7, pg.167
- ASTM D6866 *Standard Test Methods for Determining the Biobased Content of Solid, Liquid, and Gaseous Samples Using Radiocarbon Analysis*, disponível em: <http://www.astm.org/Standards>. Acesso em 01/12/2013
- ASTM D6400-04 *Standard Specification for Compostable Plastics*, disponível em: <http://www.astm.org/Standards>. 01/12/2013
- Benys, 2013. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~benys/joomla/administrator/PDFs/morfologia.pdf> > . Acesso em: 05/03/2013.
- Berger E., B.A. Ramsay, J.A. Ramsay; C. Chavarie, 1989. PHB RECOVERY BY HYPOCHLORITE DIGESTION OF NON-PHB BIOMASS: *Biotechnology Techniques* v. 3 p. 227-232
- Bos M. P., V. Robert and J. Tommassen, 2007, Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane: *Review in Advance* v61
- BAPTIST, J.N., 1962. Process for preparing poly(b-hydroxybutyric acid). U.S. Patent 3044942.
- Basf 2004, Disponível em: [http://www.bioplastics.basf.com/pdf/Product\\_information\\_Ecoflex\\_F\\_Blend\\_A1200V1-3.pdf](http://www.bioplastics.basf.com/pdf/Product_information_Ecoflex_F_Blend_A1200V1-3.pdf) > . Acesso em 08/12/2012
- BYROM, D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. *Trends Biotechnology*. 5: 246 – 250.
- Chen Y., H. Yang, Q. Zhou, J. Chen, G. Gu, 2001, Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*: *Process Biochemistry* v. 36, p. 501–506.
- Chen G. Q., Zhang G., Park S. J., Lee S. Y., 2001, Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 50–55.

- Chen Y., J. Chen, C. Yu, G. Du, S. Lun, 1999. Recovery of poly-3 hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant–chelate aqueous system: *Process Biochemistry* v34, p. 153–157.
- Dawes, E. A., and P. J. Senior, 1973, The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms, *Advances in Microbial Physiology*, v. Volume 10, Academic Press, p. 135-266.
- De Koning, G.J.M., Witholt, B., 1997. A process for the recovery of poly(hydrocyalkanoates) from Pseudomonads. Part 1: Solubilization: *Bioprocess Eng.* v17, p.7-13
- De Koning, G.J.M., Kellerhals M., Witholt, B., 1997. A process for the recovery of poly(hydrocyalkanoates) from Pseudomonads. Part 2: Process development and economic evaluation: *Bioprocess Eng.* v.17, p.15-21
- DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M. & SAITO, T., 1990. Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules.* 23: 26-31.
- Faccin, D. J. L., R. Rech, A. R. Secchi, N. S. M. Cardozo, and M. A. Z. Ayub, 2013, Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*: *Process Biochemistry*, v. 48, p. 420-425.
- Faccin, D. J. L. ; Cardozo, N. S. M.; Ayub, M.A. Z. ; Rech, R. ; Corrêa, M.P. ; Secchi, A. R., 2012, Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 87, p. 325-333.
- Faccin, D. J. L., A. V. Morcelli, R. Rech, A. R. Secchi, and M. A. Z. Ayub, 2011, Avaliação da influência da fonte de nitrogênio e carbono na produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*, Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, Brasil.
- FACCIN, D. J. L., 2007. Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso, Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Gambetta R., 2006. ANÁLISE TEÓRICA E EXPERIMENTAL DA CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DO POLI((R)-3-HIDRÓXI-BUTIRATO) PRODUZIDO PELA BACTÉRIA ALCALIGENES LATUS: Tese de Doutorado UFRJ.
- Ghatnekar M. S., J. S. Pai, M. Ganesh, 2002, Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.77, p.444-448

- Gouda, M. K., A. E. Swellam, and S. H. Omar, 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources: *Microbiological Research*, v. 156, p. 201-207.
- HAHN, S.K., Y. K. CHANG, S. Y. LEE, 1995, Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*: *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 34–39
- Hahn S. K., Y. K.Chang, B. S. Kim, H. N. Chang, 1994. Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform: Communication to the Editor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 256-261
- Hansen CM. *J Paint Technol* 1967; 39(104):511
- HOLMES, P.A., 1985. Applications of PHB biodegradable thermoplastic- a microbially produced: *Phys. Technol*. v. 16, p. 32-36.
- Hori K., M. Kaneko, Y. Tanji, X.-H. Xing, H. Unno, 2002, Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 59, p.211–216.
- Jacquel N., C. Lo, Y. Wei, H. Wu, S. S. Wang, 2008, Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates): *Biochemical Engineering Journal* v.39, p. 15–27.
- Kapritchkoff, F. M., A. P. Viotti, R. C. P. Alli, M. Zuccolo, J. G. C. Pradella, A. E. Maiorano, E. A. Miranda, and A. Bonomi, 2006, Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*: *Journal of Biotechnology*, v. 122, p. 453-462.
- Kim M., K.Cho, H. W. Ryu, E. G. Lee, Y. K. Chang, 2003, Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate: *Biotechnology Letters* v. 25, p. 55–59.
- Koller M., A. Salerno, M.Dias, A. Reiterer, G. Braunegg, 2010. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review: *Biotechnological Polymer Synthesis, Food Technol. Biotechnol.* v. 48 (3) p. 255–269
- Kunasundari B., K. Sudesh, 2011, Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, *eXPRESS Polymer Letters* Vol.5, No.7, 620–634.
- Kurdikar D.L., F.E. Strauser, A.J. Solodar, M.D. Paster, J. Asrar, 2000, Methods of PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents, U.S. Patent 6,043,063.
- Lee, S. Y., 1996, Bacterial polyhydroxyalkanoates: *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 1-14.

- Lee, S. Y., and H. N. Chang, 1995, Production of poly(hydroxyalkanoic acid): Advances in biochemical engineering/biotechnology, v. 52, p. 27-58.
- Lemoigne, M., 1926. Produit de déshydratation et de polymerization de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. Bull. Soc. Chim. Biol., v. 8, p. 770-782.
- LU, C. H. , 2006. Purification and separation of PHB from bacteria: Dissertação de Mestrado, Yuan Ze University, Tawain.
- Madison, L. L., and G. W. Huisman, 1999, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic: Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 63, p. 21-53.
- MARANGONI, C., 2000. Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* Utilizando Substratos de Baixo Custo e Ácido Propiônico: Dissertação de Mestrado. UFSC/CTC/EQA, Florianópolis, SC.
- MARTIN, D. P.; WILLIAMS, S. F., 2003, Medical applications of poly-4-hidroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial: Biochemical Engineering Journal, v. 16, p. 97-105.
- Mantelatto P. E., Duzzi A. M., Sato T., Durao N. A. S., Nonato R. V., Rocchiccioli C., Kesserlingh S. M., 2005, Process for recovering polyhydroxyalkanoates ("PHAS") from cellular biomass, WO 2005/052175 A2.
- Mantelatto P. E., Duzzi A. M., Sato T., Durao N. A. S., Nonato R. V., Rocchiccioli C., Kesserlingh S. M., 2009, Process for recovering polyhydroxyalkanoates ("PHAS") from cellular biomass, EP Patent 1.687.436 B1.
- Mantelatto P. E. Desenvolvimento de tecnologia para extração e recuperação de polihidroxialcanoatos obtidos a partir da sacarose de cana-de-açúcar, 2011, Tese de doutorado, UFSCar, São Carlos, SP
- McCool, G. J., and M. C. Cannon, 2001, PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*: Journal of Bacteriology, v. 183, p. 4235-4243.
- McCool, G. J., T. Fernandez, N. Li, and M. C. Cannon, 1996, Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*: FEMS Microbiology Letters, v. 138, p. 41-48.
- MIDDELBERG A. P. J., 1995, PROCESS-SCALE DISRUPTION OF MICROORGANISMS: Biotechnology Advances, v. 13, No. 3, p. 491-551.
- Noda I., Schechtman L. A., 1999, Solvente Extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass, US Patent 5.942.597.

Nonato, R. V., P. E. Mantelatto, C. E. V. Rossell, 2001, Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 57, p.1-5.

PHB Industrial, 2012 disponível em:<[www.biocycle.com.br](http://www.biocycle.com.br) >. Acessado em janeiro de 2012

Philip, S., S. Sengupta, T. Keshavarz, and I. Roy, 2009, Effect of Impeller Speed and pH on the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using *Bacillus cereus* SPV: *Biomacromolecules*, v. 10, p. 691-699.

Posada, J. A., J. M. Naranjo, J. A. López, J. C. Higueta, and C. A. Cardona, 2011, Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol: *Process Biochemistry*, v. 46, p. 310-317.

Pradella J. G. C., 2006, Biopolímeros e Intermediários Químicos: Relatório Técnico 84 396-205 Centro de Tecnologia de Processos e Produtos

Ramsay, J. A., E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie, and B. A. Ramsay, 1994, Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents: *Biotechnology Techniques*, v. 8, p. 589-594.

Ramsay J. A., E. Berger, B. A. Ramsay; U C. Chavarie, 1990. RECOVERY OF POLY-3-HYDROXYALPOIC ACID GRANULES BY A STJRFACANT-HYPOCHLORITE TREATMENT: *Biotechnology Techniques* v. 4 p. 221-226

Reddy, C. S. K., R. Ghai, Rashmi, and V. C. Kalia, 2003, Polyhydroxyalkanoates: an overview: *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146.

Rehm, B. H. A., 2003, Polyester synthases: natural catalysts for plastics.

Relatório MaxiQuim Market Outlook Biopolímeros, 2011, p.57-73

Revista Embalagem Marca, outubro 2010

RIIS, V. e W. MAY, 1988, gas chromatographic determination of poly-P-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis: *Journal of Chromatography*, n.445, p.285-289

Scheffers D. e M. G. Pinho, 2005, Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies: *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 585–607.

Shen, L., J. Haufe, and M. K. Patel, 2009, Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. PRO-BIT 2009, Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University.

- Steinbüchel, A., S. Hein, and W. Babel, 2001, Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms, *Biopolyesters: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 71, Springer Berlin / Heidelberg, p. 81-123.
- Sudesh, K., H. Abe, and Y. Doi, 2000, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters: *Progress in Polymer Science*, v. 25, p. 1503-1555.
- Tamer, I. M., and M. Moo-Young, 1998, Optimization of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 19, p. 459-468.
- Tamer, I. M., M. Moo-Young, and Y. Chisti, 1998, Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 37, p. 1807-1814.
- Terada M. e R.H. Marchessault, 1999, Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates): *International Journal of Biological Macromolecules*, v25 p. 207-215.
- Valappil, S. P., S.K. Misra, A.R. Boccaccini, T. Keshavarz, C. Bucke, I. Roy, 2007, Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV: *Journal of Biotechnology* v.132, p.251–258.
- Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*: *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, p. 1-17.
- WILLIAMSON D. H.; J. F. WILKINSON, 1958. The Isolation and Estimation of the Poly-Bhydroxybutyrate Inclusions of *Bucillus* Species: *J . gen. Microbiol.* v19, p.198-209.
- Yasothea, K., M. K. Aroua, K. B. Ramachandran, and I. K. P. Tan, 2006, Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration: *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 260-268.
- Zinn, M., B. Witholt, and T. Egli, 2001, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, p. 5-21.