

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

**Avaliação do desempenho de solventes
não-halogenados na extração do poli(3-
hidroxibutirato) a partir de *Bacillus
megaterium***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Borges

Porto Alegre

2017

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

**Avaliação do desempenho de solventes
não-halogenados na extração do poli (3-
hidroxibutirato) a partir de *Bacillus
megaterium***

Fernanda Borges

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Polímeros

Linha de Pesquisa: Polímeros biodegradáveis.

Orientador(es):

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Porto Alegre

2017

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 *Avaliação do desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli(3-hidroxibutirato) a partir de Bacillus megaterium*, elaborado por Fernanda Borges, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniele Misturini Rossi – PPGEQ/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Giandra Volpato - IFRS - Campus Porto Alegre

Prof^a. Dr^a. Patrícia Diaz de Oliveira - UFPEL

“Alice: Quanto tempo dura o eterno?
Coelho: Às vezes apenas um segundo.”

Lewis Carroll - Alice no País das Maravilhas

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Engenharia Química, por todo suporte para realização das etapas necessárias para que fosse possível o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os professores que estiveram envolvidos com essa dissertação, especialmente aos meus orientadores, Nilo, Rosane e Débora.

À minha família, que viveu cada momento de angústia ao meu lado.

Aos amigos da área de Entomologia da Faculdade de Agronomia, por toda ajuda e compreensão recebida.

Aos meus amigos, que não pouparam palavras de consolo para cada dia de experimentos mal sucedida no laboratório.

Aos meus alunos, por toda inspiração que me forneceram ao longo dos anos de docência.

Resumo

Polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros sintetizados por diferentes bactérias, que têm despertado grande interesse industrial por suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, fundamental para aplicações na área médica. Dentre o grande grupo de PHA, o polihidroxiabutirato P(3HB) é o mais estudado devido suas propriedades térmicas e mecânicas semelhantes aos polímeros de fonte petroquímica. O processo de recuperação de PHA é uma das etapas de maior impacto no custo final desses materiais, sendo o método de recuperação por solventes o mais promissor para o escalonamento desse processo. Os solventes clorados são os mais utilizados atualmente. As principais bactérias estudadas para produção de P(3HB) são Gram-negativas, o que implica em uma parede celular menos espessa, em relação a bactérias Gram-positivas, facilitando, assim, a difusão de massa através dessa barreira. Porém, essas bactérias Gram-negativas contêm lipopolissacarídeos (LPS), na qual pode estar presente o lipídeo A, uma endotoxina, extraída na técnica de recuperação de P(3HB) por solventes. Por ser Gram-positiva, o *Bacillus megaterium* não apresenta LPS na sua parede celular, além disso, é um microrganismo bastante versátil em relação ao substrato de cultivo, podendo se desenvolver em fontes de carbono complexas e baixo custo, como subprodutos agroindustriais. Dessa forma, esta pesquisa objetivou encontrar solventes alternativos aos halogenados para extração do P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium*. Foram realizados ensaios de solubilidade com acetato de etila (AcEt), metil etil cetona (MEK), dimetil carbonato (DC), propionato de isoamila (PIso), dimetilsulfóxido (DMSO), carbonato de propileno (CP), 2-heptanona (2-Hp) e N,N-dimetilacetamida (NNDA). AcEt, MEK e DC atingiram baixa concentração de polímero em solução, inferior a 0,08 g/L. Para os solventes que apresentaram maior afinidade com o P(3HB), determinou-se a faixa de concentração na qual se encontra a solubilidade do P(3HB) a 140 °C. O PIso, apresentou valor entre 1,3 e 2,5 g/L, o DMSO entre 65 e 70 g/L, e o CP, a 2-Hp e o NNDA superior a 100 g/L. Os quatro solventes de melhor desempenho, foram aplicados na extração de P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium*. O DMSO não se mostrou seletivo, pois causou a digestão da parcela não-polimérica. A recuperação do P(3HB) pelo clorofórmio (Chl) foi usada como valor comparativo para os demais solventes, $6,52 \pm 0,59\%$ para 30 min de contato a 60 °C. O CP e 2-Hp apresentaram desempenho melhor que Chl, $17,6 \pm 0,2\%$ e $7,3 \pm 0,1\%$, respectivamente, para 15 min e 140 °C. O NNDA foi o solvente de maior potencialidade, atingindo uma recuperação igual a $98,5 \pm 1,06\%$ em 30 min.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers synthesized by different bacteria, that have been arousing industrial interest because of their biodegradability and biocompatibility properties, fundamental for application in the medical area. Among the large group of PHA the Polyhydroxybutyrate P(3HB) is the most studied due to its physical properties like polymers from petrochemical sources. The PHA recovery process is one of the steps with greater impact in the final cost of these materials, being the recovery method using solvents the most promising one for scheduling the process. The chlorinated solvents are the most used currently. The main bacteria studied for the P(3HB) production are the Gram-negative, which implies in a thinner cell wall facilitating the mass transference through this barrier. However, these microorganisms present liposaccharide (LPS), in which lipid A may be present, an endotoxin extracted with the solvent recovery technique. It substantiates the importance of the research using Gram-positive bacteria that does not contain LPS. Besides been more versatile in relation to the growing substrate, able of developing in complex carbon sources as agroindustrial by products, without genetic manipulation. Therefore, this research aimed to find alternative solvents to the non-halogenated for the extraction of P (3HB) from the biomass of *B. megaterium*. Were realized solubility tests with ethyl acetate (EtOAc), ethylmethylketone (MEK), dimethyl carbonate (DC), isoamyl propionate (PIso), dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene carbonate (CP), 2-heptanone (2-Hp) and N, N-dimethylacetamide (NNDA). EtOAc, MEK and DC reached a low concentration of P(3HB) (Sigma-Aldrich®) in solution, lower than 0,08 g/L. For solvents that showed higher affinity with the P3HB, was determined a solubility range, PIso demonstrated a value between 1,3 and 2,5 g/L, DMSO between 65 and 70 g/L and CP, 2-Hp and NNDA greater to 100 g/L. The four solvents with the best performance were applied in the P(3HB) extraction from the biomass. The DMSO was not selective, since it caused the digestion of the non-polymeric portion. The P (3HB) recovery by chloroform (Chl) was used as comparative for the other solvents, $6,52 \pm 0,59\%$ with 30 min of contact time and temperature of 60 °C. The CP and 2-Hp showed a better performance than Chl, $17,6 \pm 0,2\%$ and $7,3 \pm 0,1\%$, respectively, with 15 min of contact time and temperature of 140 °C. The solvent NNDA demonstrated the greater potentiality, reaching a recovery rate of $98,5 \pm 1,1\%$.

Sumário

Sumário.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Estrutura molecular e características físico-química do PHA.....	3
2.2 Microrganismos e meios de cultivo usados para produção de P(3HB)	5
2.3 Estrutura da parede celular bacteriana.....	9
2.4 Recuperação do Polímero.....	13
2.4.1 Técnicas de pré-tratamento da biomassa.....	13
2.4.2 Técnicas de recuperação do polímero.....	15
a) Recuperação por digestão celular por via química ou enzimática.....	15
b) Recuperação por método mecânico (ruptura-centrifugação)	16
c) Recuperação por extração com solventes.....	17
2.5 Considerações Finais.....	20
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Microrganismo e condições de cultivo.....	23
3.2 Caracterização da biomassa.....	23
3.3 Testes preliminares de solubilidade com solventes não-halogenados	24
3.4 Testes de extração com biomassa.....	25
3.5 Testes de extração com 2-Hp e biomassa pré-tratada.....	27
3.6 Testes de precipitação do P(3HB) do extrato.....	29
4. Resultados e Discussões.....	30
4.1 Testes preliminares com solventes não-halogenados.....	30
4.2 Testes de extração com biomassa.....	33
4.2.1 Recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> utilizando clorofórmio (Chl).....	33
4.2.2 Recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> utilizando dimetilsulfóxido (DMSO).....	35
4.2.3 Recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> utilizando carbonato de propileno (CP).....	36
4.2.4 Recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> utilizando 2-heptanona (2-Hp)	37

4.2.5 Recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> utilizando N, N-dimetilacetamida (NNDA).....	38
4.2.6 Análise comparativa preliminar dos solventes testados.....	40
4.3 Testes de pré-tratamento da biomassa.....	41
4.4 Testes de precipitação do P(3HB) com não-solvente.....	43
4.5 Proposta de fluxograma para processo industrial para extração com NNDA...	47
5. Conclusões.....	50
5.1 Considerações Finais.....	50
5.2 Trabalhos Futuros.....	51
6. Referências bibliográficas.....	52
Anexo 1.....	61
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura geral dos polihidroxicanoatos. Fonte: (Valappil <i>et al.</i> , 2007a)...	4
Figura 2.2: Estrutura Molecular do P(3HB) (Peña <i>et al.</i> , 2014)	4
Figura 2.3: Grânulos de P(3HB) intracelular de <i>Bacillus megaterium</i> em 48 h de cultivo. Microscopia Eletrônica (x 30.000). Fonte: (Gouda <i>et al.</i> , 2001)	6
Figura 2.4: Estrutura do granulo de PHA em <i>B. megaterium</i> (Zinn <i>et al.</i> , 2001).....	7
Figura 2.5: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos como na peptídeoglicana (Tortora <i>et al.</i> , 2012)	10
Figura 2.6: Constituição da parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptada de Hogg (2005).....	11
Figura 2.7: Distribuição dos ácidos teicoicos na parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptada de Brown <i>et al.</i> (2013)	11
Figura 2.8: Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas. Adaptada de Hogg (2005).....	12
Figura 3.1: Teste de solubilidade preliminar. (a) solução solvente/polímero (b) solução solvente/polímero com P(3HB) em excesso.....	25
Figura 3.2: Etapas de extração do P(3HB) a partir da biomassa.....	26
Figura 3.3: Filme de P(3HB) obtido após a etapa de secagem do solvente	27
Figura 3.4: Método de ruptura da parede celular avaliado. (a) areia higienizada. (a) tubo de vidro com areia, solvente e biomassa. (b) mistura em vórtex.....	28
Figura 3.5: Gotejamento de solução de P(3HB) em não-solvente	29
Figura 4.1: Perfis σ do P(3HB) e NNDA (Aquad, 2015).....	33
Figura 4.2: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> com clorofórmio (Chl) até o tempo de 180 min. Recuperação percentual (\circ). Pureza percentual (\blacksquare).....	34
Figura 4.3: Extração de P(3HB) da biomassa de <i>B. megaterium</i> com DMSO. (a) Aspecto da mistura extrato/biomassa após 15 min de contato a 140 °C. (b) aspecto do extrato após a secagem do solvente	36
Figura 4.4: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> com 2-heptanona (2-Hp) até o tempo de 180 min. Recuperação percentual (\circ). Pureza percentual (\blacksquare).....	37
Figura 4.5: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> com N, N-dimetilacetamida (NNDA) até o tempo de 180 min. Recuperação percentual (\circ). Pureza percentual (\blacksquare)	39
Figura 4.6: Comportamento da biomassa de <i>B. megaterium</i> em contato com clorofórmio (Chl) (a) e N, N-dimetilacetamida (NNDA) (b).....	40
Figura 4.7: Recuperação de P(3HB) (\blacksquare) com carbonato de propileno (CP) e 2-heptanona (2-Hp) a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> com e sem tratamento prévio por ruptura mecânica com grãos de areia de duas faixas granulométricas. Extração realizada a 140 °C por 15 min. Pureza percentual (\square).....	42
Figura 4.8: Diferença entre o comportamento das partículas durante o vórtex. (a) carbonato de propileno (CP) (b) 2-heptanona (2-Hp).....	43

Figura 4.9: Aspecto final da precipitação com propanona como não-solvente. (a) Após o gotejamento na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (b) Após 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1	44
Figura 4.10: Aspecto final da precipitação com água e etanol como não-solvente. (a) Após o gotejamento de água na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (b) Após de água 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (c) Após o gotejamento de etanol (EtOH) na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (d) Após de etanol (EtOH) 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1	45
Figura 4.11: Aspecto final da amostra de polímero precipitado com não-solvente após centrifugação. (a) Etanol (EtOH) (b) Água	45
Figura 4.12: Percentual de polímero precipitado da solução original preparada com N,N-dimetilacetamida (NNDA) e P(3HB) padrão a partir de água (■) e etanol (■).....	46
Figura 4.13: Proposta de etapas de extração. (E) Extrator; (C) Centrífuga; (Co) Tanque de co-precipitação; (TC) Trocador de calor; (F) Torres de fracionamento; (L) Tanque de lavagem; (S) Secagem; (M) Moagem; (P) Peletizadora.....	47
Figura A.1: Estrutura molecular do clorofórmio.....	61
Figura A.2: Reação de síntese do clorofórmio.....	61
Figura A.3: Estrutura molecular do acetato de etila (AcEt).....	62
Figura A.4: Reação química de obtenção do acetato de etila (AcEt).....	62
Figura A.5: Estrutura molecular do metil etil cetona (MEK)	63
Figura A.6: Reação de obtenção de metil etil cetona (MEK)	63
Figura A.7: Estrutura molecular do dimetil carbonato (DMC).....	63
Figura A.8: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC).....	63
Figura A.9: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC) a partir de metanol	64
Figura A.10: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC) a partir de metanol e metil nitrato (MN).....	64
Figura A.11: Fórmula estrutural do propionato de isoamila (PIso)	64
Figura A.12: Reação de síntese de propionato de isoamila (PIso).....	65
Figura A.13: Fórmula estrutural do dimetilsulfóxido (DMSO)	65
Figura A.14: Fórmula estrutural do carbonato de propileno (CP)	66
Figura A.15: Mecanismo de formação do carbonato de propileno através do emprego de catalisadores a base de zinco (Comin, 2010).....	66
Figura A.16: Fórmula Estrutural da 2-heptanona.....	67
Figura A.17: Reação de ozólise de alcenos para produção de 2-heptanona (2-Hp) (Solomons, T.W. Graham e Fryhle, Craig B., 2012)	67
Figura A.18: Estrutura molecular do N,N-dimetilacetamida (NNDA).....	67
Figura A.19: Reação de obtenção de N,N-dimetilacetamida (NNDA).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparação de propriedades de alguns polímeros da família dos PHAs e polímeros de fonte de origem petroquímica. Adaptada de Lee (1996) e Sudesh (2000) ..4	
Tabela 2.2: Classificação da parede celular de bactérias produtoras de PHA (Valappil, <i>et al.</i> , 2007a).....9	9
Tabela 2.3: Comparação das principais diferenças observadas entre a composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptada de Tortora <i>et al.</i> (2012)13	13
Tabela 2.4: Comparação entre não-solventes e proporções usadas para precipitar o P(3HB) em solução.....20	20
Tabela 2.5: Dados de recuperação e pureza de PHA isolado pela técnica de extração de solventes.21	21
Tabela 3.1: Tempos de extração avaliados para cada solvente.26	26
Tabela 3.2: Condições avaliadas no ensaio de pré-tratamento da biomassa de <i>B. megaterium</i>29	29
Tabela 3.3: Condições avaliadas para precipitação com não-solvente de P(3HB) dissolvido em NNDA a 140 °C.30	30
Tabela 4.1: Concentração de P(3HB) em solução após tempo de extração de 6 h.31	31
Tabela 4.2: Comparação entre solventes de alta capacidade de solubilização do P(3HB) avaliados a 140 °C.32	32
Tabela 4.3: Comparação entre os solventes avaliados.40	40

LISTA DE ABREVIações

2-Hp	2-heptanona
AcEt	Acetato de etila
Chl	Clorofórmio
CP	Carbonato de propileno
DC	Dimetilcarbonato
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos indivíduos da população de teste.
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
LPS	Lipopolissacarídeo
MEK	Metil etil cetona
MN	Metil nitrato
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	N-acetilmurânico
NNDA	N,N-dimetilacetamida
P(3HB)	Polihidroxibutirato
P(3HB-co-3HV)	Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato
PHA	Polihidroxialcanoato
PIso	Propionato de isoamila
Prop	Propanona
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _m	Temperatura de fusão ou amolecimento

Capítulo 1

Introdução

Os polímeros de origem petroquímica são materiais bastante versáteis, pois reúnem baixa massa específica e alta resistência mecânica, por isso, sua produção tem crescido nas últimas décadas. Muitas técnicas de reciclagem são conhecidas, porém baixos índices são catalogados em países em desenvolvimento. Isso implica que grande parcela desses artigos plásticos pós-consumo é disposta no meio ambiente e causa grande impacto ambiental, pois são de difícil degradabilidade (Milanez *et al.*, 2012; Nkwachukwu *et al.*, 2013).

Assim, os polihidroxicanoatos (PHA) são uma alternativa aos polímeros sintéticos por serem biodegradáveis (Holmes, 1985). Dentre a família de PHAs, pode-se destacar o polihidroxiacetato [P(3HB)], cujas características assemelham-se aos polipropileno e polietileno. Ressalta-se, ainda a potencialidade desse polímero para aplicações na área médica, pois estudos apontam compatibilidade ao organismo humano (Zinn *et al.*, 2001). Trata-se de um tipo de plástico sintetizado no meio intracelular por algumas bactérias e plantas como uma reserva de energia (Cincinati e Fairfield, 1999; Kulprecha *et al.*, 2009). O custo de recuperação desse polímero representa boa parte do custo final do produto. Por isso, é de fundamental importância, para maior utilização do P(3HB), a otimização dessa etapa do processo produtivo. O método de maior potencialidade para escalonamento é a extração por solventes (Ramsay *et al.*, 1994). Porém, solventes clorados, tóxicos e agressivos ao meio ambiente, são os mais estudados e os que apresentam melhor rendimento nessa técnica (Dalcaton, 2006; López-Abelairas *et al.*, 2015). Dessa forma, é fundamental se identificar solventes não-halogenados com menor impacto ambiental e toxicidade, que atinjam altos índices de recuperação e pureza de PHA.

Industrialmente as bactérias Gram-negativas são os principais microrganismos utilizados para síntese do P(3HB) (Reddy *et al.*, 2003). No entanto, a estrutura da parede celular apresenta lipopolissacarídeos (LPS), na qual pode estar presente o lipídeo A, uma endotoxina, que em aplicações médicas, pode causar resposta

imunológica no organismo dos seres humanos (Reatz *et al.*, 2017). Uma alternativa é o uso de bactérias Gram-positivas, que não apresentam LPS em sua constituição (Valappil *et al.*, 2007a; Naranjo *et al.*, 2013).

Pouco ainda é conhecido a respeito da técnica de recuperação por solventes do P(3HB) a partir de bactérias Gram-positivas. A peculiaridade desses microrganismos é a presença de uma parede celular mais espessa, que aumenta a resistência à transferência de massa por essa barreira (Hogg, 2005). O que justifica o desenvolvimento de estudos acerca da otimização dessa etapa para futura aplicação industrial.

Portanto, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar o desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli(3-hidroxi-butarato) a partir da biomassa de bactérias Gram-positiva *Bacillus megaterium*.

A fim de atingir o objetivo principal, definiram-se os objetivos específicos descritos a seguir:

1. avaliar a solubilidade do P(3HB) padrão Sigma-Aldrich® nos solventes acetato de etila (AcEt), metil etil cetona (MEK), dimetil carbonato (DC), propionato de isoamila (PIso), dimetilsulfóxido (DMSO), carbonato de propileno (CP), 2-heptanona (2-Hp) e N,N-dimetilacetamida (NNDA), segundo uma mesma condição operacional.
2. aplicar os solventes mais promissores para extração do P(3HB) em ensaios de extração com a biomassa de *B. megaterium*.
3. verificar o impacto do pré-tratamento da biomassa por ruptura mecânica na recuperação do P(3HB).
4. verificar a possibilidade de realizar a co-precipitação do P(3HB) após a etapa de extração.

A estrutura dessa dissertação está dividida em 6 capítulos.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica acerca da composição do polímero e microrganismo de interesse para esta pesquisa, bem como, breves explicações a respeito das técnicas de recuperação de polímero mais estudadas atualmente. O Capítulo 3 descreve as etapas dos experimentos executados durante a presente pesquisa. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e feitas as devidas discussões. O Capítulo 5 traz as considerações finais e sugestões para próximos trabalhos na mesma linha de estudo. Finalmente, o Capítulo 6 lista as referências consultadas ao longo de todo o trabalho.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

A popularização de plásticos como matéria-prima de uma série de bens de consumo pouco duráveis, como embalagens de alimentos e produtos de higiene pessoal, tem gerado uma enorme quantidade de resíduos de difícil disposição ou processamento. Por outro lado, apesar de serem conhecidos diversos processos de reciclagem, o descarte inadequado desse material pós-consumo muitas vezes dificulta ou até mesmo inviabiliza esses processos. O resultado são baixos índices de reciclagem, especialmente no Brasil, onde apenas cerca de 20% é aproveitado pela indústria de reciclagem (Milanez *et al.*, 2012), enquanto que na Suécia esse valor chega a 67% (Hage e Söderholm, 2008). Em tal cenário, uma alternativa seriam os polímeros biodegradáveis, como os polihidroxialcanoatos (PHAs), caracterizados pelo seu baixo/reduzido tempo de degradação quando sujeito à ação microbiana.

Os PHAs são polímeros sintetizados e acumulados em grânulos intracelulares por determinados microrganismos em cultivos, geralmente, com restrição de oxigênio, fósforo ou nitrogênio, rico em carbono e com os sais minerais necessários para a manutenção celular. A principal dificuldade da disseminação do uso dos PHAs é o seu custo final, ainda bastante superior ao valor de comercialização de polímeros de origem petroquímica. As causas para isto incluem baixos índices de rendimento e produtividade dos microrganismos utilizados, custo da fonte de carbono e nitrogênio, além das características, que serão abordados nesse capítulo, acerca dos métodos de recuperação e purificação disponíveis (Sudesh *et al.*, 2000).

2.1 Estrutura molecular e características físico-químicas do PHA

A estrutura geral do PHA é apresentada na Figura 2.1, na qual os radicais, $R1$ e $R2$, podem ser um átomo de hidrogênio ou uma sequência de até 13 átomos de carbonos, enquanto o valor de x pode ser uma sequência de até 4 átomos de carbono. O grau de polimerização (n) pode variar de 100 a 300.000 vezes.

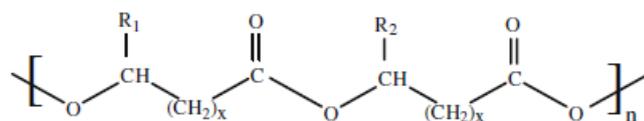


Figura 2.1: Estrutura geral dos polihidroxicanoatos. Fonte: (Valappil *et al.*, 2007a)

Dentre as diferentes estruturas moleculares possíveis para os PHA, destaca-se o polihidroxicanoato (P(3HB) ou PHB), por apresentar propriedades similares a polímeros de fonte petroquímica largamente utilizados atualmente (Kulprecha *et al.*, 2009). A estrutura deste polímero é representada na Figura 2.2, enquanto algumas propriedades para fins comparativos são apresentadas na Tabela 2.1.

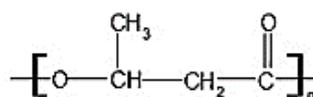


Figura 2.2: Estrutura Molecular do P(3HB). Fonte: (Peña *et al.*, 2014).

Tabela 2.1: Comparação de propriedades de alguns polímeros da família dos PHAs e polímeros de fonte de origem petroquímica. Fonte: adaptada de Lee (1996) e Sudesh (2000).

Polímero	T _m ¹ (°C)	Tg ² (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Resistência ao impacto (J/m)
P(3HB)	179-180	4	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)						
3 mol% 3HV	170		2,5	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	50	200
25 mol% 3HV	137		0,7	30		400
71 mol% 3HV	83	-13	-			
Polipropileno	170	-10	1,7	34,5	400	45
Polietileno-tereftalato	262		2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110		3,1	50	-	21

¹Temperatura de fusão ou temperatura de amolecimento.

²Temperatura de transição vítrea.

Em relação às características físico-químicas do P(3HB), sua baixa estabilidade térmica é um grande desafio para sua aplicação industrial, pois reduz a sua processabilidade através de operações unitárias convencionais da indústria de polímeros, como extrusão e injeção. Isso ocorre porque o ponto de fusão do P(3HB), que varia entre 170 e 180 °C, é muito próximo da temperatura de degradação, 190 °C. Nessa temperatura se inicia o processo

de ruptura das cadeias poliméricas (Holmes, 1985). Por isso, o estudo do copolímero polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) é bastante relevante, visto que seu ponto de fusão (T_m) é reduzido a medida que o percentual de hidroxivalerato aumenta na cadeia polimérica. Esse aspecto contribui para a processabilidade do material.

A principal aplicação do PHA está na área médica, que já utiliza e comercializa artefatos fabricados com esse material apesar do seu alto custo (Akaraonye *et al.*, 2010). Pode-se destacar produção de estruturas de apoio para engenharia de tecidos e administração de fármacos, conhecidos por *scaffolds* e *stends*. O baixo volume de PHA utilizado para produção desses artigos e seu alto valor agregado viabilizam sua produção. No organismo, esse biopolímero apresenta baixos níveis de rejeição, pois, quando metabolizado, o principal produto é o ácido 3-hidroxibutírico, composto químico já presente no sangue humano (Zinn *et al.*, 2001).

A produção do PHA vem sendo largamente estudada. Na maioria dos casos se utiliza uma cultura contendo uma única espécie de bactéria. Porém, investiga-se a possibilidade de utilização de culturas microbianas mistas em resíduos agroindustriais ou em efluentes de determinadas indústrias como fontes de carbono de baixo custo (Villano *et al.*, 2014).

Espera-se que no futuro, através do desenvolvimento de plantas transgênicas, seja ainda possível a produção de P(3HB) no interior de células vegetais, que acumulariam o polímero durante seu crescimento. Dessa forma, seriam associadas a produção de alimentos e polímero em uma mesma área de cultivo agrícola (Lee, 1996; Cincinnati e Fairfield, 1999). Após a modificação genética, a planta *Elaeis guineensis* (palmeira de dendê) passa a acumular P(3HB) em suas folhas, sem deixar de produzir o óleo de palma em seus frutos (Parveez *et al.*, 2015).

2.2 Microrganismos e meios de cultivo usados para produção de P(3HB)

Desde o primeiro relato a respeito da síntese de PHAs em *Bacillus megaterium*, diversas outras bactérias foram identificadas como microrganismos capazes de produzir esse polímero (Lemoigne, 1926 apud Kulpreecha *et al.*, 2009; Scheper, 2001). A síntese do poliéster acontece quando há limitação de um nutriente, como nitrogênio, fósforo, oxigênio, mas há disponibilidade de carbono no meio de cultivo. Nessas condições o P(3HB) é produzido e armazenado no meio intracelular na forma de grânulos, que podem ser observados por microscopia eletrônica de varredura, como mostra a Figura 2.3. Em caso do nutriente faltante ser restabelecido, enzimas depolimerazes degradam e metabolizam o polímero como fonte de energia (Merrick e Doudoroff, 1964; Du e Yu, 2002).

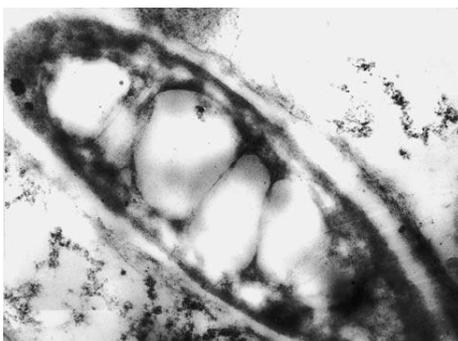


Figura 2.3: Grânulos de P(3HB) intracelular de *Bacillus megaterium* em 48 h de cultivo. Microscopia Eletrônica (x 30.000). Fonte: (Gouda *et al.*, 2001).

Uma das bactérias mais referenciadas na literatura para produção de P(3HB) é a *Cupriavidus necator*, devido a habilidade dessa bactéria em acumular grande quantidade de polímero, chegando a representar até 80% da massa de células secas (Lee, 1996; Henderson e Jones, 1997). Esse microrganismo é inclusive aplicado como produtor de P(3HB) em escala industrial, sendo a glicose o meio de cultivo. Apesar desse substrato ser o mais utilizado (Kim *et al.*, 1994; Henderson e Jones, 1997) como fonte de carbono para *C. necator* selvagem, esta pode sofrer modificações genéticas para sintetizar polímero a partir de substratos de menor custo, como por exemplo o glicerol, subproduto da produção de biodiesel. Cavalheiro *et al.*(2009) atingiram um acúmulo de 82,5 g de células de *C. necator* recombinante por litro de meio de cultivo, com 62% de P(3HB). Povolo *et al.*(2010) ainda avaliou a viabilidade da produção de PHAs, a partir de subprodutos ricos em lactose gerados na produção de queijos, com utilizando também *C. necator* geneticamente modificada. Nesse estudo, foi evidenciado maior rendimento de produção de polímero se comparada à bactéria selvagem. Dessa forma, apesar da *C. necator* ser uma das bactérias mais estudadas, ela só é capaz de metabolizar PHAs a partir de subprodutos industriais de menor custo, quando sujeita a modificações em seu DNA.

Outra bactéria que tem se destacado é a *Azohydromonas lata* (*Alcaligenes latus*), por apresentar rápida multiplicação celular e acumular PHA durante sua fase de crescimento. Yamane *et al.*(1995) identificaram que com um pequeno tempo de cultivo (18 h) seria possível atingir uma concentração de células igual a 142 g/L e de P(3HB) igual a 68,4 g/L partindo-se de um inóculo de 13,7 g/L. Destaca-se o fato desse estudo ter usado como meio de cultivo a sacarose, uma fonte de carbono de menor custo que a glicose. Wang e Lee (1997) também identificaram alto percentual de polímero em relação a massa de células do cultivo microbiano em sacarose, obtendo 87% de P(3HB) em relação à massa de células bacterianas secas.

O gênero de bactérias *Methylobacterium* se destaca pela sua capacidade de crescer e acumular P(3HB) utilizando como fonte de carbono o metanol, substrato de baixo custo (Mokhtari-Hosseini *et al.*, 2009). Bourque *et al.*(1995), aplicando diversas condições de cultivo de *Methylobacterium extorquens* DSMZ 1340, obtiveram concentrações de células variando entre 100 e 115 g/L e proporção de P(3HB) em relação à massa seca de células entre 40 e 46%.

O acúmulo de P(3HB) em *Escherichia coli* recombinante pode variar entre 30 até 95% em peso seco de células (Fidler e Dennis, 1992; Kusaka *et al.*, 1997). Lee e Chang (1993) avaliaram a densidade celular possível para *E. coli* pSYL104 em sacarose, que seria uma fonte de carbono de valor inferior a glicose. Após cultivo de 48 h atingiram concentração de células igual a 125 g/L, o que sugere grande potencial da *E. coli* recombinante de apresentar alta produtividade de produção de P(3HB). Visto que a produção de P(3HB) está diretamente relacionada ao espaço intracelular, a densidade de células no meio de cultivo é um fator determinante para se obter maior quantidade de polímero.

Dois bactérias do gênero *Bacillus* se destacam na literatura como produtoras de PHAs, o *Bacillus cereus* e o *Bacillus megaterium*. Trata-se de bactérias Gram-positivas, característica cujas implicações no processo de extração do polímero serão abordadas na Seção 2.4.

A bactéria da espécie *B. cereus* apresenta a capacidade de quebrar o amido e utilizá-lo como fonte de carbono por sintetizar a enzima amilase. Hamali (2008) verificou que a bactéria chegou a acumular 48% de P(3HB) em peso seco durante o cultivo. Enquanto que Valappil *et al.* (2007b) ainda salientam a potencialidade da *B. cereus* em futuras aplicações em escala industrial.

A bactéria *B. megaterium* é capaz de se desenvolver e acumular P(3HB) utilizando como fonte de carbono de resíduos agroindustriais, considerados substratos de baixo valor agregado (Sathiyarayanan *et al.*, 2013), sem necessidade de modificação genética. O armazenamento do poliéster ocorre em grânulos, como o modelo representado na Figura 2.4. O *B. megaterium* recobre sua reserva de P(3HB) por uma monocamada de lipídeos (0,5% em base mássica) e proteínas (2%) (Zinn *et al.*, 2001).

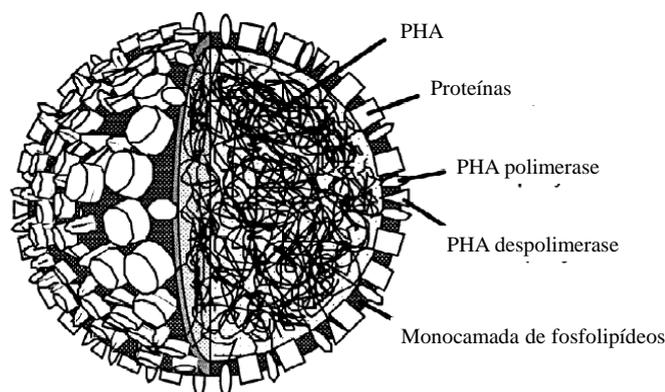


Figura 2.4: Estrutura do grânulo de PHA em *B. megaterium* (Zinn *et al.*, 2001).

Diversos substratos vêm sendo avaliados em cultivos bacterianos, tendo sido evidenciada a viabilidade da utilização de sacarídeos, glicerol e óleos vegetais como fontes de

carbono. Dentre possíveis substratos, destaca-se o interesse especial no uso de subprodutos industriais de baixo custo e pouca aplicabilidade em outros processos. Bagaço desengraxado de dendê (Zhang *et al.*, 2013), glicerol proveniente da produção do biodiesel (Naranjo *et al.*, 2013), soro de leite (Hassemer *et al.*, 2015), melão de cana de açúcar (Kulpreecha *et al.*, 2009) e hidrolisado de casca de soja (Glanert *et al.*, 2015) são exemplos de substratos já utilizados.

No aspecto de flexibilidade de substrato para cultivo, o *B. megaterium* se destaca com relação à bactéria Gram-negativa mais utilizada, *C. necator*, que têm preferência por monossacarídeos, principalmente a glicose. Sendo necessárias manipulações genéticas para que seja capaz de se desenvolver em fontes de carbono de composição complexas como subprodutos industriais.

A produção de P(3HB) com o *B. megaterium* utilizando glicerol, subproduto da produção do biodiesel, purificado previamente por métodos físicos como fonte de carbono foi avaliada por Naranjo *et al.* (2013). Em condições identificadas como ideais (pH 7, saturação de oxigênio 80% e temperatura 33 °C) foi possível obter índices de acúmulo de P(3HB), produtividade e massa seca superiores aos obtidos quando utilizada glicose como única fonte de carbono. Desconsiderando-se o custo de recuperação do solvente utilizado na purificação do P(3HB), os autores estimaram o custo de produção do P(3HB) obtido a partir de glicerol recuperado em comparação ao produzido a partir de glicose, chegando a valores finais de 2,6 US\$/kg de P(3HB) e 3,3 US\$/kg de P(3HB), respectivamente. A utilização de glicerol purificado representou uma redução de 21% no custo total do processo.

Em outro estudo, o bagaço proveniente da extração de óleo de dendê, rico em celulose e hemicelulose e, quando sujeito a tratamento de quebra molecular prévio, decompõem-se em um meio de cultura rico em glicose e xilose, monossacarídeos, que podem ser convertidos em P(3HB) sob ação bacteriana. Em testes com este substrato, a cepa de *B. megaterium* R11 foi capaz de produzir P(3HB), sendo que a maior produção de P(3HB) ocorreu quando foi utilizada triptona, concentração de 6 g/L, como fonte de nitrogênio. O percentual de P(3HB) acumulado evidenciado foi $43 \pm 3,8\%$, o fator de conversão foi de 0,20 g/g e o peso seco de células foi de $6,31 \pm 0,19$ g/L (Zhang *et al.*, 2013).

Resultados promissores foram obtidos para produção de P(3HB) através de *B. megaterium* utilizando-se fonte de carbono e nitrogênios de baixo custo (Kulpreecha *et al.*, 2009). Foram comparados dois substratos ricos em carbono, sacarose e melão, um produto intermediário do processo de fabricação de açúcar, que é rico em sacarose e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio. A fonte de nitrogênio também foi avaliada, comparou-se sulfato de amônia e ureia em quantidades equivalentes de oferta de nitrogênio. Os maiores índices de produtividade, massa seca de biomassa e percentual de P(3HB) em massa seca foram obtidos se fazendo uso de melão e ureia,

chegando a atingir valor 0,09 g/L/h de produtividade e 49,92% de biomassa seca, considerando-se ureia como fonte de nitrogênio.

Alguns relatos na literatura ressaltam que fontes de carbono não purificadas, ou seja, que não sejam formados por um determinado carboidrato isolado, são melhores substratos para crescimento bacteriano. Isso ocorre, provavelmente, porque estes meios contêm outros nutrientes necessários para crescimento celular, além de carboidratos, tais como ácidos orgânicos, minerais e vitaminas (Kulpreecha *et al.*, 2009). Tais resultados são especialmente animadores quando se avalia seu impacto no custo de produção do P(3HB), devido ao menor custo dos substratos não purificados que passaram pelo processo de obtenção de um ou mais sacarídeos específicos.

Inclusive métodos de cultivo em estado sólido, como alternativa de otimização do processo produtivo, vêm sendo estudados. Os substratos utilizados nesses cultivos podem ser subprodutos agroindustriais, uma estratégia interessante para redução do custo de produção relativo à fonte de energia fornecida para o *B. megaterium* (Sathiyanarayanan *et al.*, 2013).

Dessa forma, um dos motivos que sustenta a escolha pelo *B. megaterium* como microrganismo produtor de PHA nessa pesquisa é a sua capacidade de crescimento e síntese de P(3HB) a partir de diversos substratos de baixo custo.

2.3 Estrutura da parede celular bacteriana

As bactérias produtoras de P(3HB) podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas de acordo com a composição de sua parede celular. Grande parte dos microrganismos produtores de P(3HB) são Gram-negativas, sendo apenas as bactérias do gênero *Bacillus* os exemplos de Gram-positivas, como mostra a Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Classificação da parede celular de bactérias produtoras de PHA.
Fonte: (Valappil *et al.*, 2007a)

Microrganismo	Parede Celular
<i>Cupriviadus necator</i> ^a selvagem	Gram-negativa
<i>Methylobacterium</i> sp.	Gram-negativa
<i>Azohydromonas lata</i>	Gram-negativa
<i>Pseudomonas olearans</i>	Gram-negativa
<i>Cupriviadus necator</i> recombinante	Gram-negativa
<i>Escherichiacoli</i> recombinante	Gram-negativa
<i>Bacillus megaterium</i>	Gram-positiva
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positiva

^a A *C. necator* anteriormente era nomeada como *Alcaligenes eutropus* e *Ralstonia eutropha*

Tanto paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, são formadas por uma estrutura macromolecular conhecida por peptídeoglicano (Figura 2.5) um polímero natural formado por dois monômeros ligados de maneira alternada, N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurânico (NAM). A diferença está no fato de paredes de bactérias Gram-positivas serem formadas por múltiplas camadas de peptídeoglicano, enquanto que em paredes de bactérias Gram-negativas há apenas uma única ou poucas camadas dessa estrutura. Essa diferenciação estrutural resulta em paredes celulares muito mais robustas, no caso de bactérias Gram-positivas, podendo representar de 30 a 70% da massa seca do microrganismo, desconsiderando a massa do produto intracelular, como o P(3HB). Enquanto, no caso de bactérias Gram-negativas, esse valor é inferior a 10% (Hogg, 2005).

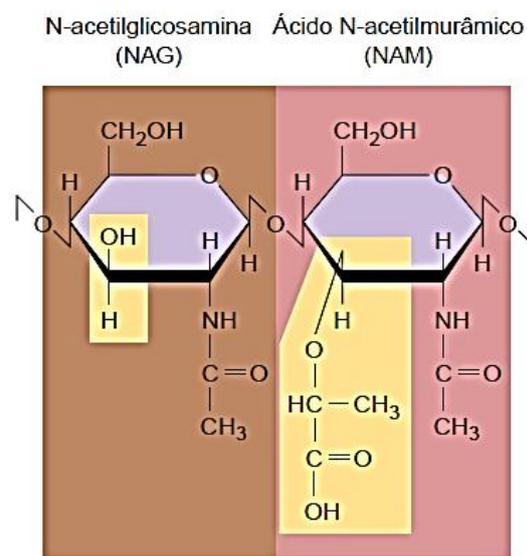


Figura 2.5: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurânico (NAM) unidos como na peptídeoglicana (Tortora *et al.*, 2012)

Outro fator diferencial fundamental das bactérias Gram-positivas, é a presença de ácidos teicoicos na sua estrutura (Figura 2.6). Essa molécula é formada pela união de um ácido e fosfato, grupo que atribui carga global negativa à parede celular.

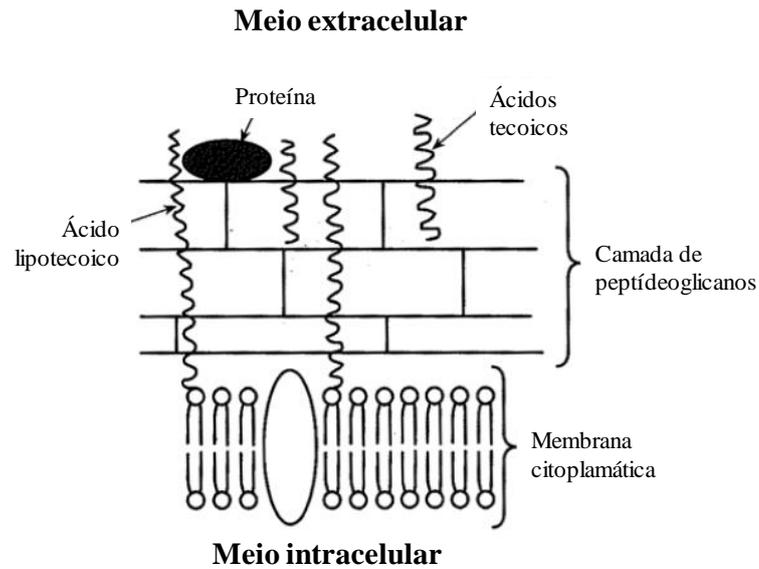


Figura 2.6: Constituição da parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptada de Hogg (2005).

Como pode ser visualizado na Figura 2.7, os ácidos teicoicos podem estar ligados aos peptídeoglicanos da parede celular (*wall teichoic acids*, WTA) ou aos lipídeos da membrana celular (*lipoteichoic acids*, LTA). Os WTAs podem representar de 30 a 60% em massa da parede celular (Neuhaus e Baddiley, 2003). Ambas as estruturas estão presentes simultaneamente em várias espécies de bactérias Gram-positivas (Steen, 2005).

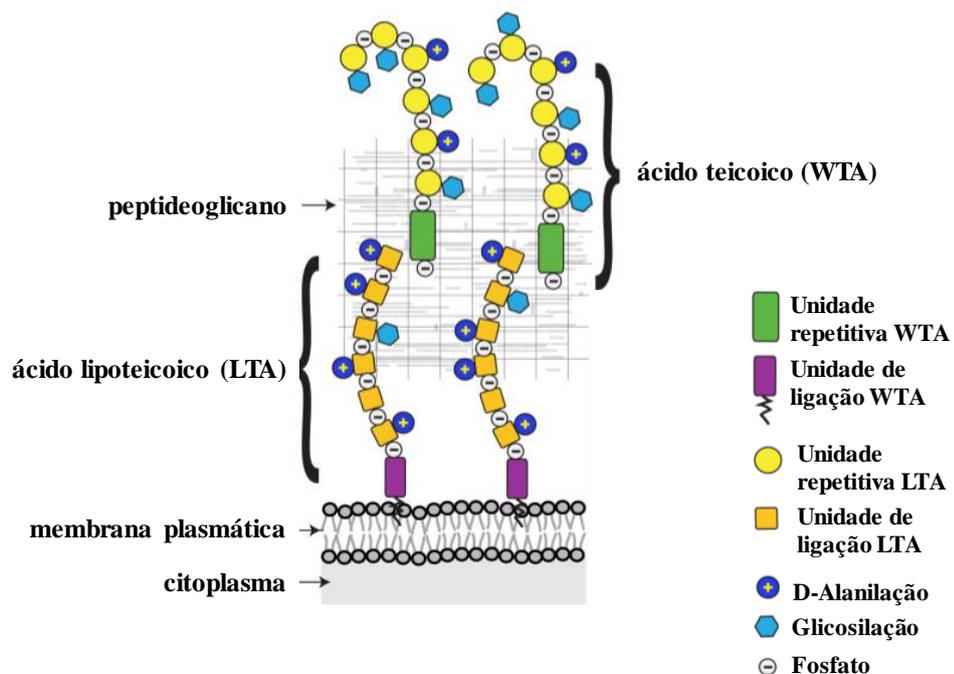


Figura 2.7: Distribuição dos ácidos teicoicos na parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptada de Brown *et al.* (2013).

Os ácidos teicoicos têm sido relacionados a diversos processos celulares, tal como, o controle da atividade da enzima auto lisina, responsável pelos processos de quebra das camadas de peptidoglicano, permitindo a multiplicação e autólise celular. Além de estarem diretamente envolvidos nas propriedades eletroquímicas da parede celular, por formarem ligações com cátions, mono e bivalentes, a fim de reduzir a repulsão entre os grupos fosfatos, de densidade negativa (Swoboda *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2013).

Bactérias Gram-negativas a fim de compensar a menor espessura da camada de peptidoglicano apresentam na membrana externa lipopolissacarídeos (LPS), estrutura complexa representada na Figura 2.8, formada entre lipídeos e carboidratos (Tortora *et al.*, 2012).

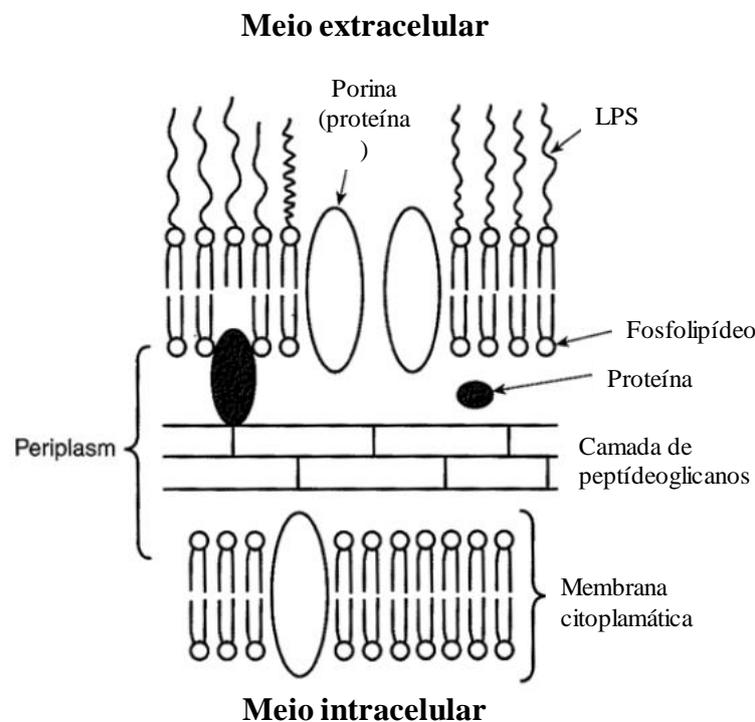


Figura 2.8: Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas. Adaptada de Hogg (2005).

O lipopolissacarídeo (LPS), estrutura ausente em bactérias Gram-positivas, pode conter lipídeo A, que é uma endotoxina causadora de patogenicidade (Naranjo *et al.*, 2013). O lipídeo A é um composto orgânico extraído juntamente com o P(3HB) na etapa de recuperação do polímero com solventes de bactérias Gram-negativas, como é o caso, por exemplo da *C. necator* (Lee *et al.*, 1999). Esse fato é um complicador em aplicações medicinais, pois esse lipídeo pode promover a rejeição do componente no organismo do paciente, sendo necessária a implementação industrial de uma etapa de purificação do produto final. Mesmo com essa dificuldade, os exemplos de produção em escala industrial atualmente

se restringem a produção de P(3HB) a partir de bactérias Gram-negativas (Valappil *et al.*, 2007a). Portanto, outro motivo para se utilizar bactérias do gênero *Bacillus* como microrganismos produtores de P(3HB) é a ausência de LPS em sua parede celular, o que permite a exclusão de uma posterior etapa de purificação do polímero após sua extração.

O gênero *Bacillus* reúne espécies patogênicas, que é o caso da *B. cereus*. Algumas cepas desse microrganismo estão relacionadas a infecções alimentares (Kotiranta *et al.*, 2000). Porém o *B. megaterium*, espécie utilizada na presente pesquisa é uma espécie não causadora de doenças (Hanna e Ireland, 1999), o que a torna mais atrativa no caso de futuro escalonamentos de processo.

A Tabela 2.3 apresenta um resumo das principais diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 2.3: Comparação das principais diferenças observadas entre a composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptada de Tortora *et al.* (2012).

Característica	Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
Espessura da camada de peptídeoglicano	Espessa (múltiplas camadas)	Fina (única ou poucas camadas)
Ácidos teicoicos	Presentes em muitas	Ausentes
Membrana externa	Ausente	Presente
Conteúdo de lipopolissacarídeo (LPS)	Nenhum	Alto
Resistência a ruptura física	Alta	Baixa

2.4 Recuperação do Polímero

A escolha do método de recuperação do polímero do meio intracelular é determinante para o custo final do produto. Por isso, a fim de aumentar o rendimento dessa etapa, pode ser associada uma técnica de pré-tratamento da biomassa, que têm como principal finalidade fragilizar a parede celular e facilitar a separação da parcela polimérica da não-polimérica. As principais técnicas de recuperação podem ser agrupadas em três grupos, método de digestão celular, separação mecânica e extração por solventes. Sendo ainda possível encontrar relatos na literatura do uso de técnicas associadas em um mesmo processo de purificação dos PHAs.

2.4.1 Técnicas de pré-tratamento da biomassa

A recuperação de produtos intracelulares já é entendida há bastante tempo como um processo que exige uma etapa de pré-tratamento da biomassa com o propósito de elevar os índices de recuperação dos produtos de interesse (Chisti e Moo-Young, 1986). O tratamento prévio visa romper ou aumentar a permeabilidade da parede celular do microrganismo. São

conhecidos diversos meios de recuperação dos grânulos intracelulares de P(3HB) (Jacquel *et al.*, 2008). A seguir são discutidas as peculiaridades de cada um dos métodos, bem como a influência de tratamentos preliminares da biomassa, a fim de aumentar o rendimento da recuperação polimérica com menor impacto na massa molar e maior pureza.

A ruptura mecânica de células compreende o rompimento da parede celular com liberação dos produtos citoplasmáticos. Essa técnica é especialmente importante no caso de bactérias Gram-positivas, por apresentarem maior resistência à recuperação do polímero (Harrison, 1991).

Pulsos de pressão com CO₂ supercrítico (CO₂-sc) são capazes de causar a ruptura celular, reduzindo o tempo de exposição do polímero ao solvente. Hejazi *et al.* (2003) afirmaram que seria possível recuperar 89% do polímero em 15 min de contato biomassa/clorofórmio a partir das células submetidas ao fluxo de CO₂-sc por 100 min, 200 atm, 40 °C e metanol. A aplicação de fluido supercrítico ainda é uma técnica pouco estudada quando se refere à ruptura celular para recuperação de P(3HB).

De acordo a Hampson e Ashby (1999), apesar de evidenciada baixa solubilidade do P(3HB) em CO₂-sc, ao se submeter a biomassa ao fluido supercrítico, ocorre a remoção de lipídeos celulares. Isto permitiria atingir maior teor da pureza do P(3HB) recuperado pela técnica de extração por solventes, visto que solventes halogenados solubilizam não apenas o polímero intracelular, mas também os lipídeos da biomassa (Hampson e Ashby, 1999).

Diferentes técnicas de pré-tratamento da biomassa foram avaliados por Divyashree *et al.* (2009). A biomassa de *Bacillus flexus* foi submetida a três tratamentos prévios, a ação de proteases produzidas por *Microbispora* sp., a ultrassom e a digestão por hipoclorito de sódio. Na etapa de recuperação de P(3HB) a biomassa foi adicionada a um sistema aquoso de duas fases, polietileno glicol (PEG) (12%, m/v) e fosfato de potássio (9,7%, pH 8,0). Nesse sistema, esperava-se que o polímero permaneça na fase superior de PEG, enquanto que o resíduo celular permaneça na fase inferior do sistema. A comparação das técnicas de pré-tratamento permitiu identificar que a recuperação a partir das células submetida ao ultrassom é bastante inferior, 19%, em relação à obtida por hipoclorito de sódio, 51%, e ação de proteases, 45,3%.

Quines (2015) avaliou o impacto da aplicação de métodos mecânicos sobre *C. necator* antes da etapa de extração de P(3HB) por carbonato de propileno. Foram avaliados ultrassom e homogeneizador de alta pressão, sendo o segundo, o método destacado como o mais eficiente e promissor para aplicação em escala industrial. A aplicação em conjunto das técnicas de rompimento celular e extração por solventes, permitiu trabalhar com menor tempo de contato biomassa/solvente, o que impacta em menor agressão à estrutura molecular do polímero, além de economia de energia.

2.4.2 Técnicas de recuperação do polímero

a) Recuperação por digestão celular por via química ou enzimática

A técnica de digestão celular visa a solubilização do material celular com liberação dos grânulos de polímero na forma sólida no meio (Kunasundari e Sudesh, 2011). O processo de digestão celular pode ocorrer por ação de agentes químicos ou por ação de enzimas (Quines *et al.*, 2015a).

No método que utiliza agentes químicos, um dos grandes desafios é minimizar a agressão sofrida pelo polímero durante o tratamento. Recentemente, foram avaliados separadamente o hidróxido sódio, hipoclorito de sódio, ácido sulfúrico, bem como a mistura de hipoclorito de sódio e diclorometano (López-Abelairas *et al.*, 2015). Foi possível evidenciar a redução de massa molar do P(3HB), a qual diminuiu entre 3,8 a 11,8 vezes quando comparada ao polímero extraído por extração com clorofórmio. Além disso, observou-se o aumento do índice de polidispersão entre 1,6 e 4,5 vezes.

Outra dificuldade é o rápido decréscimo de eficiência de digestão celular com o aumento da proporção de biomassa seca e volume de solução utilizada. Foi observado que para a proporção de 2,5% (massa de sólidos/volume de solução de hipoclorito de sódio comercial) a taxa de recuperação de P(3HB) foi de 82% com pureza de 97-98%, enquanto que quando a proporção avaliada foi de 7,5% (massa de sólidos/ volume de solução) estes valores decresceram para 70 e 80%, respectivamente (López-Abelairas *et al.*, 2015).

Uma das alternativas existentes conjuga a ação de agentes surfactantes e quelantes. Enquanto o agente quelante promove o rompimento celular, o agente surfactante promove a solubilização do material que não seja de P(3HB). Tal método, nas condições ideais encontradas (proporção de 12:1 de biomassa seca: surfactante, 8:1 de biomassa seca: quelante, temperatura de 50 °C, pH igual a 13 por 10 min) foi capaz de permitir recuperação de 98,7% com pureza de 93,3%. Porém, como consequência do ataque químico, houve grande diminuição da massa molar do P(3HB) no processo de recuperação (Chen *et al.*, 1999).

O método de digestão celular por ação enzimática pode ser classificado como método biológico de recuperação do P(3HB). Algumas enzimas são capazes de solubilizar a parede celular sem agredir significativamente a massa molar do polímero. No final do processo se obtém duas fases, uma sólida constituída de P(3HB) e uma fase líquida com os demais constituintes do microrganismo.

Kapritchkoff *et al.* (2006) verificaram a capacidade de digestão de material celular de *C. necator* (*Ralstonia eutropha*) por diversas enzimas. Entre elas se destacaram a bromelina e a tripsina, ambas proteases, que são enzimas capazes de romper ligações peptídicas. Tais enzimas foram testadas segundo diferentes formas de operação, isoladas, aplicadas em um

estágio e em dois estágios, com lavagem das células entre os períodos de contato com a biomassa, e conjugadas. A maior solubilização de matéria não-P(3HB), próximo de 90%, ocorreu quando as células foram previamente liofiozadas e re-suspendidas em solução tampão de pH 4,75.

Recentemente foi testada a possibilidade de facilitar a lise celular pela adição de agentes surfactantes e agentes quelantes de íons cálcio e magnésio, a fim de aumentar a eficiência da recuperação enzimática. Através desse método de recuperação, foi possível atingir 94% de pureza final com redução de 6% na massa molar média, partindo-se de um percentual de P(3HB) em massa de células secas de *C. necator* superior a 37% (Martino *et al.*, 2014).

Neves (2009) avaliou diferentes enzimas para digestão da parcela não-P(3HB) a partir de *C. necator*. A Celumax® BC foi identificada como a enzima de maior potencial para o processo de recuperação de polímero, não tendo sido necessário o uso de outros produtos químicos no processo de rompimento celular.

A baixa degradação molecular deve-se a grande especificidade das enzimas, ou seja, a capacidade desses biocatalisadores reagirem apenas com determinadas moléculas da constituição da parede e membrana celular. Porém esse método ainda apresenta alto custo quando comparado com métodos alternativos de recuperação de PHA, devido ao valor elevado das enzimas empregadas no processo (Quines *et al.*, 2015a), apesar disso Neves (2009) sugere que o alto custo da enzima pode ser compensado pelo seu desempenho.

b) Recuperação por método mecânico

A recuperação por método mecânico do P(3HB) ocorre em duas etapas. Inicialmente, as células suspendidas em meio líquido são submetidas ao processo de rompimento celular e em seguida centrifugadas para separação do P(3HB) do restante dos resíduos celulares (Van Hee *et al.*, 2004; Quines *et al.*, 2015a). Os equipamentos de ruptura celulares mais referenciados na literatura são o moinho de esferas e o homogeneizador de alta pressão (Harrison, 1991).

Tamer *et al.* (1998) compararam esses dois equipamentos para ruptura mecânica com a técnica de digestão celular química para recuperação de P(3HB) de *Azohydromonas lata*. Os resultados encontrados sugerem que a digestão celular com dodecilsulfato de sódio e hipoclorito não seria adequada para aplicações industriais devido ao grande tempo necessário para ação dos agentes químicos. Enquanto que, entre as técnicas de recuperação por método mecânico avaliadas, a aplicação do homogeneizador de alta pressão é superior ao moinho de esferas para suspensões com quantidade superior a 45 kg de massa seca de células por metro cúbico. No mesmo estudo, ainda se identificou que a eficiência da ruptura mecânica está associada à concentração de biomassa no meio líquido.

Ghatnekar *et al.* (2002) defendem que o homogeneizador de alta pressão seria um método com potencial para aplicação industrial ao obter rendimento de 95% e pureza de 80% para o P(3HB) recuperado a partir de *Methylobacterium* sp V49, processada em dois ciclos com pressão igual a 400 kgf/cm². Os autores observaram ainda que quando a pressão é aumentada, ocasiona o aumento da temperatura, e esta, quando atinge valores próximos ou acima de 60 °C, provoca o fenômeno de precipitação de algumas proteínas presentes na suspensão, o que dificulta a separação do P(3HB) do sólido obtido.

Um dos desafios do método de recuperação mecânica de P(3HB) é a baixa pureza do polímero produzido. A associação de tratamento físico com agentes químicos pode resultar em aumento da pureza do polímero obtido. Ling *et al.* (1997) obtiveram a melhor recuperação e pureza de P(3HB), 81% e 96,5%, respectivamente, a partir de *E. coli* recombinante quando realizaram, após a primeira centrifugação, um tratamento com hipoclorito de sódio. Esse tratamento facilitou a separação dos grânulos de P(3HB) dos detritos residuais de biomassa, aumentando a pureza do produto obtido. Os mesmos autores sugerem que tal técnica de recuperação seria competitiva para aplicação em escala industrial, pois não requer, tratamento enzimático ou adição de detergentes nem mesmo pós-tratamento com peróxido de hidrogênio. O P(3HB) obtido apresentou baixo teor residual de proteínas e DNA bacteriano.

Garcia (2006) apud Quines *et al.* (2015a) afirmam que a moagem em moinho de esferas provoca o rompimento da parede celular. Porém a otimização e escalonamento dessa técnica é bastante complexa, pois sua eficiência depende de muitos fatores, como, por exemplo, tamanho e quantidade das esferas, geometria interna do equipamento, temperatura e concentração celular.

Assim como já referenciado na Seção 2.4.1, é possível associar a ruptura mecânica a outras técnicas de recuperação de P(3HB). Essa associação se torna especialmente favorável quando a etapa subsequente é a recuperação por solventes. O tratamento mecânico prévio da biomassa pode facilitar a solubilização do polímero por reduzir à resistência a transferência de massa ao fragilizar ou romper completamente a parede celular.

c) Recuperação por extração com solventes

O método de recuperação de P(3HB) mais adotado industrialmente é a extração por solventes, que permite atingir altos níveis de pureza (Ramsay *et al.*, 1994; Quines *et al.*, 2015a). A vantagem dessa metodologia é a facilidade de escalonamento e aplicação em ambiente industrial, visto que faz uso de equipamentos de fácil operação.

Essa técnica de recuperação pode ser compreendida em dois estágios: inicialmente a permeabilidade da membrana bacteriana é modificada permitindo a entrada do solvente no meio intracelular, que então é capaz de solubilizar o grânulo de polímero e carregá-lo para o meio extracelular. Na sequência, o PHA é separado por evaporação completa do solvente ou por precipitação do polímero, que pode ser promovida pela adição de um não-solvente à

solução polímero-solvente (Jacquel *et al.*, 2008) ou ainda por redução da temperatura (Riedel *et al.*, 2013).

Os solventes clorados foram os primeiros a apresentarem resultados satisfatórios para recuperação de PHA. Ramsay *et al.* (1994) avaliaram a solubilidade de P(3HB) em clorofórmio, diclorometano e 1,2-dicloroetano com e sem pré-tratamento com acetona e em diferentes condições de operação. Atingiu-se 70% de recuperação e 96% de pureza para 15 min de contato com *C. necator* (*A. eutrophus*), pré-tratada com acetona. Nesse estudo utilizou-se a proporção de 10 mL de solvente para cada grama de biomassa liofilizada. O pré-tratamento com acetona contribuiu para o aumento do percentual de recuperação e pureza do P(3HB) intracelular, o que foi apontado como um indício de que, solventes polares facilitam a extração possivelmente por removerem as moléculas de água que permanecem ligadas à parede celular, mesmo após a liofilização. Esse mesmo estudo ainda quantificou a degradação do polímero quando posto em contato com o clorofórmio, verificando que há rápida degradação da estrutura molecular na primeira hora, com uma redução de aproximadamente 30% na massa molar média.

Valappil *et al.* (2007b) aplicaram a técnica de recuperação por solventes para uma bactéria Gram-positiva, *B. cereus*. Os autores encontraram uma recuperação de 82% e pureza de 92% para um tempo de contato de 48 h a 37 °C, utilizando clorofórmio. Côrrea (2014), aplicando a mesma condição de extração para *B. megaterium*, encontrou 100% e pureza de 100%. Esses foram os únicos relatos encontrados na literatura sobre a aplicação dessa técnica para bactérias Gram-positivas.

No entanto, apesar de capazes de extrair o PHA intracelular, solventes clorados apresentam alto potencial poluidor. Dessa forma, é de interesse encontrar um solvente alternativo, preferencialmente orgânico, produzido a partir de recursos renováveis e de baixo impacto ambiental. Em sua patente, Kudikar *et al.* (2000) afirmam que bons solventes para PHA seriam compostos de cadeia aberta ou fechada de álcoois de 4 a 10 carbonos, ésteres de 1 a 13 carbonos, amidas de 2 a 18 carbonos e cetonas de 2 a 12 carbonos em sua estrutura molecular.

Algumas patentes industriais que apontam a viabilidade de métodos de recuperação de PHA do meio intracelular com solventes de baixa toxicidade já foram publicadas. Mantelatto (2004) descreveu um processo, capaz de recuperar o PHA em escala industrial utilizando álcool isoamílico, que mais tarde, em sua tese, foi comparado em termos de capacidade de extração com o propionato de isoamila. Este último mostrou-se muito promissor, pois foi capaz de atingir concentração superior a 12 g de P(3HB) em 100 g de solvente a temperaturas próximas a temperatura de ebulição, o que representa cerca de 17 vezes mais biopolímero dissolvido no extrato (Mantelatto, 2011).

A solubilidade do P(3HB) em solventes alcóolicos (isopentanol, n-pentanol, n-butanol, e isobutanol) foi avaliada por Corrêa (2014), que relatou que nenhum dos álcoois anteriores foi capaz de dissolver quantidades significativas do bioplástico.

Ibrahim e Steinbüchel (2009) testaram tetracloreto de carbono e acetato de etila, não tendo sido identificada considerável solubilização quando se utilizou a proporção de 100 mg de células em 2 mL em solvente, em contato *overnight* a temperatura ambiente.

Fiorese *et al.* (2009) avaliaram o carbonato de propileno como potencial solvente de P(3HB), obtendo rendimento de 95% e pureza de 84% de P(3HB) extraído a partir de *C. necator*, com tempo de contato de 30 min e temperatura de 130 °C. Em comparação com a extração de referência com clorofórmio, o uso de carbonato de propileno levou a um polímero com menor índice de polidispersão, apesar de ter gerado uma diminuição de 26% na massa média do polímero extraído com relação ao que foi verificado com o clorofórmio. Avaliando o mesmo solvente, Christopher (2010) encontrou solubilidade do P(3HB) puro superior a 350 g/L a 140 °C. O autor relatou que a massa total de P(3HB) dispersa no solvente foi solubilizada em um tempo de contato inferior a 3 min.

Vizcaino-Caston *et al.* (2016), apesar de utilizarem em seu estudo uma bactéria Gram-negativa, a *C. necator*, sugeriram que o dimetilsulfóxido seria um solvente capaz de recuperar PHAs inclusive de bactérias Gram-positivas. Esta hipótese foi justificada com base no fato que eles observaram que esse solvente é capaz de causar a lise da parede celular, facilitando a solubilização do polímero.

Auad (2015) comparou o perfil de cargas aparentes induzidas na superfície da molécula de P(3HB) com os respectivos perfis de diversos solventes com auxílio do modelo termodinâmico COSMO-SAC (*Conductor-like Screening Model*). Esse estudo indicou possível solubilidade do polímero em solventes citados por Kurdikar *et al.* (2000). Destacaram-se entre os solventes o 2-heptanona e o N,N-dimetilacetamida.

Samori *et al.* (2015) afirmaram que o dimetil carbonato seria capaz de recuperar $88 \pm 6\%$ de P(3HB) a partir de *C. necator* a 90 °C, com tempo de extração de 4 h. No mesmo estudo, foi ainda avaliada a possibilidade da extração por solventes a partir da biomassa úmida, liofilizada e re-suspendida em água, além da recuperação a partir da biomassa úmida, concentrada por centrifugação após cultivo. Os autores não relataram diferença significativa entre os percentuais de recuperação de P(3HB) nos dois casos, o que sugere que a liofilização prévia da biomassa não teria impacto no aumento de rendimento da extração de polímero.

Jacquel *et al.* (2008) sugerem que proporções de polímero solvente superior a 5% (m/v) seriam um complicador do ponto de vista de aplicação industrial. A viscosidade da solução formada é alta, o que dificulta a transferência de massa no sistema.

Após a extração do polímero e remoção da biomassa residual do extrato é necessária uma etapa de separação do polímero que se encontra dissolvido. O solvente pode ser simplesmente evaporado em uma etapa de secagem. Porém, em larga escala essa opção pode se tornar bastante onerosa, devido ao alto consumo de energia. Por isso, a precipitação é uma técnica interessante para escalonamento do processo. A precipitação do P(3HB) em solução pode ser realizada de duas maneiras, ou por resfriamento da solução ou por adição de não-solvente. Alguns não-solventes usados na literatura para precipitação de P(3HB) são listados na Tabela 2.4, juntamente com a proporção usada não-solvente em relação à solução contendo o polímero (Riedel *et al.*, 2013; Fei *et al.*, 2016).

Tabela 2.4: Comparação entre não-solventes e proporções usadas para precipitar o P(3HB) em solução.

Não-solvente	Proporção utilizada de não-solvente/ solução contendo o polímero	Referência Bibliográfica
Água	4:1	(Quines <i>et al.</i> , 2015b)
Etanol	Não informado	(Samori <i>et al.</i> , 2015)
Hexano	3:1 ^a	(Riedel <i>et al.</i> , 2013)
Metanol	3:1	(Kshirsagar <i>et al.</i> , 2013)
Acetona: Etanol (1:1)	Não informado	(Fei <i>et al.</i> , 2016)
Metanol: Água (7:3)	1:1	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
Acetona	2:1	(Fiorese <i>et al.</i> , 2009)

^a elegida a melhor proporção no estudo referido.

2.5 Considerações Finais

A literatura científica sugere a aplicabilidade de diversas técnicas de isolamento do produto intracelular de bactérias produtoras de P(3HB), porém o método de extração por solventes se destaca por sua maior aplicação em escala industrial (Quines *et al.*, 2015b). A Tabela 2.5 apresenta uma síntese dos principais dados experimentais divulgados a cerca dessa técnica aplicada a PHAs.

Tabela 2.5: Dados de recuperação e pureza de PHA isolado pela técnica de extração de solventes.

Solvente	Polímero	Bactéria utilizada na produção de P(3HB)	Parâmetros (temperatura, tempo de contato)	Resultado (rendimento, pureza)	Referência
Clorofórmio	P(3HB)	<i>C. necator</i>	60 °C, 2 h	96%, 95%	(Fiorese <i>et al.</i> , 2009)
	P(3HB)	<i>C. necator</i> (<i>R. eutropha</i>)	60 °C, 2 h	94%, 98%	(Dalcaton, 2006)
	P(3HB)	<i>B. megaterium</i>	37 °C, 48 h	82%, 92%	(Corrêa, 2014)
	P(3HB)	<i>B. cereus</i>	37 °C, 48 h	100%, 100%	(Valappil <i>et al.</i> , 2007b)
Acetato de etila	P(3HB)	<i>B. megaterium</i>	55 °C, 7 h	78%, 65%	(Corrêa, 2014)
	P(3HB)	<i>C. necator</i>	25 °C, 1 h	87%, 86%	(Aramvash <i>et al.</i> , 2015)
	P(3HB)	<i>C. necator</i>	80 °C, 4 h	5%, NI	(Samori <i>et al.</i> , 2015)
Metil etil cetona	P(3HB-co-HV)	<i>C. necator</i> (<i>R. eutropha</i>)	60 °C, 15 h	93,8%, 91,4%	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
	P(3HB-co-HHx)	<i>C. necator</i> (<i>R. eutropha</i>)	100 °C, 4 h	95%, 100%	(Riedel <i>et al.</i> , 2013)
Dimetil carbonato	P(3HB)	<i>C. necator</i>	90 °C, 4 h	88%, NI	(Samori <i>et al.</i> , 2015)
Propionato de isoamila	P(3HB)	<i>C. necator</i>	130 °C, 40 min	79,78%, NI	(Mantelatto, 2011)
Dimetilsulfóxido	P(3HB)	<i>C. necator</i>	85 °C, 8 h	NI, NI	(Vizcaino-Caston <i>et al.</i> , 2016)
Carbonato de propileno	P(3HB)	<i>C. necator</i>	150 °C, 45 min	98%, 99%	(Quines, 2015a)
	PHA	<i>C. necator</i>	120 °C, 15 min	75%, NI	(Mc Chalicher e Sriene, 2010)
	P(3HB)	<i>C. necator</i>	130 °C, 30 min	95%, 84%	(Fiorese <i>et al.</i> , 2009)
2-heptanona	PHA	NI	NI	NI	(Kurdikar <i>et al.</i> , 2000)
N,N-dimetil acetamida	PHA	NI	NI	NI	(Kurdikar <i>et al.</i> , 2000)

NI: Não informado.

Muitos solventes não clorados têm sido testados para extração de P(3HB) para bactérias Gram-negativas, com destaque para *C. necator*. Porém poucos deles foram aplicados a bactérias Gram-positivas. Visto que tais bactérias apresentam camada de peptídeoglicano de espessura consideravelmente maior, é relevante que se realize ensaios em laboratório para quantificar a capacidade de recuperação dos solventes listados na literatura.

Os dados divulgados na literatura para o carbonato de propileno sugerem que os parâmetros operacionais, tempo de contato biomassa/solvente e temperatura de extração influenciam diretamente a recuperação e pureza do produto obtido.

Dentre os solventes comparados, o acetato de etila se destaca por ser apontado ora como um produto adequado para recuperação do P(3HB) (Yang *et al.*, 2015) ora inadequado, por apresentar baixa capacidade de recuperação (Samori *et al.*, 2015).

Os dados experimentais divulgados por Vizcaino-Caston *et al.* (2016) não permitem o cálculo de percentual de recuperação e pureza do P(3HB) obtido pelo método com dimetilsulfóxido. Porém, o autor afirma que o rendimento obtido com esse solvente foi bastante próximo ao obtido com a extração com clorofórmio utilizando Soxlet a 85 °C por 7 h.

O NN-dimetilacetamida e a 2-heptanona foram listados na patente industrial de Kurdikar *et al.* (2000) como bons solventes para P(3HB), porém o estudo não apresenta detalhamento dos dados quantitativos da etapa de extração.

Como discutido ao longo do presente capítulo, sabe-se que o custo final do P(3HB) está bastante relacionado com as etapas de purificação do produto executadas após o cultivo. Dessa forma, é fundamental o estudo de solventes não halogenados que permitam atingir altos índices de recuperação do produto intracelular em menor tempo de contato solvente/biomassa. É interessante que o custo dos solventes não-halogenados testados seja próximo ao clorofórmio, que atualmente é o produto mais largamente estudado para essa aplicação.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Microrganismo e condições de cultivo

A massa de células utilizada nos ensaios de extração por solvente foi obtida pela homogeneização da biomassa previamente liofilizada de dez cultivos realizados durante a elaboração da dissertação de mestrado de Guilherme de Souza Hassemer (Hassemer, 2016). No referido trabalho, o autor verificou a viabilidade de produção de P(3HB) pelo *B. megaterium* a partir de soro de leite. Os cultivos foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, em biorreatores de 5,0 L contendo 4,0 L de meio de cultivo sob condições pre-estabelecidas dos seguintes parâmetros operacionais: agitação (250 rpm, 300 rpm, 350 rpm); pH (7,0; 7,0 até 6,3; e sem controle de pH); e aeração constante (4 L·min⁻¹). Após cada cultivo a biomassa foi liofilizada e mantida congelada a fim de garantir a integridade do polímero.

Para a homogeneização de toda a biomassa liofilizada recebida, utilizou-se peneira da Série Tyler, garantindo-se assim uma mistura entre biomassa de diferentes cultivos e ainda granulometria menor que 28 *mesh*.

3.2 Caracterização da biomassa

O percentual de polímero na biomassa foi quantificado a partir metodologia proposta por Riis e Mai (1988), na qual, o polímero é previamente rompido em seus monômeros via propanólise, é analisado por cromatografia gasosa.

Foram pesadas porções de 40 mg de biomassa, às quais foram adicionados 2 mL de n-propanol acidificado com ácido clorídrico (proporção 1:4), 2 mL de dicloroetano e 200 µL de solução padrão ácido benzóico. Esta solução é preparada pela solubilização de 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. Cada frasco hermeticamente fechado, contendo a mistura de reagentes e biomassa, permaneceu em banho termostático por 2 h a 100 °C. A cada intervalo de 20 min os tubos foram agitados manualmente por 20 s. Após o período de aquecimento, aguardou-se que o líquido resfriasse até a temperatura ambiente. Nesse

momento, foram adicionados 4 mL de água destilada e se manteve a agitação por 4 min. Quando ocorreu a separação de fases, a mais densa, que contém o polímero, foi removida com pipeta Pasteur e armazenada em frasco vial a fim de ser injetada no cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, Japão (CG-2010 Plus) com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada a coluna Rtx®-Wax com comprimento de 30 m. As amostras foram injetadas por injetor automático (AOC-20i, Shimadzu Corp., Japão). Para cada conjunto de análises de amostras, foi construída uma curva de calibração com P(3HB) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), previamente preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente descritos.

O percentual de P(3HB) existente na biomassa de *B. megaterium* homogeneizada foi de $46,7 \pm 0,8\%$.

3.3 Testes preliminares de solubilidade com solventes não-halogenados

Os testes de solubilidade preliminares com solventes não-halogenados tiveram como objetivo avaliar os solventes já citados na literatura segunda as mesmas condições operacionais. O grupo I foi constituído por acetato de etila (AcEt), metil etil cetona (MEK) e dimetil carbonato (DC). Enquanto o grupo II foi composto por dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetil-acetamida (NNDA), 2-heptanona (2-Hp), carbonato de propileno (CP) e propionato de isoamila (PIso). A separação dos solventes em dois grupos distintos se deu pela diferença de solubilidade observada do P(3HB) nos solventes avaliados.

Nos experimentos com os solventes do grupo I, foram misturados, em um frasco hermético, P(3HB) Sigma-Aldrich®, Estados Unidos em excesso e de solvente. Esse recipiente foi mantido sob agitação e imerso em banho de aquecimento na temperatura de ebulição do solvente, 77 °C para AcEt, 80 °C para MEK e 90 °C para DC (*Nacional Institute of Standarts and Tecnology* - NIST). Após 6 h, duas amostras de 10 mL foram retiradas de cada ensaio e em seguida centrifugadas por 8 min a 17 x g (60 s aceleração e 60 s frenagem) em rotor aquecido previamente. O sobrenadante foi transferido para placa de Petri, previamente pesada, afim de que, após a completa secagem da amostra em estufa até peso constante, fosse possível quantificar a massa total solubilizada de biopolímero no solvente nas condições da análise.

Nos experimentos com o grupo II, foram dosados 4 mL de solvente em tubos herméticos de vidro com tampa de rosca de *teflon* (fabricante Goes). Esses frascos foram mantidos sob agitação magnética a 140 °C. O valor da temperatura escolhida para análise se deu pelas limitações experimentais das vidrarias utilizadas. Nos recipientes foram feitas adições periódicas de P(3HB) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), em quantidades previamente pesadas, até que se observasse turvação da mistura, como pode ser observado na Figura 3.1. A cada nova adição de P(3HB) cada frasco era mantido a 100 °C, valor bastante inferior a temperatura de ebulição dos solventes avaliados, DMSO 191 °C, NNDA 165 °C, 2-Hp 151 °C, PIso 156 °C, CP 242 °C (*Nacional Institute of Standarts and Tecnology* - NIST). Manteve-se cada tubo nessa temperatura por cerca de 2 min antes que fosse aberto, a fim de reduzir o erro experimental relacionado à evaporação do solvente. Todos os experimentos

foram realizados em duplicata. Essa metodologia permitiu a determinação da faixa de concentração que contém a solubilidade máxima do polímero no solvente na temperatura avaliada.

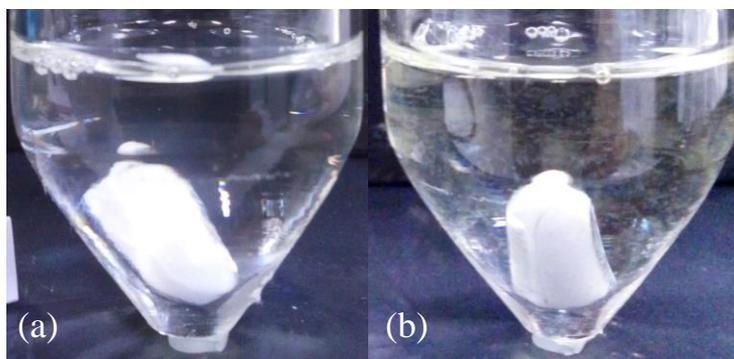


Figura 3.1: Teste de solubilidade preliminar. (a) solução solvente/polímero (b) solução solvente/polímero com P(3HB) em excesso.

3.4 Teste de extração com biomassa

Para os ensaios de extração a partir de células de *B. megaterium* foram utilizados tubos de vidro com tampa de rosca de *teflon*. Em cada frasco foram incubadas amostras de 0,2 g de biomassa em 20 mL de solvente. Por não haver consenso na literatura a respeito da proporção biomassa/solvente utilizada, a proporção escolhida foi de 1 g para 100 mL de solvente, com base no proposto por Valappil *et al.* (2007b).

Após o contato biomassa/solvente, sob temperatura controlada (140 °C) e agitação magnética, as amostras foram filtradas à vácuo, utilizando um conjunto de kitassato e funil de Büchner e papel filtro qualitativo, como meio filtrante. O filtrado, contendo o P(3HB) extraído, foi seco em estufa com circulação forçada até peso constante, Figura 3.2. Os solventes avaliados segundo essa metodologia foram o Clorofórmio, a 2-Hp, o NNDA, o CP e o DMSO. Os solventes não-halogenados submetidos a essa metodologia foram escolhidos pelo seu desempenho ao solubilizar o P(3HB) (padrão Sigma-Aldrich®) nos ensaios preliminares. O clorofórmio por ser um solvente já bastante utilizado para extração do P(3HB), como abordado no Capítulo 2, foi avaliado para fins comparativos com os demais solventes.

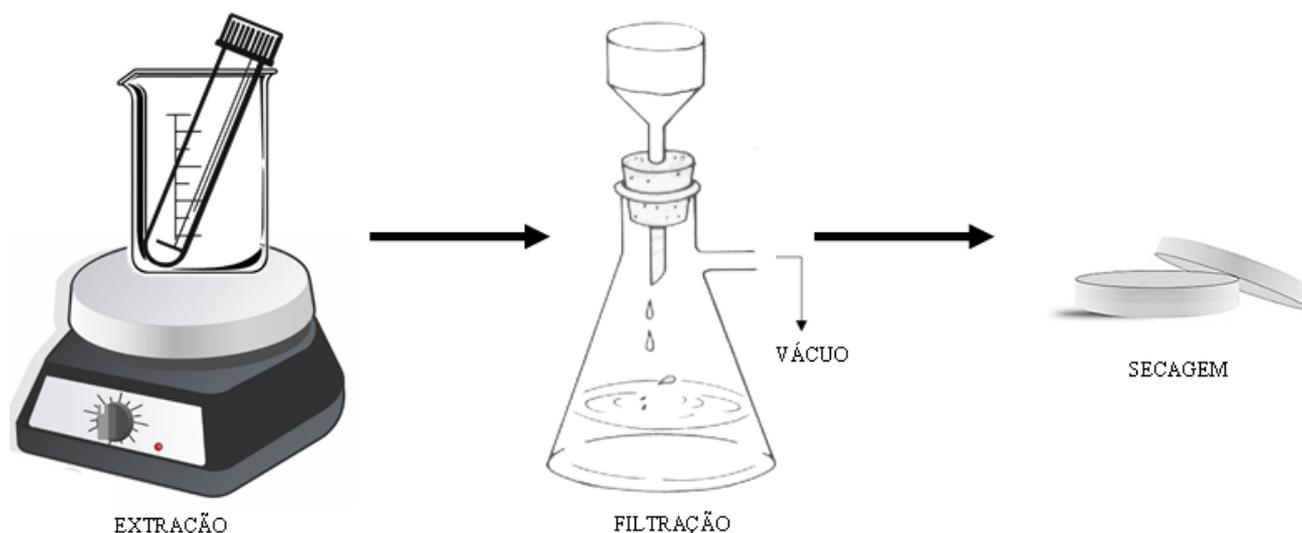


Figura 3.2: Etapas de extração do P(3HB) a partir da biomassa.

Os tempos testados, para cada um dos solventes escolhidos, estão apresentados na Tabela 3.1. Os intervalos de tempo definidos para Chl, 2-Hp, NNDA foram atribuídos considerando-se o percentual de recuperação do P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium* observada para cada solvente. Visto que não foram encontrados relatos de dados quantitativos para recuperação de polímero aplicando-se 2-Hp e NNDA, estes foram avaliados em mais intervalos de tempo, afim de se encontrar a cinética de recuperação do polímero na temperatura arbitrada. Já os solventes DMSO e CP foram avaliados apenas no tempo de 15 min para que os resultados encontrados pudessem ser comparados com os valores já divulgados na literatura para bactéria Gram-negativa.

Tabela 3.1. Tempos de extração avaliados para cada solvente.

Solvente	Temperatura de incubação (°C)	Tempos de incubação (min)
Clorofórmio	60	30, 60, 120, 180
2-heptanona (2-Hp)	140	15, 30, 60, 120, 180
N,N-dimetilacetamida (NNDA)	140	5, 10, 15, 30, 60
Dimetil-sulfóxido (DMSO)	140	15
Carbonato de Propileno (CP)	140	15

O P(3HB) obtido em Placa de Petri após secagem do solvente (Figura 3.3) foi mantido armazenado em *ependorfs* até ser avaliado, segundo sua pureza, por cromatografia gasosa pela metodologia descrita na Seção 3.2.

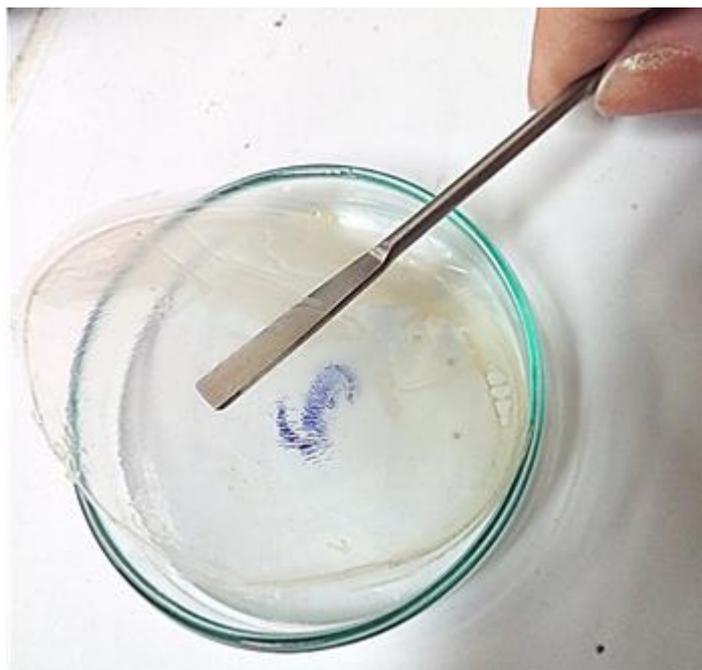


Figura 3.3: Filme de P(3HB) obtido após a etapa de secagem do solvente.

A recuperação do polímero foi calculada como apresentado na Equação (1).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{filme}} \times 100\%}{\text{massa}_{\text{P(3HB) na biomassa}}} \quad (1)$$

onde a m_{filme} é a massa do filme plástico obtido após a extração por evaporação do solvente e $m_{\text{P(3HB) na biomassa}}$ é a massa de P(3HB) na biomassa de *B. megaterium* quantificada por cromatografia gasosa (Seção 3.2).

A pureza do polímero foi calculada como apresentado na Equação (2).

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{P(3HB)}} \times 100\%}{\text{massa}_{\text{filme}}} \quad (2)$$

onde a $m_{\text{P(3HB)}}$ é a massa de P(3HB) no filme plástico quantificada por cromatografia gasosa (Seção 3.2) e m_{filme} é a massa do filme plástico obtido após a extração por evaporação do solvente.

3.5 Teste de extração com 2-Hp e CP biomassa pré-tratada com areia

A metodologia desenvolvida por Sahin (2016) foi aplicada como pré-tratamento da biomassa de *B. megaterium* antes da extração com solventes. Trata-se de uma técnica capaz de provocar o rompimento de paredes celulares de bactérias Gram-positivas pela abrasão com

grãos de areia. O objetivo foi avaliar um método de ruptura mecânica de baixo custo para futuro escalamento do processo.

Foi utilizada areia de rio em duas faixas granulométricas diferentes. A primeira entre 1,00 e 0,295 mm, e a segunda entre 0,295 e 0,250 mm, faixa de tamanho similar às esferas de vidro usadas como referência no estudo de Sahin *et al.* (2016).

A areia foi higienizada com uma solução aquosa de álcool 70% (v/v) e deixada imersa em uma solução de hipoclorito de sódio por 15 min., sendo então, enxaguadas em água corrente por 1 min. Após a etapa de limpeza da areia, se realizou a secagem em estufa.

Uma porção de 0,20 g de areia tratada foi adicionada a igual massa de biomassa em um frasco de vidro com tampa de rosca (Figura 3.4 a). Ao tubo foi adicionado parte do solvente (Tabela 3.2) e a mistura foi então mantida em vórtex por 15 min. (Figura 3.4 b). Ao final desse tempo, foi adicionado o restante do solvente necessário para chegar à proporção biomassa/solvente de 1% (m/v) durante a etapa de extração usada ao longo da pesquisa. O tempo de contato biomassa tratada com o solvente foi de 15 min. a 140 °C, metodologia já descrita na Seção 3.4. Nestes testes, somente foram utilizados o CP e a 2-Hp por serem os solventes em que, apesar de o P(3HB) apresentar boa solubilidade, os índices de recuperação de polímero a partir de *B. megaterium* foram baixos. A Tabela 3.2. apresenta as condições avaliadas no experimento.

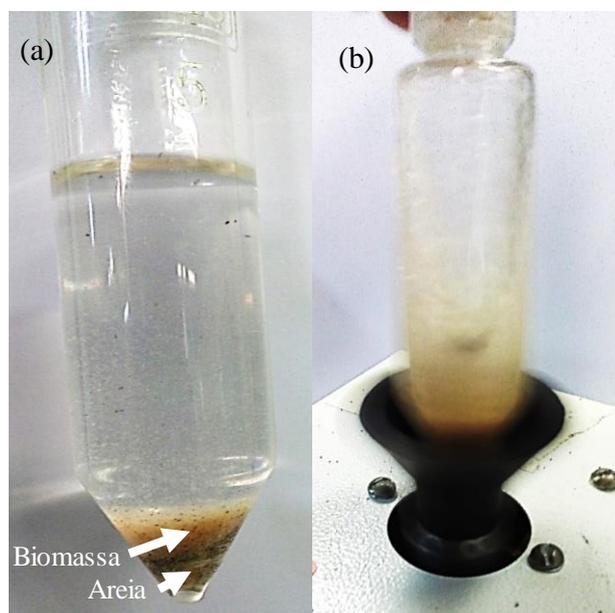


Figura 3.4: Método de ruptura da parede celular avaliado. (a) tubo de vidro com areia higienizada, solvente e biomassa. (b) mistura em vórtex.

Nessa metodologia foram variados o tamanho do grão de areia, seguindo as faixas granulométricas sugeridas no estudo utilizado como referência, e a quantidade de solvente adicionado para realização do vórtex. O volume do solvente foi variado, pois se objetivou verificar como essa variável interfere na efetividade da abrasão dos grãos de areia na parede celular na etapa de vórtex. A melhor condição encontrada para o CP foi aplicada para a 2-Hp.

Tabela 3.2: Condições avaliadas no ensaio de pré-tratamento da biomassa de *B. megaterium*.

Solvente	Faixa de tamanho dos grãos de areia utilizados	Volume de solvente adicionado para realização do vórtex
Carbonato de propileno (CP)	0,295 e 0,250 mm	5 mL
	1,00 e 0,295 mm	5 mL
	1,00 e 0,295 mm	1 mL
2-heptanona (2-Hp)	1,00 e 0,295 mm	5 mL

3.6 Testes de precipitação do P(3HB) do extrato

O ensaio de precipitação foi realizado com o NNDA. Essa técnica foi aplicada a esse solvente por sua alta capacidade de recuperação do polímero intracelular, atingindo, assim, grande quantidade de polímero dissolvido no extrato. O método de precipitação é um método alternativo à evaporação do solvente para separação do polímero contido no extrato. Visto que o ponto de ebulição de NNDA é alto, 165 °C (*Nacional Institute of Standarts and Tecnology - NIST*), a completa evaporação do solvente pode se tornar uma etapa bastante onerosa na recuperação do P(3HB).

Foi preparada uma solução de P(3HB) Sigma-Aldrich® e NNDA com concentração de polímero similar à atingida no extrato nos ensaios com biomassa após 15 min de contato biomassa/ solvente 1% (m/v) a 140 °C (Seção 3.4). Um volume de 4 mL dessa solução foi gotejado um determinado volume de não-solvente, água, etanol e propanona. Durante o gotejamento, a mistura foi homogeneizada por agitação magnética (Figura 3.5).

**Figura 3.5:** Gotejamento de solução de P(3HB) em não-solvente.

Foram avaliadas qualitativamente as proporções de (não-solvente): (solução de P(3HB)) de 1:1 e 3:1, de acordo ao descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições avaliadas para precipitação com não-solvente de P(3HB) dissolvido em NNDA a 140 °C.

Não-solvente	Proporção Não-solvente/Solvente	Tempo de Repouso
Água	1:1	20 h
	1:1	Logo após atingir 25 °C.
	3:1	20 h
Propanona (Prop)	1:1	20 h
	3:1	20 h
Etanol (EtOH)	1:1	20 h
	1:1	Logo após atingir 25 °C.
	3:1	20 h

A propanona, diferentemente da água e etanol, não provocou a precipitação do polímero logo após a mistura (solução/ não solvente) atingir 25 °C (temperatura ambiente). Por isso, essa condição não foi avaliada nessa etapa.

De cada condição avaliada para água e etanol, como não-solvente, na proporção de 1:1, foram retiradas três alíquotas, que foram centrifugadas a 9 x g por 20 min (60 s de aceleração e 60 s de frenagem) a 0 °C. A centrifugação foi feita a baixa temperatura por favorecer a precipitação do polímero. Após essa etapa, o solvente sobrenadante foi vertido e descartado, enquanto que o *pellet* residual de polímero foi seco até massa constante.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Teste preliminares com solventes não-halogenados

A Tabela 4.1 apresenta a solubilidade do P(3HB) Sigma-Aldrich® após 6 h de contato polímero com o solvente na temperatura de ebulição.

Tabela 4.1: Concentração de P(3HB) em solução após tempo de extração de 6 h.

Solvente	Concentração (g/L)	Temperatura de Ebulição (°C)
Acetato de etila (AcEt)	0,073 ± 0,001	77
Metil etil cetona (MEK)	0,073 ± 0,002	80
Dimetil carbonato (DC)	0,058 ± 0,006	90

O acetato de etila (AcEt), por ser um solvente de baixa toxicidade, bastante utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (Estevan e Vilanova, 2014), seria um composto adequado para recuperação do P(3HB) intracelular. Porém, a concentração de polímero solubilizado após contato do AcEt com P(3HB) padrão foi baixa. Corrêa (2014) também evidenciou a baixa solubilidade do P(3HB) em AcEt, estimando que seriam necessários 2521 mL de solvente para extração de 1 g de P(3HB) para uma condição de 7 h de extração a 55 °C, o que equivaleria a uma concentração máxima de 0,39 g/L para tal condição. Samori *et al.* (2015) encontraram recuperação de polímero de apenas 5% para extração com o AcEt por 4 h a 80 °C, o que equivale a uma concentração de 0,93 g/L de P(3HB) em solução. Por isso, é possível que sua aplicação industrial não seja viável tecnicamente e economicamente, devido ao grande volume de solvente utilizado e por consequência o custo de recuperação de solvente atrelado a isso. Apesar disso, há referências que apontem que a utilização desse solvente seria possível em escala industrial para recuperação de P(3HB)-co-20%HHx (Riedel *et al.*, 2013).

Da mesma forma que o primeiro solvente avaliado, o solvente metil etil cetona (MEK), apresentou baixa capacidade de solubilizar o P(3HB). Essa solubilidade é bastante

próxima da encontrada para AcEt, o que sugere a improvável aplicação industrial desse solvente. Yang *et al.* (2015) publicaram um estudo que aponta a baixa capacidade de recuperação de P(3HB)-co-12%HHx, P4HB e P(3HB)-co-10 % HV utilizando-se MEK. A recuperação, em comparação ao Chl, foi de 50%, 62 e 40% respectivamente. Porém, esse autor defende a possibilidade de aplicação em grande escala devido às características físico-químicas desse composto, pois o extrato apresenta baixa viscosidade e sua densidade é inferior à biomassa, o que permitiria o acúmulo da mesma na base do extrator.

Da mesma maneira que o MEK e o AcEt, o solvente dimetil carbonato (DC) também mostrou limitações com relação à capacidade de solubilizar o P(3HB), não alcançando concentrações apreciáveis para uma possível aplicação em escala industrial desse solvente. Tal valor contraria o estudo realizado por Samori *et al.* (2015), que evidenciou que, após tempo de contato polímero/solvente de 4 h a 90 °C, foi possível atingir uma concentração de polímero solubilizado igual a 16,3 g/L. Além da grande diferença numérica dos dados, no presente trabalho não foi evidenciada a formação de fase gel, após o resfriamento a temperatura ambiente, na solução formada, separada anteriormente da biomassa por centrifugação e filtração.

A metodologia aplicada ao AcEt, MEK e DC não pôde ser aplicada aos demais solventes. Devido a maior capacidade de solubilização de P(3HB) por propionato de isoamila (PIso), dimetilsulfóxido (DMSO), carbonato de propileno (CP), 2-heptanona (2-Hp) e N,N-dimetilacetamida (NNDA) verificou-se a formação de uma única fase durante a centrifugação, fase de aspecto gel.

A faixa de solubilidade para os solventes que foram capazes de atingir maiores concentrações de P(3HB) em solução está apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Comparação entre solventes de alta capacidade de solubilização do P(3HB) avaliados a 140 °C.

Solvente	Intervalo de concentração na qual se encontra o limite de solubilidade (g/L)	
Propionato de Isoamila (PIso)	1,3	2,5
Dimetilsulfoxido (DMSO)	65	70
Carbonato de Propileno (CP)	superior a 100	n.i.
2- heptanona (2-Hp)	superior a 100	n.i.
N,N-dimetilacetamida (NNDA)	superior a 100	n.i.

n.i.: não identificado

O propionato de isoamila (PIso) apresentou limite de solubilidade inferior a 2,5 g/L de P(3HB). Este resultado contraria o encontrado por Mantelatto (2011), que apontou o PIso como um solvente de alta capacidade de solubilização de P(3HB), afirmando que, para cada 1 kg de solução, a 140 °C, seria possível atingir a proporção de 70 g de polímero, com grau de cristalinidade igual a 48% e massa molar média de 600.000 kDa.

A concentração máxima de P(3HB) em dimetilsulfóxido (DMSO) na temperatura avaliada encontra-se entre 65 e 70 g/L. Esse solvente é uma substância polar aprótica, já mapeado como um possível substituinte para solventes halogenados no processo de recuperação de PHAs produzidos por plantas transgênicas (Cincinnati e Fairfield, 1999). Caston *et al.* (2016), apesar de utilizar em seus estudos uma bactéria Gram-negativa, a *C. necator*, sugere que o DMSO seria um solvente capaz recuperar PHAs de bactérias Gram-positivas, devido sua capacidade de permear paredes celulares espessas, típicas desse grupo de microrganismos.

Três solventes avaliados, CP, 2-Hp e NNDA, foram capazes de atingir a concentração de 100 g/L de P(3HB) em solução. Não foi testado se maiores concentrações seriam possíveis, pois soluções de P(3HB) com percentual superior a 5% (m/v) de P(3HB) podem apresentar alta viscosidade, o que tornaria o processo de difícil escalonamento e operação industrial (Jacquel *et al.*, 2008).

Os solventes 2-Hp e NNDA apresentaram grande afinidade ao P(3HB), fato previsto pelo modelo termodinâmico COSMO-SAC (*Conductor-like Screening Model*). Esse algoritmo não utiliza dados empíricos, tratando-se, portanto, de um modelo preditivo, que faz uso do perfil de cargas aparentes induzidas na superfície das moléculas (perfil σ), como apresentado na Figura 4.1 (Auad, 2015). A comparação do perfil σ da unidade repetitiva do P(3HB) e de ambos os solventes se mostrou similar, o que foi confirmado pela alta solubilidade encontrada nos ensaios de laboratório realizados no presente estudo. Além dessa referência, a patente industrial publicada por Kurdikar *et al.* (2000) afirma que os solventes 2-Hp e NNDA, foram capazes de dissolver 10 g a cada 1 L de solvente a 138 °C e 121 °C respectivamente.

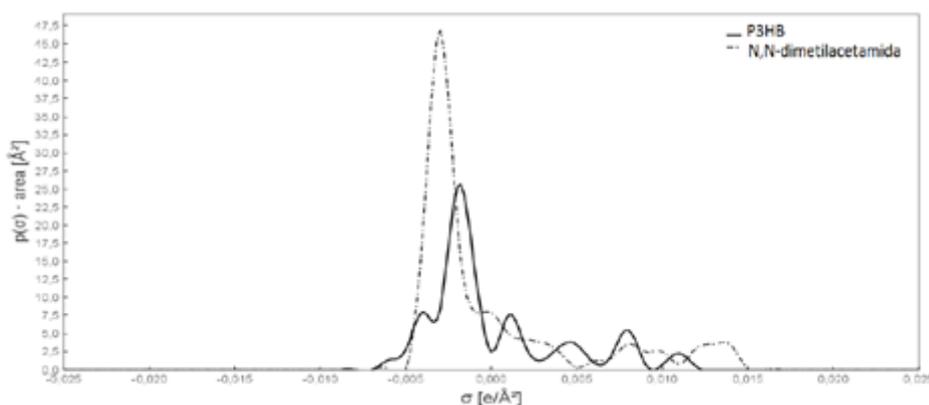


Figura 4.1: Perfis σ do P(3HB) e NNDA (Auad, 2015).

4.2 Testes de extração com biomassa

4.2.1 Recuperação de P(3HB) a partir de *B. megaterium* utilizando clorofórmio (Chl)

Foi obtida a cinética de recuperação de P(3HB) a partir da bactéria Gram-positiva *B. megaterium* para o intervalo de tempo de contato solvente/biomassa de 0 a 180 min. A pureza do polímero extraído foi também avaliada para cada um dos tempos testados. Os dados

de recuperação e pureza obtidos são apresentados na Figura 4.2.

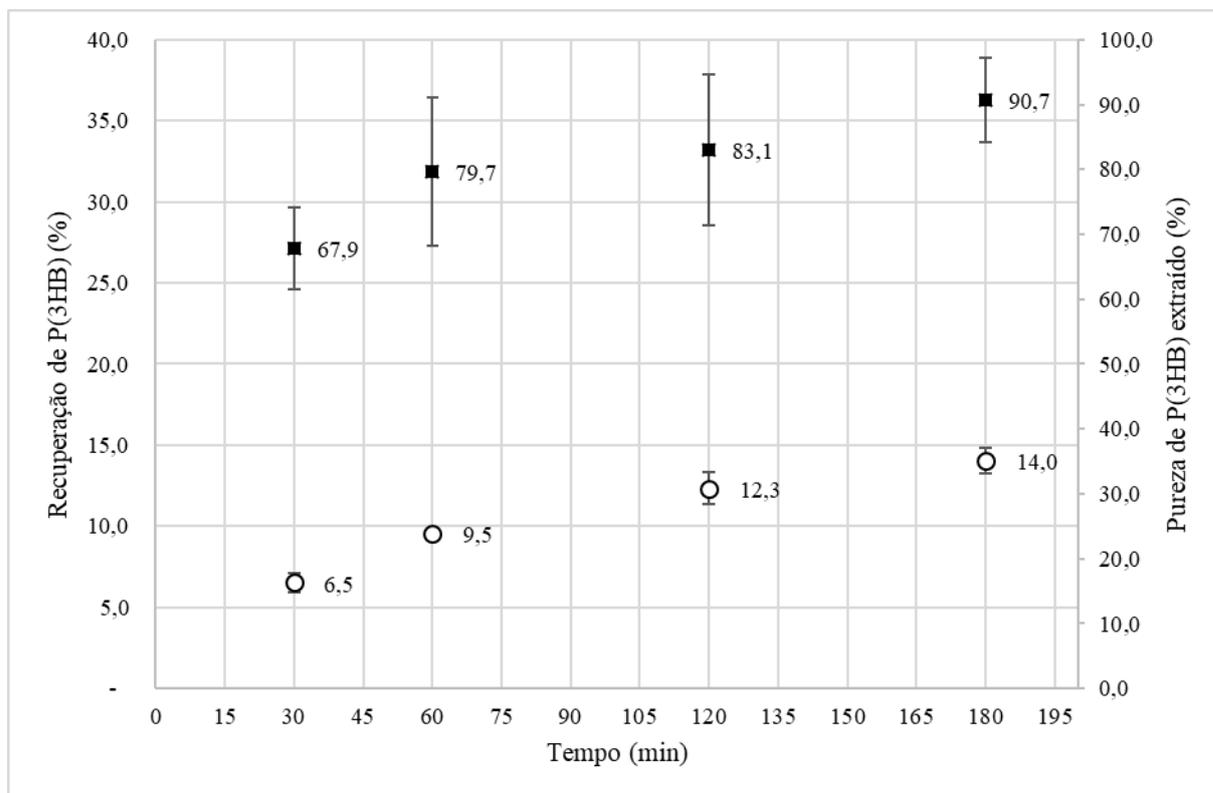


Figura 4.2: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído a partir da biomassa de *B. megaterium* com clorofórmio (Chl) até o tempo de 180 min. Recuperação percentual (○). Pureza percentual (■).

Os valores de recuperação de P(3HB) encontrados no presente trabalho foram bastantes inferiores aos encontrados por Dalcaton (2006). No referido trabalho a recuperação a partir de *C. necator* (*R. eutropha*) foi igual a 86 e 94% para o tempo de contato de 1 e 2 h, na mesma temperatura com maior proporção de biomassa/solvente, igual a 2 % (m/v). Fiorese *et al.* (2009) também publicaram resultados relacionados à extração com Chl de bactéria Gram-negativas, *C. necator*. Para 2 h de contato, a 60 °C, biomassa/solvente na proporção de 2% (m/v), estes autores obtiveram 96% de recuperação com pureza de 95%. A comparação desses resultados obtidos para extração com *C. necator* com aqueles apresentados na Figura 4.2 refletem o fato de que a transferência de massa, solvente e polímero, pela parede celular é bastante dificultada em bactérias Gram-positivas.

Essa maior resistência a permeabilidade em bactérias Gram-positivas, se deve à estrutura da parede. A parede celular do *B. megaterium* é relativamente menos complexa se comparada a *C. necator* (*R. eutropha*). No entanto, é formada por várias camadas de peptideoglicanos unidos por ligações cruzadas, responsáveis por sua grande resistência mecânica. Essa mesma estrutura também pode ser observada nas bactérias Gram-negativas, como na *R. eutropha*, porém em um número bastante inferior de camadas (Hogg, 2005). Essas variações na constituição molecular, resultam em espessuras de paredes bastante diferentes. Em bactérias Gram-positivas a parede celular representa de 30 a 70% do peso total da célula em peso seco, desconsiderando o produto intracelular, como o P(3HB). Já em bactérias Gram-

negativas a parede é responsável por apenas 10% desse valor.

Somado a isso, bactérias Gram-positivas contém ácidos teicoicos, polissacarídeos que atribuem carga global negativa à parede celular. Isto pode gerar leve repulsão das moléculas de Chl da superfície celular, visto que a molécula desse solvente tem região fortemente negativa, pelo deslocamento da nuvem eletrônica atribuído a presença de três átomos de cloro na molécula (Hogg, 2005).

Assim, espera-se que um pré-tratamento, capaz de romper ou causar fissuras ao longo da parede celular, melhore o percentual de recuperação do polímero pela técnica de extração por solventes. As técnicas mecânicas de rompimento celular de bactérias Gram-positivas se mostram promissoras, como exemplo, o método por abrasão da superfície com areia fina tratada proposto por Sahin (2016).

Na cinética obtida, percebe-se uma tendência de aumento da pureza a medida que o tempo de contato biomassa/solvente é aumentado. O mesmo comportamento foi percebido no trabalho de Corrêa (2014), que avaliou a pureza do P(3HB) obtido a partir de *B. megaterium* após 1 h e 48 h de contato com clorofórmio a 37 °C, encontrando 87,6% e 100 %, respectivamente. Em seu estudo, Valappil *et al.* (2007b) realizaram a extração de P(3HB) a partir da bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* atingindo o valor de recuperação igual a 31% e pureza igual a 92% após um período de 48 h a 37 °C, utilizando a mesma proporção biomassa/solvente adotada na presente pesquisa, 1% (m/v).

Ainda assim os valores de pureza observados nos experimentos foram inferiores aos relatados para bactérias Gram-negativas. A pureza do P(3HB) obtido após tempo de extração de 2 h, por exemplo, foi igual a $78,3 \pm 11,8\%$, enquanto os valores reportados por Daltacon (2006) e Fiorese e colaboradores (2009) para o mesmo tempo de contato e temperatura foram, respectivamente 98% e 95%. Isso, possivelmente está relacionado também à diferença estrutural da parede celular de *B. megaterium*. Supõe-se que a permeação do extrato do meio intracelular para o exterior do microrganismo seja um processo mais vagaroso nas Gram-positivas, o que facilita a solubilização de outras moléculas orgânicas, resultando na redução da pureza do polímero obtido.

4.2.2 Recuperação de P(3HB) a partir de *B. megaterium* utilizando dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO não se mostrou seletivo ao ser aplicado para extração de P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium*. O valor de recuperação de polímero obtida para 15 min de contato entre a biomassa e esse solvente, a 140 °C, foi de $138,1 \pm 2,7\%$ e pureza $51,3 \pm 1,6\%$.

O aspecto visual final da mistura extrato/biomassa apresentou coloração intensa, indicando provável presença de material celular não-P(3HB) no líquido, o qual foi confirmado pela análise da pureza do sólido residual após evaporação do solvente. Visualmente foi possível perceber que não ocorreu a formação de uma película com aspecto plástico, como nas extrações dos demais solventes avaliados (Figura 4.3). Isso provavelmente ocorreu, pela digestão de uma parcela da biomassa que apresentou afinidade com o solvente. Vizcaino-Caston *et al.* (2016) evidenciaram que células bacterianas com P(3HB) sofrem lise celular em contato com DMSO a 70 °C.

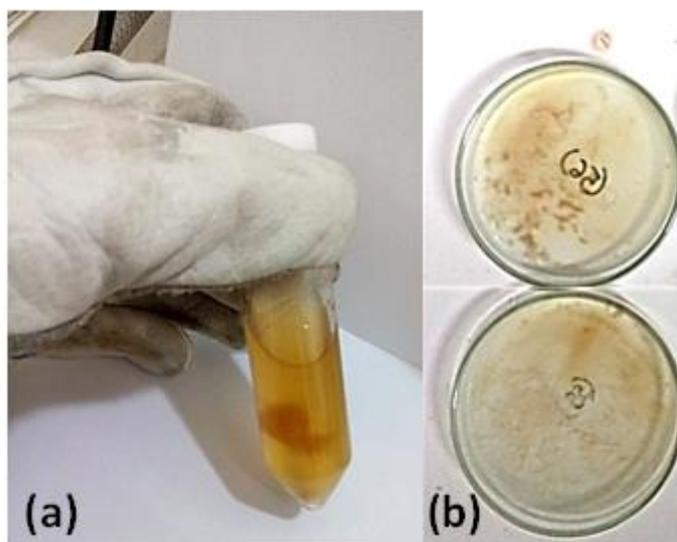


Figura 4.3: Extração de P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium* com DMSO. (a) Aspecto da mistura extrato/biomassa após 15 min de contato a 140 °C. (b) aspecto do extrato após a secagem do solvente.

4.2.3 Recuperação de P(3HB) a partir de *B. megaterium* utilizando carbonato de propileno (CP)

Quando aplicado à recuperação de P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium* o CP apresentou recuperação igual a $17,6 \pm 0,2\%$ com pureza de 96% para 15 min a 140 °C.

Samori *et al.* (2015) também obtiveram baixo rendimento na extração de PHA com CP. Quando aplicado a cultura de bactérias Gram-negativas com tempo de contato de 4 h a 140 °C a recuperação observada foi em torno de 20%. Fei *et al.* (2016) encontraram uma recuperação inferior a 10% para 30 min de contato de CP com *C. necator* e 42% de recuperação com pureza igual a 92% para o tempo de 60 min.

Apesar disso, o CP já havia sido identificado como um bom solvente para extração a partir de bactérias Gram-negativas. Resultados de alto índices de recuperação do P(3HB) foram encontrados por Fiorese *et al.* (2009), que ao avaliarem o CP, obtiveram rendimento de 95% e pureza de 84% a partir de *C. necator*, bactéria Gram-negativa, com tempo de contato de 30 min e temperatura de 130 °C. Em comparação com a extração de referência com Chl, o índice de polidispersão do polímero foi menor e a massa molar média foi 26% inferior à obtida no polímero extraído com Chl. Avaliando o mesmo solvente, Mc Chalicher *et al.* (2010) encontraram solubilidade do P(3HB) puro superior a 350 g/L a 140 °C. Foi relatado que a massa total de P(3HB) dispersa no solvente foi solubilizada em um tempo de contato inferior a 3 min. Quines *et al.* (2015a) encontraram recuperação de P(3HB) a partir de *C. necator* ao redor de 70% para tempo de contato de 15 min a 150 °C.

4.2.4 Recuperação de P(3HB) a partir de *B. megaterium* utilizando 2-heptanona (2-Hp)

A Figura 4.4 apresenta a recuperação P(3HB) a partir da biomassa em diferentes intervalos de tempo (15, 30, 60, 120 e 180 min). Foi possível perceber que o desempenho do 2-Hp é superior ao desempenho do Chl ao longo de todo o intervalo de tempo avaliado, atingindo recuperação em 180 min de $23,1 \pm 0,3\%$ contra $14,0 \pm 0,8\%$ do Chl. Com base nos resultados obtidos, supõe-se que o 2-Hp tenha melhor afinidade com a parede celular do *B. megaterium* que o Chl.

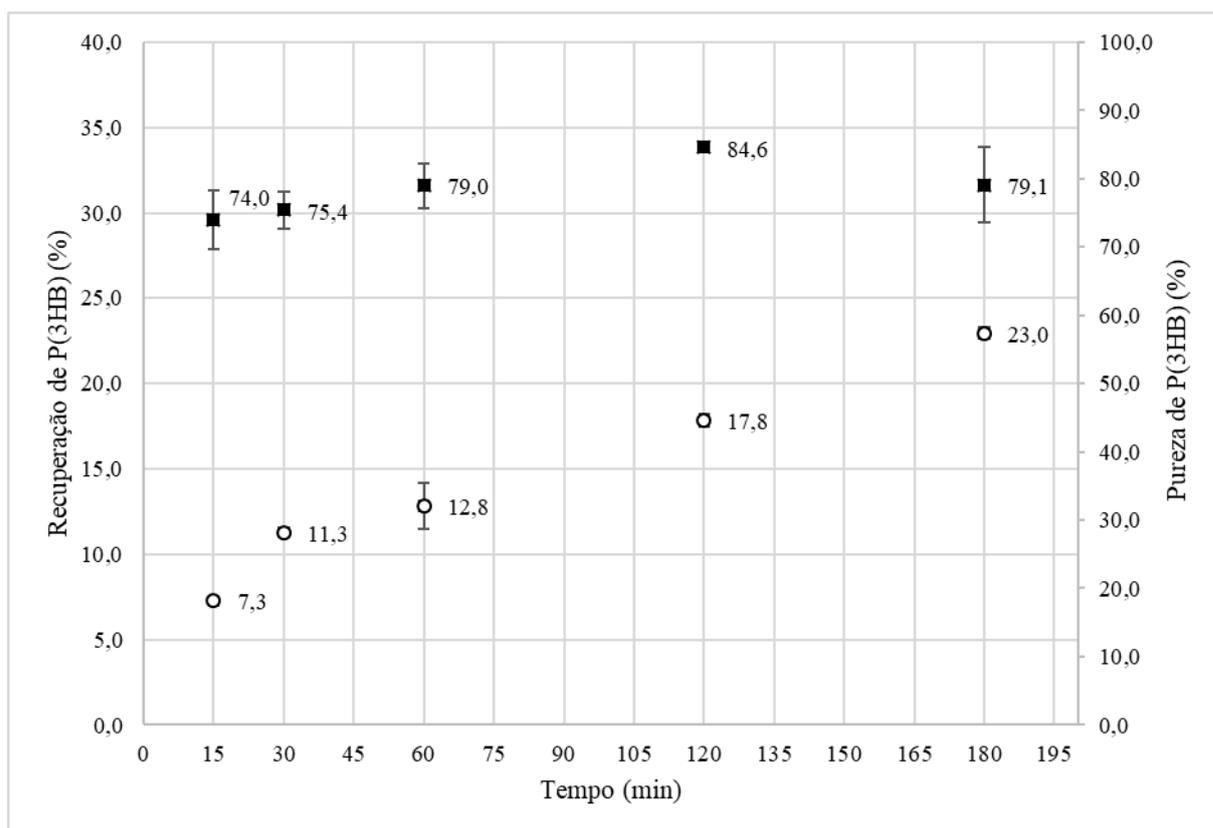


Figura 4.4: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído a partir da biomassa de *B. megaterium* com 2-heptanona (2-Hp) até o tempo de 180 min. Recuperações percentual (○). Pureza percentual (■).

Não foram encontrados na literatura dados quantitativos de recuperação e pureza para extração de PHA a partir de bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. A 2-Hp é apenas citada na patente industrial de Kurdikar *et al.* (2000) como um solvente de P(3HB), sendo capaz de dissolver 10 g de P(3HB) puro em 1 L desse solvente a 138 °C.

Uma das vantagens do 2-Hp sobre o Chl para futuras aplicações industriais é o fato desse solvente ser menos denso que a biomassa, facilitando a posterior separação das células débris do extrato contendo o P(3HB) por decantação ou centrifugação. Além disso, o 2-Hp é um solvente de baixa toxicidade e que pode ser sintetizado por microrganismos (Creuly *et al.*, 1990).

No entanto, o percentual de recuperação obtido ainda é baixo, o que possivelmente inviabiliza o escalonamento desse processo utilizando o 2-Hp sem que seja implementado uma etapa prévia de tratamento da biomassa, como proposto na Seção 4.2.1.

Deve-se ainda ressaltar que nesse estudo não foi realizada a avaliação da variação da massa molar do polímero ao longo do período de extração. Porém, é possível que a massa molar seja reduzida pela exposição por longo período do P(3HB) a 140 °C. O que fortalece ainda mais a necessidade de um pré-tratamento que reduza o tempo de contato e melhore o percentual de recuperação do polímero.

A pureza do polímero manteve-se entre 73,3 e 84,4% e diferentemente do observado com o Chl, não se percebeu uma relação clara entre a pureza e o tempo de contato da biomassa/solvente.

4.2.5 Recuperação de P(3HB) a partir de B. megaterium utilizando N, N-dimetilacetamida (NNDA)

O NNDA apresentou o melhor desempenho na recuperação do P(3HB) entre todos os solventes testados, recuperando quase a totalidade do P(3HB) em apenas 30 min de contato a 140 °C, como apresentado na Figura 4.5. Portanto, dentre os solventes estudados nessa pesquisa, pode ser apontado como o mais promissor para futuras aplicações em grandes escalas produtivas.

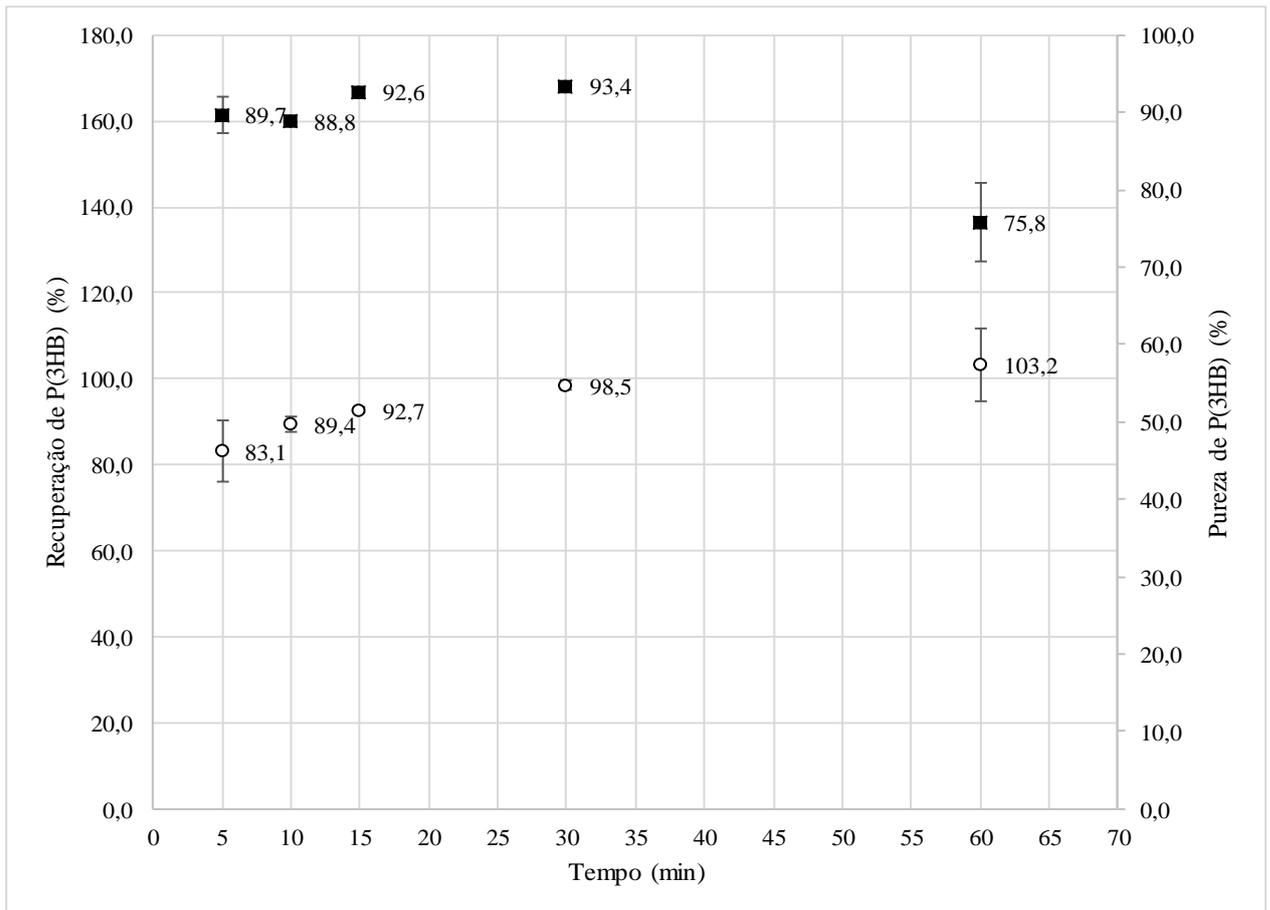


Figura 4.5: Cinética de recuperação e pureza do P(3HB) extraído da biomassa de *B. megaterium* com N,N-dimetilacetamida (NNDA) até o tempo de 180 min. Recuperação percentual (○). Pureza percentual (■).

Não foram encontrados na literatura dados quantitativos de recuperação e pureza para extração de PHA a partir de bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. O NNDA é apenas citada na patente industrial de Kurdikar *et al.* (2000) como um solvente de P(3HB), sendo capaz de dissolver 10 g de P(3HB) puro em 1 L desse solvente a 121 °C.

Uma característica física do NNDA é ser menos denso do que a biomassa liofilizada, permitindo a separação das fases após a extração por centrifugação ou decantação, Figura 4.6.

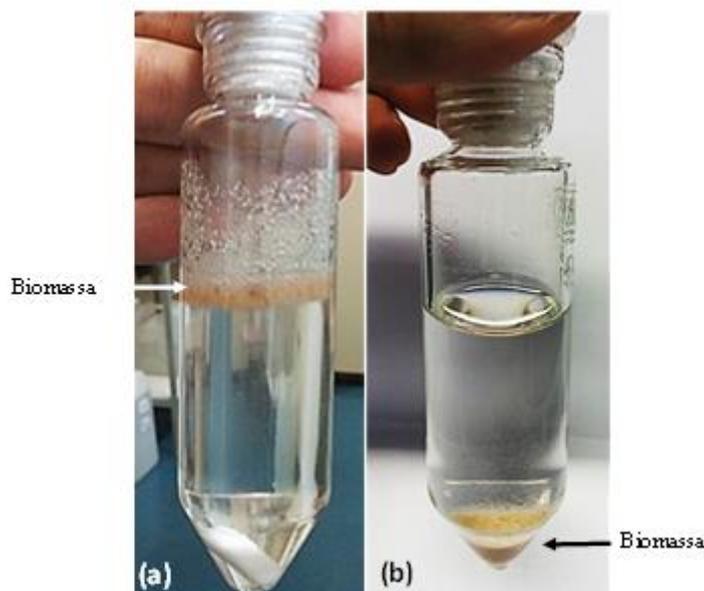


Figura 4.6: Comportamento da biomassa de *B. megaterium* em contato com clorofórmio (Chl) (a) e N,N-dimetilacetamida (NNDA) (b).

Observou-se que a pureza atingida com 15 min de contato biomassa/ solvente para NNDA foi superior à obtida para Chl, DMSO, 2-Hp e CP no mesmo intervalo de tempo. Fato que sugere forte interação do polímero/solvente. Percebe-se ainda que há solubilização da parcela não-polimérica com tempos de contato elevados. A pureza do filme foi consideravelmente reduzida no tempo de contato de 60 min, o que comprova que outras moléculas constituintes do microrganismo foram dissolvidas no extrato.

4.2.6 Análise comparativa dos solventes testados

A Tabela 4.3 apresenta uma comparação entre os solventes que atingiram um melhor desempenho em relação ao solvente clorado, Chl para extração de P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium*.

Tabela 4.3: Comparação entre os solventes avaliados.

Solvente	Faixa de valor (R\$) (1 L de reagente padrão analítico)	DL ₅₀ oral em ratos (mg/kg de peso do animal) ^d	Recuperação e Pureza (tempo de contato, temperatura)
Clorofórmio (Chl)	25,00 – 40,00 ^a	36 – 1366	6,5% e 67,9% (30 min, 60 °C)
N,N-dimetilacetamida (NNDA)	40,00 – 110,00 ^a	2604 – 5809	92,7% e 92,6% (15 min, 140 °C)
2-heptanona (2-Hp)	300,00 – 460,00 ^b	730 – 1670	7,3% e 74% (15 min, 140 °C)
Carbonato de propileno (CP)	500,00 ^b – 1.160,00 ^c	20700	17,6% e 96% (15 min, 140 °C)

^a Valores referentes a orçamentos realizados ao segundo semestre de 2016.

^b Valor disponível no site Sigma-Aldrich, consultado em janeiro de 2017.

^c Valores referentes a orçamentos realizados ao primeiro semestre de 2017.

^d Base de dados sobre toxicologia livre TOXNET.

Visto que, o custo do solvente é um aspecto fundamental para viabilidade econômica do processo, foram feitos orçamentos dos solventes avaliados. Para fins comparativos, considerou-se 1 L de reagente padrão analítico (p.a.). Verificou-se que o NNDA é o solvente com preço mais próximo ao Chl, o que sugere que esse solvente seria uma alternativa a solventes clorados. Essa troca de solventes torna-se mais atrativa, quando se considera a toxicidade do NNDA é menor que a do Chl, como abordado no Anexo 1.

Além disso, a perda de solvente por evaporação tende a ser menor quando utilizado o NNDA, pois a temperatura de extração está mais distante da temperatura de ebulição, 140 e 165 °C (Pubchem), do que no caso do Chl, 60 e 62 °C (Pubchem).

Em relação a toxicidade dos solventes, foi utilizada o parâmetro de dose letal oral para 50% da população de ratos (DL_{50}). Sendo, portanto, mais tóxico a substância que leva a morte dessa parcela dos indivíduos com a menor dosagem. É possível verificar que entre os solventes comparados o Chl, seguido da 2-Hp se destacam como os solventes mais tóxicos por via oral. Enquanto que o CP e o NNDA se destacam respectivamente por suas baixa e moderada toxicidades.

Nesse contexto, o solvente NNDA reúne o melhor conjunto de características entre os solventes avaliados. Seu custo é próximo ao do Chl, apresenta toxicidade menor que esse solvente clorado, além de atingir maior recuperação do polímero com alta pureza em pequeno tempo de extração. Ainda, a miscibilidade do NNDA com a água (Pubchem) reforça sua promissora aplicação em escala industrial, pois permite a implantação de uma etapa posterior de lavagem do P(3HB), garantindo assim completa remoção do solvente.

4.3 Teste de pré-tratamento da biomassa antes da extração

Foi observado aumento na recuperação do P(3HB) a partir da biomassa sujeita a tratamento prévio com grãos de areia, seguindo o método proposto por Sahin (2016), conforme pode ser visto na Figura 4.7.

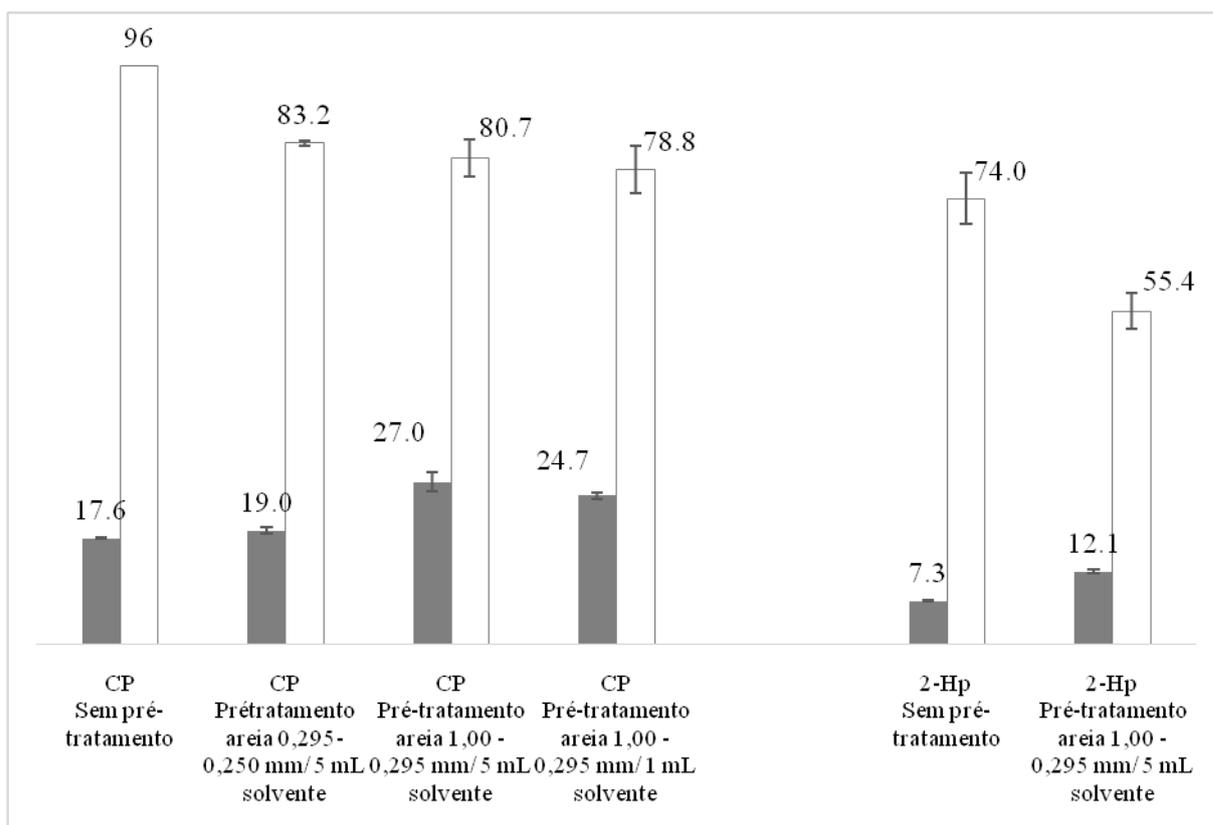


Figura 4.7: Recuperação de P(3HB) (■) com carbonato de propileno (CP) e 2-heptanona (2-Hp) a partir da biomassa de *B. megaterium* com e sem tratamento prévio por ruptura mecânica com grãos de areia de duas faixas granulométricas. Extração realizada a 140 °C por 15 min. Pureza percentual (□).

Os grãos de areia de maior granulometria, 1 a 0,295 mm, tiveram maior impacto no índice de recuperação do P(3HB). Possivelmente, por terem causado maior dano a parede celular do *B. megaterium*. Quando utilizada a areia de menor granulometria, 0,295 a 0,250 mm, a recuperação foi bastante próxima à encontrada após a extração do P(3HB) a partir da biomassa sem tratamento prévio, possivelmente pelo fato de essa faixa de granulometria não ter ocasionado rompimento celular considerável. Por isso, uma das sugestões para trabalhos futuros seria aplicação de esferas de vidro nessa etapa, como as partículas utilizadas em análises de extração de carotenoides e lipídeos em microalgas. A microscopia de varredura também permitiria avaliar o quanto a superfície celular foi de fato impactada pelo método abrasivo utilizado.

Percebeu-se que o volume de solvente utilizado na etapa do vórtex não interferiu consideravelmente no índice de recuperação de P(3HB) para a situação avaliada para o solvente CP. Apesar de se supor que menor volume poderia facilitar os choques entre as partículas sólidas e, por consequência, aumentar a abrasão na parede celular, o menor volume avaliado no experimento resultou em resultado inferior. Isso provavelmente ocorreu devido à dificuldade observada na formação do vórtex, com o movimento tornando-se caótico em alguns momentos da agitação. Assim, estabeleceu-se como melhor condição entre as

avaliadas de pré-tratamento para o CP, a formação de vórtex com 5 mL de solvente, utilizando grãos de areia de tamanho entre 1,00 e 0,295 mm.

Na sequência, essa condição foi aplicada para o 2-Hp, porém resultou em um menor aumento percentual no índice de recuperação do P(3HB) do que ocorrido no caso do CP. Esse fato pode estar relacionado ao comportamento das partículas quando sujeitas ao vórtex. Em alguns momentos percebeu-se a permanência dos grãos de areia em uma determinada região do tubo, formando uma espécie de anel (Figura 4.8), o que possivelmente ocasionou menos choques entre os sólidos.

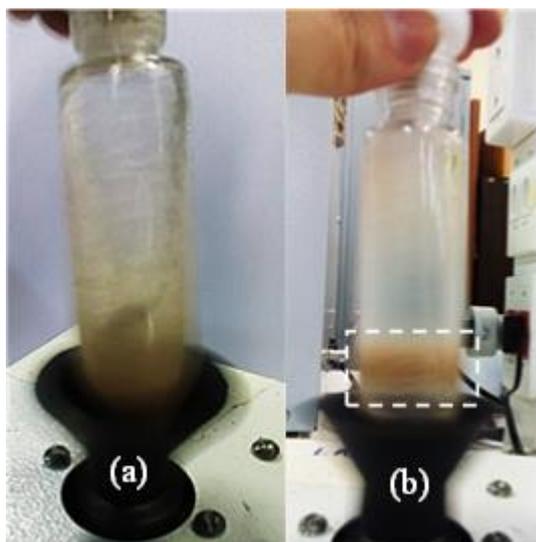


Figura 4.8: Diferença entre o comportamento das partículas durante o vórtex. (a) carbonato de propileno (CP) (b) 2-heptanona (2-Hp).

O método de abrasão por choques mecânicos com grãos de areia se mostrou promissor e pode ser otimizado em futuras pesquisas. Poder-se-ia identificar a melhor relação solvente biomassa, tempo de vórtex e ainda a granulometria que resultaria em maior recuperação do P(3HB) na etapa de extração por solventes.

4.4 Testes de precipitação do P(3HB) com não-solvente

A separação do P(3HB) solubilizado no solvente após a etapa de extração pode se dar pela evaporação do solvente ou pela precipitação do polímero com não-solvente.

A completa ebulição do solvente tende a ser uma etapa muito onerosa, especialmente quando promovida em escala industrial. Isso se deve ao alto consumo de energia exigido no aquecimento. Outra desvantagem é a possibilidade de haver a redução da massa molar do polímero em altas temperaturas.

Esses fatos sugerem que o processo de precipitação seja mais vantajoso para um futuro escalonamento do processo, pois pode ser realizado a temperatura ambiente. Apesar de não

extinguir a necessidade da etapa de secagem do polímero precipitado e da posterior separação da mistura de não-solvente e solvente por destilação. Considerando que o solvente orgânico de maior capacidade de extração do P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium* identificado nessa pesquisa, o NNDA, apresenta temperatura de ebulição alta, 165 °C, a precipitação do polímero pode ser uma alternativa para escalonamento do processo.

A precipitação com não-solvente a partir das soluções em NNDA foi avaliada qualitativamente como técnica alternativa já proposta previamente por outros autores (Riedel *et al.*, 2013; Samori *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), usando propanona, água e etanol (EtOH) como não-solventes.

A propanona não provocou a precipitação instantânea do polímero como observado no caso dos outros não-solventes avaliados. Ao final do gotejamento a mistura continuava límpida. Após 20 h, foi possível verificar a ocorrência de turvação na mistura, porém sem a existência de sólidos decantados (Figura 4.9). Como houve significativa redução de volume, devido à alta volatilidade da propanona, não foi possível quantificar o P(3HB) recuperado.

A lenta precipitação do P(3HB) na presença de propanona torna esse não-solvente não tão atrativo para aplicações industriais, visto o tempo de residência nessa etapa é bastante grande. Além disso, exigiria uma estrutura maior em termos de operações unitárias, que deveriam reter mistura até que a precipitação esteja completa.

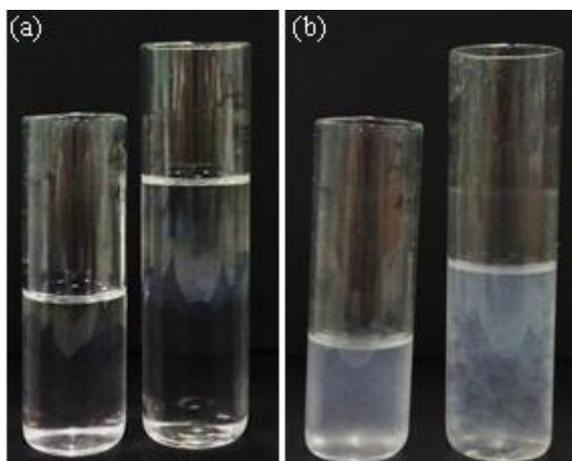


Figura 4.9: Aspecto final da precipitação com propanona como não-solvente. (a) Após o gotejamento na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (b) Após 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1.

A água e o etanol causaram início instantâneo da precipitação do P(3HB), tornando a mistura turva à medida que o gotejamento ocorria. Após 20 h de repouso, foi observado diferente comportamento entre os não-solventes. No caso da água, o P(3HB) sólido encontrase, em sua maior parte, localizado no fundo do frasco. Já no caso do EtOH, não ocorreu decantação do P(3HB), como se observa na Figura 4.10.

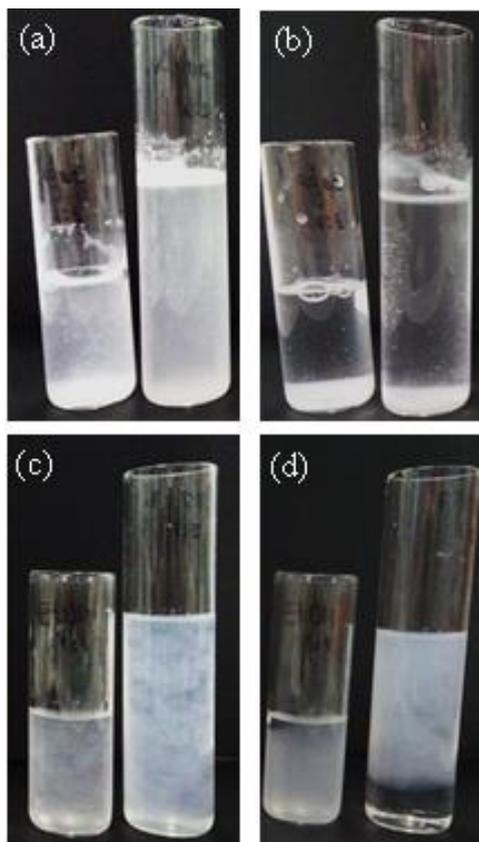


Figura 4.10: Aspecto final da precipitação com água e etanol como não-solvente. (a) Após o gotejamento de água na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (b) Após de água 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (c) Após o gotejamento de etanol (EtOH) na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1. (d) Após de etanol (EtOH) 20 h de repouso a temperatura ambiente na proporção não solvente/ solução 1:1 e 3:1.

Mesmo após a centrifugação, houve sensível diferença entre o aspecto final dos dois não-solventes. No caso do etanol, houve um acúmulo de uma fase de aspecto gelatinosa, enquanto que no caso da água, observou-se o acúmulo de sólido no fundo do *ependorf*, Figura 4.11.

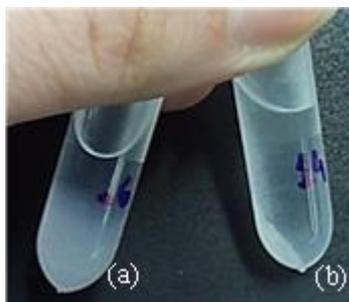


Figura 4.11: Aspecto final da amostra de polímero precipitado com não-solvente após centrifugação. (a) Etanol (EtOH) (b) Água.

Verifica-se na Figura 4.11, o inchamento do polímero na presença do etanol, isso pode indicar interação intermolecular entre o não-solvente e a cadeia polimérica. A ocorrência

desse fenômeno restringe a aplicação industrial do etanol, pois dificulta o processo de separação das fases presentes na mistura e retarda a secagem do solvente residual.

Quando se fez uso da água, como não-solvente, foi possível promover uma nítida separação entre a fase sólida e fase líquida. O que permitiu a retirada do sobrenadante em quase sua totalidade, acelerando o processo de secagem.

O percentual de polímero precipitado a partir da solução original de P(3HB) Sigma-Aldrich® sem repouso foi bastante similar para os não-solventes água e EtOH, $78,5 \pm 6,3\%$ e $79,0 \pm 7,7\%$ respectivamente (Figura 4.12). O tempo de repouso de 20 h adotado no experimento não alterou significativamente esse valor no caso da água.

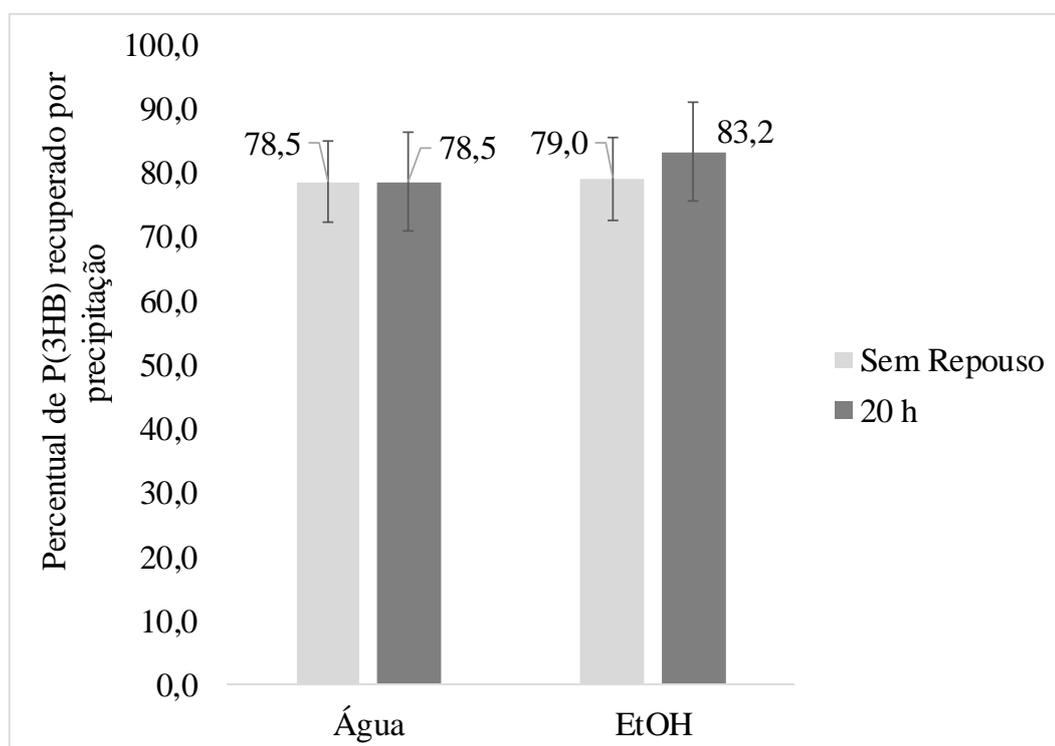


Figura 4.12: Percentual de polímero precipitado da solução original preparada com N,N-dimetilacetamida (NNDA) e P(3HB) padrão a partir de água (■) e etanol (■).

A maior proporção de não-solvente, água 3:1, resultou em menor recuperação do P(3HB), igual a $60,0 \pm 7,5\%$. Por esses motivos, elegeu-se a água na proporção 1:1 como melhor opção para promover a precipitação do polímero na solução de NNDA e P(3HB).

4.5 Proposta de fluxograma para processo industrial para extração com NNDA

O fluxograma de processo proposto para extração sugere uma sequência de etapas para a recuperação do P(3HB) a partir da biomassa de *B. megaterium* em escala industrial extraído com NNDA, levando em consideração as características físicas e toxicológicas do solvente adotado, Figura 4.13.

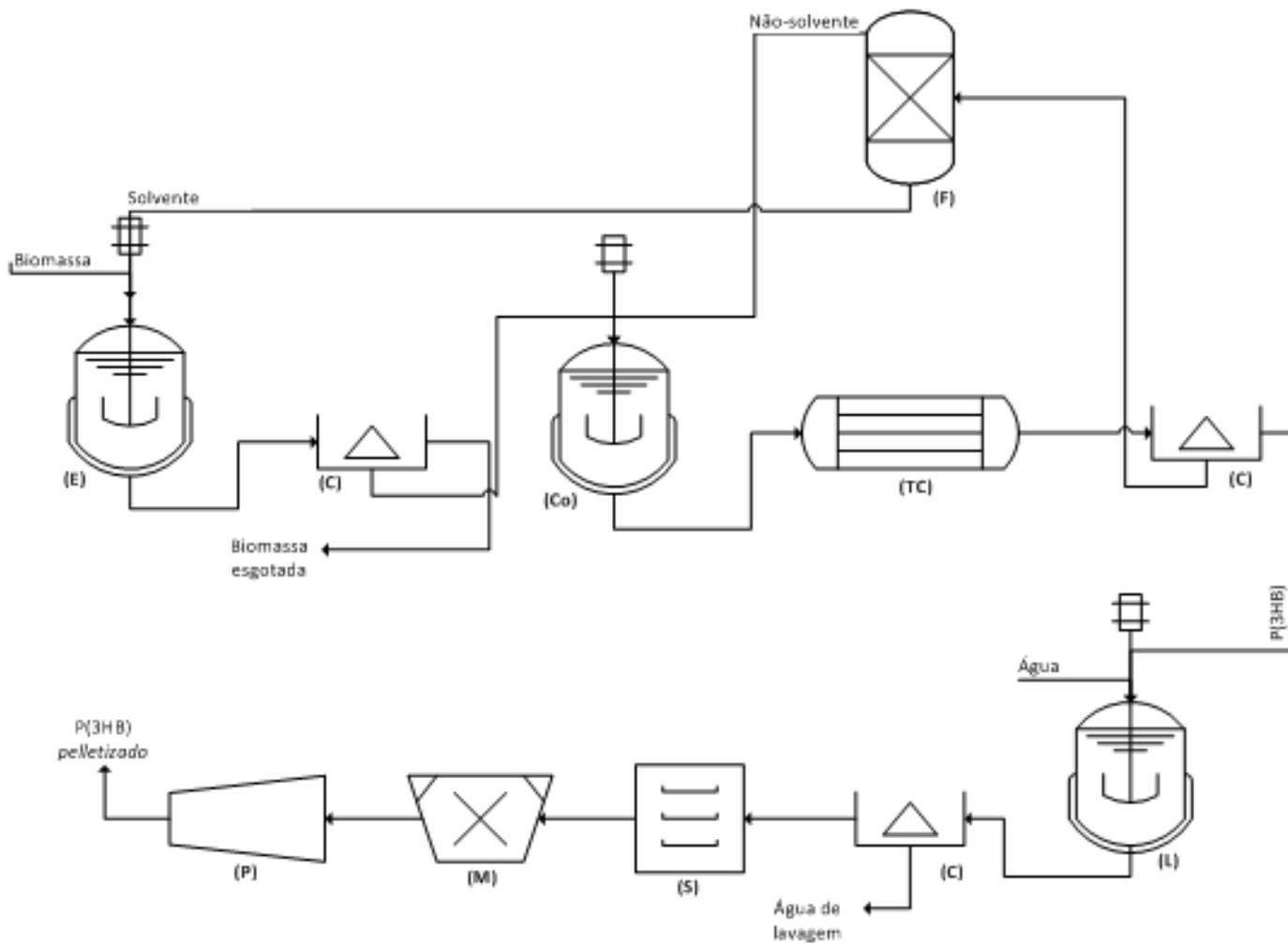


Figura 4.13: Proposta de etapas de extração. (E) Extrator; (C) Centrífuga; (Co) Tanque de co-precipitação; (TC) Trocador de calor; (F) Torres de fracionamento; (L) Tanque de lavagem; (S) Secagem; (M) Moagem; (P) *Pelletizadora*

Observou-se nos ensaios de bancada realizados que o NNDA foi capaz de recuperar mais de 90% do polímero com tempo de contato inferior a 15 min. Por esse motivo, na proposta de escalonamento não foi incluída uma etapa de pré-tratamento da biomassa. Logo, a primeira etapa do processo é a extração do polímero contido na biomassa seca, proveniente do cultivo bacteriano. A separação da biomassa residual da solução de P(3HB) é realizada por centrifugação.

A biomassa esgotada é descartada, enquanto o extrato é enviado para etapa de co-precipitação. Nessa fase a solução polimérica recebe o não-solvente e é resfriada no trocador de calor. A segunda etapa de centrifugação separa o P(3HB) sólido da fase líquida, que segue para o fracionamento em coluna de destilação.

O processo proposto inclui uma etapa de lavagem do polímero com água para garantir total remoção do solvente, visto sua potencialidade de causar efeitos adversos no fígado (Liu

et al., 2010; Ghazali e Inayat-Hussain, 2014). A mistura segue para a terceira etapa de centrifugação. A fase sólida é então aquecida para redução da umidade residual. Sendo, em seguida, encaminhada para moagem e *peletização*.

Capítulo 5

Conclusões

5.1 Considerações Finais

Neste estudo, foi possível verificar quantitativamente que os solventes acetato de etila (AcEt), metil etil cetona (MEK), dimetil carbonato (DC), propionato de isoamila (PIso), apesar de relatados na literatura previamente como bons solventes (Mantelatto, 2011; Riedel *et al.*, 2013; Aramvash *et al.*, 2015; Samori *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), não foram capazes de solubilizar quantidades representativas de P(3HB). Os demais solventes avaliados, DMSO, CP, 2-Hp e NNDA, se mostraram, nos experimentos preliminares, promissores para futuras aplicações industriais pois foram capazes de atingir altas concentrações de P(3HB) em solução sob aquecimento.

Os ensaios de extração com a biomassa comprovaram que a parede celular do *B. megaterium* apresenta uma grande resistência no processo de extração, essa conclusão foi possível comparando-se o percentual de recuperação do P(3HB) obtidos neste trabalho com os obtidos a partir de bactérias Gram-negativas, encontrados em trabalhos da literatura,

O DMSO não se mostrou um solvente seletivo para P(3HB), causando a digestão da parcela não-polimérica, produzindo um polímero de baixa pureza nas condições avaliadas. O CP e 2-Hp apresentaram desempenho similar, mas superior ao Chl, possivelmente por apresentarem maior interação com a estrutura molecular da parede celular bacteriana. O NNDA foi o solvente mais promissor entre os avaliados, atingindo valores próximos a recuperação total com apenas 30 min de contato a 140 °C. Apesar do CP, já ter sido avaliado quantitativamente para recuperação do P(3HB) de bactérias Gram-negativas (Fiorese *et al.*, 2009; Mc Chalicher e Sriene, 2010), nenhum dos quatro solventes ainda havia sido aplicado em ensaios de extração em bactérias Gram-positivas. Estas por apresentarem parede celular mais espessa, oferecem maior resistência a difusão do solvente para o interior da célula e a micela polímero/solvente para o meio extracelular.

A técnica de pré-tratamento da biomassa por ruptura mecânica pela abrasão de grãos

de areia em vortéx com *B. megaterium* se mostrou promissora a aumentar a recuperação de P(3HB) para os solventes testados, CP e 2-Hp.

No ensaio de precipitação do P(3HB) o não-solvente que apresentou melhor desempenho foi a água. Ao ser adicionado ao extrato, provocou a instantânea precipitação do polímero em grânulos de fácil decantabilidade.

5.2 Trabalhos Futuros

A fim de complementar a presente pesquisa, seria importante realizar análises complementares sobre o impacto do processo de extração com os solventes de melhor desempenho, 2-Hp, CP e NNDA, na massa molar do polímero.

Executar novos ensaios de extração a fim de encontrar o ponto ótimo de operação, ou seja, a temperatura e tempo de contato solvente/biomassa que geraria uma recuperação economicamente viável, com menor agressão a massa molar do polímero possível.

Aplicar o homogeneizador da alta pressão como um método de pré-tratamento da biomassa.

Comparar a abrasão na parede celular de *B. megaterium* provocada pelos grãos de areia em vórtex com microesferas de vidro nas mesmas condições e verificar o rompimento da parede celular por microscopia eletrônica de varredura.

Aplicar a técnica de precipitação ao extrato da etapa de extração por solventes a partir de *B. megaterium*, avaliando quantitativamente as perdas dessa etapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates the future green materials of choice, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** Volume 85, Issue 6. 85: 732-743 p. 2010.

ANDERSON, S. E. *et al.* Immunotoxicity and allergic potential induced by topical application of dimethyl carbonate (DMC) in a murine model. **Journal of immunotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 59-66, 2013.

ARAMVASH, A. *et al.* An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25(11), p. 1936–1943, 2015.

AUAD, P. **Estudo de alternativas de solventes para extração de P3HB através do modelo termodinâmico COSMO-SAC**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015

AVALLI, A. *et al.* Significance of 2-heptanone in evaluating the effect of microfiltration/pasteurisation applied to goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 10, p. 915-921, 2004.

BOURQUE, D.; POMERLEAU, Y.; GROLEAU, D. High-cell-density production of poly-B-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 367-376, 1995.

BROWN, S.; MARIA JR., J. P. S.; WALKER, S. **Wall teichoic acids of gram positive bacteria**. Manuscript, United States, 2013

CAPPELLETTI, M. *et al.* Microbial degradation of chloroform. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 96, n. 1, p. 1395-1409, 2012.

CAPRIOTTI, K.; CAPRIOTTI, J. A. Dimethyl Sulfoxide: History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology. **J. Clin. Aesthet. Dermatol**, v. 5, n. 9, p. 24-26, 2012.

- CAVALHEIRO, J. M. B. T. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 509-515, 2009.
- CHEN, X. *et al.* Biodegradation of N,N-dimethylacetamide by *Rhodococcus* sp. strain B83 isolated from the rhizosphere of pagoda tree. **Journal of Environmental Sciences**, 2015.
- CHEN, Y. *et al.* Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant–chelate aqueous system. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 153-157, 1999.
- CHEREMISINOFF, N. P. **Industrial Solvents Handbook**. 2003.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 8, p. 194-204, 1986.
- CINCIANNATI, I. N.; FAIRFIELD, L. A. S. Solvent extraction os polyhydroxyalkanoates from biomass: **The Procter & Gamble Company**. Patent 5,942,597, 1999.
- COMIN, E. **Emprego de zeólitas contendo líquidos iônicos na fixação química de CO₂ em carbonatos cíclicos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil, 2010
- CORRÊA, M. P. **Extração do biopolímero P(3HB) com solvente renovável**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil, 2014.
- CREULY, C.; LARROCHE, C.; GROS, J.-B. A fed batch technique for 2-heptanone production by spores of *Penicillium roquefortii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 20-25, 1990.
- DAHL, T. C.; BURKE, G. Feasibility of Manufacturing A Solid Dosage Form Using A Liquid Nonvolatile Drug Carrier: A Physico-Chemical Characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 12, p. 1881-1891, 1990.
- DALCATON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos**. Florianópolis, SC. 2006
- DELLEDONNE, D.; RIVETTI, F.; ROMANO, U. Developments in the production and application of dimethylcarbonate. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1–2, p. 241-251, 2001.
- DIVINCENZO, G. D.; KAPLAN, C. J.; DEDINAS, J. Characterization of the metabolites of methyl n-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea pig serum and their clearance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 511-522, 1976. ISSN 0041-008X.
- DIVYASHREE, M. S.; SHAMALA, T. R.; RASTOGI, N. K. Isolation of Polyhydroxyalkanoate from Hydrolyzed Cells of *Bacillus flexus* using Aqueous Two-phase System Contaning Polyethylene Glycol and Phosphate. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 482-489, 2009.

DU, G.; YU, J. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: methyl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 325-332, 2002.

DUARTE, I. S. D.; GOMES, H. F. C.; FERREIRA, L. M. Effect of dimethyl sulfoxide on necrosis of skin flaps in rats. **Can. J. Plast. Surg.**, v. 6, n. 2, p. 93-97, 1998.

ESTEVAN, C.; VILANOVA, E. Ethyl Acetate A2 - Wexler, Philip. In: (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p.506-510.

ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E. Chloroform A2 - Wexler, Philip. In: (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press. p. 885-890, 2014.

FEI, T. *et al.* Effective recovery of Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. **Biotechnol. Prog.**, v. 32, n. 3, p. 678-685, 2016.

FIDLER, S.; DENNIS, D. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 231-236, 1992.

FIGLIARESE, M. L. *et al.* Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences Volume 9, n. 6**, p. 454-461, 2009.

FLANAGAN, R. J.; POUNDER, D. J. A chloroform-related death: Analytical and forensic aspects. **Forensic Science International**, v. 197, n. 1-3, p. 89-96, 2010.

GARCIA, M. C. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero** Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2006.

GHATNEKAR, M.; PAI, J.; GANESH, M. Production and recovery of Poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 444-448, 2002.

GHAZALI, A. R.; INAYAT-HUSSAIN, S. H. N,N-Dimethylacetamide **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press. p.594-597, 2014.

GLANERT, A. C. C. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* a partir de hidrolisado de casca de soja**. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. 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, n. 3, p. 201-207, 2001.

GRAFMAN, H. *et al.* **Method for the production of N,N-dimethylacetamide (DMAC)**, 2012.

- GRIZIĆ, D. *et al.* Propylene carbonate quantification by its derivative 3,5-diacetyl-1,4-dihydro-2,6-lutidine. **Talanta**, v. 151, p. 75-82, 2016.
- HAGE, O.; SÖDERHOLM, P. An econometric analysis of regional differences in household waste collection: The case of plastic packaging waste in Sweden. **Waste Management**, v. 28, n. 10, p. 1720-1731, 2008.
- HALAMI, P. M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 805-812, 2008.
- HAMPSON, J. W.; ASHBY, R. D. Extraction of lipid-grown bacterial cells by supercritical fluid and organic solvent to obtain pure medium chain-length polyhydroxyalkanoates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 11, p. 1371-1374, 1999.
- HANNA, P.; IRELAND, J. A. W. Understanding *Bacillus anthracis* pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 180-182, 1999.
- HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N. G. Response Surface Modeling of Lipase-Catalyzed Isoamyl Propionate Synthesis. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 32-36, 2002.
- HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 217-240, 1991.
- HASSEMER, G. *et al.* **Avaliação do Permeado de Soro como Meio de Cultivo de Bacillus megaterium**. 5º Simpósio de Segurança Alimentar. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil, 2015.
- HASSEMER, G. S. **Produção de P(3HB) por Bacillus megaterium utilizando permeado de soro de leite**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil, 2016.
- HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery **Biotechnology Progress**. Volume 19, n. 5, p. 1519-1523, 2003.
- HENDERSON, R. A.; JONES, C. W. Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture. **Microbiology**, v. 1997, p. 2361-2371, 1997.
- HOELL, D. *et al.* **2-butanone**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2009.
- HOGG, S. **Essential Microbiology**. England: Wiley, 2005.
- HOLMES, P. A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics and Technology**, v. 16, n. 1, 1985.
- IBRAHIM, M. H.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 19, p. 6222-31, 2009.

ILETT, K. F. *et al.* Chloroform toxicity in mice: Correlation of renal and hepatic necrosis with covalent binding of metabolites to tissue macromolecules. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 19, n. 2, p. 215-229, 1973.

JACQUEL, N. *et al.* Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 15-27, 2008.

JOHNSON, B. L. *et al.* Neurobehavioral effects of methyl N-butyl ketone and methyl N-amyl in rats and mokeys: a summary of NIOSH investigations. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v. 2, n. 5, p. 113 - 133, 1979.

KAPRITCHKOFF, F. M. *et al.* Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 453-462, 2006.

KARUNASEKARA, T.; POOLE, C. F. Models for liquid-liquid partition in system propylene carbonate organic-solvent and their use for estimating descriptors for organic compounds. **Journal of Chromatography**, v. 1218, p. 809-816, 2011.

KENIG, E. Y. *et al.* Investigation of ethyl acetate reactive distillation process. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 21-22, p. 6185-6193, 2001.

KIM, B. S. *et al.* Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 556-561, 1994.

KLIGMAN M., A. Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide—Part 1. **The Journal of American Medical Association**, v. 163, p. 796-804, 1965.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 2, p. 189-198, 2000.

KSHIRSAGAR, P. R. *et al.* Kinetics and model building for recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Halomonas campisalis*. **Separation and Purification Technology**, v. 103, p. 151-160, 2013.

KULPREECHA, S. *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620-634, 2011.

KURDIKAR, D. L. *et al.* **Methods os PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents.** Patent 043063, COMPANY, M., 2000.

KUSAKA, S. *et al.* Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 140-143, 1997.

- KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potencial Utilization of Fusel Oil: A Kinetic Approach for Production of Fusel Oil Esters Through Chemical Reaction. **Turk J Chem**, v. 22, p. 289-300, 1998.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996.
- LEE, S. Y. *et al.* Removal of Endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2762-2764.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 9, p. 971-974, 1993.
- LEYVA, F. *et al.* Isoamyl propionate production by reactive distillation. **Separation and Purification Technology**, v. 146, p. 199-212, 2015.
- LING, Y. *et al.* Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, p. 9-15, 1997.
- LIU, L. *et al.* Treatment of industrial wastewater containing N,N-dimethylacetamide by internal microelectrolysis. **Chinese Journal of Environmental Engineering**, v. 02, 2010.
- LYNCH, D. W. *et al.* Inhalation toxicity of methyl n-amyl ketone (2-heptanone) in rats and monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 58, p. 341 - 352, 1981.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M. *et al.* Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 250-259, 2015.
- MANTELATTO, P. E. **Desenvolvimento de tecnologia para extração e recuperação de polihidroxicanoatos obtidos a partir da sacarose da cana de açúcar**. Tese. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2011
- MANTELATTO, P. E. *et al.* **Process for recovering polyhydroxyalkanoates ("PHAS") from cellular biomass**. SPECIFICATION, E. P. EP 1 687 436 B1 2004.
- MC CHALICHER, C. W. J.; SRIENE, F. Solubility and Degradation of Polyhydroxyalkanoate Biopolymers in Propylene Carbonate. **AIChE Journal**, v. 56, n. 6, p. 1616-1625, 2010.
- MCCHALICHER, C. W. J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate **AIChE Journal**, Volume 56, n. 6. AIChE Journal. 56: 1616-1625, 2010.
- MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of Poly-B-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 1, p. 60-71, 1964.
- MILANEZ, B. *et al.* **Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Urbanos**. (IPEA), I. D. P. E. A. Brasil: Governo Federal, 2012.

MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B. *et al.* Effect of feed composition of PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* DSMZ 1340. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 84, n. 1136-1139, 2009.

Nacional Institute of Standarts and Tecnology - NIST. Acesso em: 30 de novembro de 2016.

NARANJO, J. M. *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38-44, 2013.

NEUHAUS, F. C.; BADDILEY, J. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 686-723, 2003.

NEVES, A. L. P. **Uso de enzimas na extração de polihidroxicanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator***. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2009.

NKWACHUKWU, O. I. *et al.* Focus on potencial environmental issues on plastic world towards a sustainable plastic recycling in developing countries. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 4, n. 34, p. 2-13, 2013.

PARVEEZ, G. K. A. *et al.* Production of polyhydroxybutyrate in oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) mediated by microprojectile bombardment of PHB biosynthesis genes into embryogenic calli. **Front. Plant. Sci.**, v. 6, n. 598, p. 1-12, 2015.

PATIL, A. G.; BUTALA, H. B.; KOOLWAL, S. M. Fusel Oil: Composition, removal and potencial utilization. **International Sugar Journal**, v. 104, p. 51-58, 2002.

PEÑA, C. *et al.* Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 279-293, 2014.

POVOLO, S. *et al.* Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7902-7907, 2010.

PUBCHEM. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 26 de janeiro de 2017.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos**. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2015.

QUINES, L. K. M. *et al.* Extração de Poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com Carbonato de Propileno. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 214-220, 2015a.

_____. Métodos de extração de poli-hidroxicanoatos a partir de biomassa bacteriana. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1207-1218, 2015b.

RAMSAY, J. A. *et al.* Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 8, p. 589-594, 1994.

REATZ, C. R. H. *et al.* Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **The FASEB Journal**, v.5, n. 12, p. 2652-2660, 2017

CHRISTIAN R. H. RAETZ,* RICHARD J. ULEVITCH,T SAMUEL D. WRIGHT,1 CAROL H.

REDDY, C. S. K. *et al.* Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

RIEDEL, S. L. *et al.* Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) From *Ralstonia eutropha* Cultures With Non-Halogenated Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 461-470, 2013.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROSSBERG, M. *et al.* **Chlorinated Hydrocarbons**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2006.

SAHIN, F. Using sand particles for the disruption of cell wall of Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 7, n. 5, 2016.

SAHIN, F. *et al.* A New Method for the disruption of cell walls of Gram-positive Bacteria and Mycobacteria on the point of nucleic acid extraction. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 50, n. 1, p. 34-43, 2016.

SAMORI, C. *et al.* Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction os polyhydroxyalkanoates from microbial biomass. **Green Chemistry**, v. 17, p. 1047-1056, 2015.

SANTOS, R. R. *et al.* Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antras ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci**, v. 43, n. 2, p. 250-255, 2005.

SATHIYANARAYANAN, G. *et al.* Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. 0, p. 253-261, 2013.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Edição 10^o, 2012.

STEEN, A. **Functional characterisation and cell wall interactions of peptidoglycan**: University of Groningen, 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.

SUN, J.; FUJITA, S.-I.; ARAI, M. Development in the green synthesis of cyclic carbonate from carbon dioxide using ionic liquids. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 690, n. 15, p. 3490-3497, 2005.

SWOBODA, J. G. *et al.* **Wall teichoic acid function, biosynthesis and inhibition**. USA, p.35-45, 2010

TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 5, p. 1807-1814, 1998.

TIAN, H. *et al.* Optimization of coproduction of ethyl acetate and n-butyl acetate by reactive distillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 667-674, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed. 10^a, 2012.

VALAPPIL, S. P. *et al.* Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 1, p. 1-17, 2007a.

_____. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 3, p. 251-258, 2007b.

VAN HEE, P. *et al.* Relation between cell disruption conditions, cell debris particle size and inclusion body release. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, n. 1, p. 100-110, 2004.

VERMA, H. R.; SINGH, K. K.; MANKHAND, T. R. Comparative study of printed circuit board recycling by cracking of internal layers using organic solvents dimethylformamide and dimethylacetamide. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 1721-1727, 2017.

VILLANO, M. *et al.* Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 289-296, 2014.

VIZCAINO-CASTON, I. *et al.* Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 101-104, 2016.

WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3703-3706, 1997.

YAMANE, T.; FUKUNAGA, M.; LEE, Y. W. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 197-202, 1995.

YANG, Y.-H. *et al.* Application of a non-halogenated solvent, methyl ethyl ketone (MEK) for recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from bacterial cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 2, p. 291-297, 2015.

YOSHIDA, H. *et al.* In vitro release of Tacrolimus from Tacrolimus ointment and its speculated mechanism. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1–2, p. 55-64 2004.

ZHANG, Y. *et al.* Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. **Bioresource Technology**, v. 147, n. 0, p. 307-314, 2013.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n. 1, p. 5-21, 2001.

Anexo1

Solventes Orgânicos avaliados

Como se pretende avaliar a técnica de extração por solventes para a bactéria Gram-positiva, *B. megaterium*, são feitos breves relatos a respeito de toxicidade e obtenção dos solventes orgânicos avaliados na presente pesquisa. Essas informações irão fundamentar a discussão de resultados realizada durante a comparação do rendimento de recuperação do P(3HB) entre os solventes abaixo.

Clorofórmio

O tricloro etano, Figura A.1, comumente conhecido por clorofórmio, é um solvente orgânico halogenado bastante volátil e aplicado na produção de corantes e pesticidas, entre outras substâncias, além de utilizado em processos produtivos, por exemplo, da indústria de papel e celulose (Estévez e Vilanova, 2014).

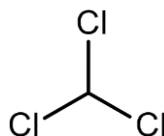


Figura A.1: Estrutura molecular do clorofórmio.

O clorofórmio pode ser produzido industrialmente pela reação de cloração do gás metano, sob aquecimento intenso, gerando como produto secundário ácido clorídrico e produtos intermediários, Figura A.2. A purificação pode ser realizada por destilação (Rossberg *et al.*, 2006).

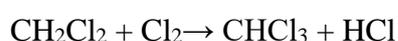
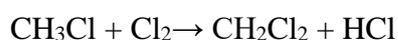
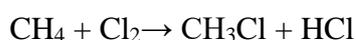


Figura A.2: Reação de síntese do clorofórmio.

O clorofórmio é facilmente absorvido pela pele causando vermelhidão e, quando inalado, provoca irritação em mucosas. No organismo pode atacar o fígado, causando doenças hepáticas (Ilett *et al.*, 1973; Flanagan e Pounder, 2010). É ainda citado na literatura como um possível produto químico cancerígeno (Cappelletti *et al.*, 2012).

Acetato de etila

O acetato de etila (AcEt) é um composto químico orgânico, pertencente ao grupo dos ésteres, com aplicações bastante diversas, sendo largamente utilizado na indústria de vernizes e tintas, bem como, um solvente satisfatório para diferentes princípios ativos de fármacos e alimentos (Kenig *et al.*, 2001). Sua estrutura é constituída por 4 carbonos organizados em uma cadeia linear heterogênea, como representado na Figura A.3.

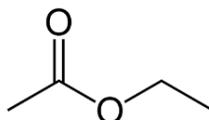


Figura A.3: Estrutura molecular do acetato de etila (AcEt).

Industrialmente, esse produto é obtido pela reação de esterificação entre ácido acético (HAc) e etanol (EtOH) (Tian *et al.*, 2015), podendo ser catalisada pela presença de um ácido (Kenig *et al.*, 2001), Figura A.4. Ambos os reagentes podem ser obtidos a partir de fontes renováveis, o que torna o uso desse produto interessante do ponto de vista ambiental.

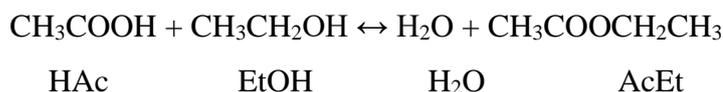


Figura A.4: Reação química de obtenção do acetato de etila (AcEt).

O AcEt apresenta características inflamáveis e, em caso uma exposição contínua, pode causar irritação aos olhos e à pele. No entanto, não há evidência de que seja uma substância cancerígena, mutagênica ou tóxica ao organismo humano (Estevan e Vilanova, 2014).

Metil etil cetona

A metil etil cetona (MEK), cuja estrutura é representada na Figura A.5, é um composto químico orgânico, pertencente ao grupo das cetonas, com aplicações diversas. Uma das suas aplicações mais importantes é na indústria de produção de tintas e resinas, na qual é aplicado como solvente, devido à sua rápida evaporação. Do ponto de vista toxicológico, foi verificado, pela análise da conversão metabólica de MEK no organismo de cobaias, que sugere que essa substância é neurotóxica podendo ocasionar doenças neurológicas, no caso de longos períodos de exposição (Divincenzo *et al.*, 1976).

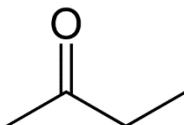
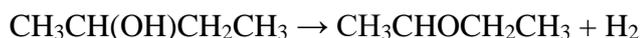


Figura A.5: Estrutura molecular do metil etil cetona (MEK).

Industrialmente, a principal rota de síntese de MEK é via oxidação de 2-butanol utilizando como catalisador cobre, zinco ou bronze, segundo reação química apresentada na Figura A.6 (Hoell *et al.*, 2009).



2-butanol

MEK

Figura A.6: Reação de obtenção de metil etil cetona (MEK).

Dimetil carbonato

O dimetil carbonato (DMC), Figura A.7, é um composto químico orgânico, pertencente ao grupo dos ésteres, utilizado, como matéria-prima, principalmente na indústria de adesivos e tintas. A imuno toxicidade desse solvente foi avaliado por meio da exposição cutânea de ratos durante 28 dias, sendo possível se comprovar que a exposição acarreta em redução da imunidade das cobaias, tendo potencialidade para causar o mesmo efeito em seres humanos. (Anderson *et al.*, 2013).

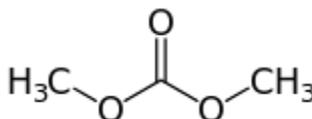
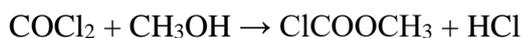
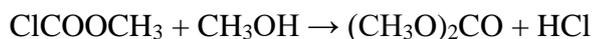


Figura A.7: Estrutura molecular do dimetil carbonato (DMC).

A produção de DMC convencional é considerada um processo bastante agressivo ao meio ambiente, pois faz uso de fosgênio, reagente extremamente corrosivo e tóxico, sendo mortal mesmo em pequenas quantidades, Figura A.8 (Conim, 2010).



Fosgênio Metanol



Metanol

DMC

Figura A.8: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC).

Por isso, foram desenvolvidas outras duas rotas de síntese desse reagente, atualmente já aplicadas em escala industrial. Uma delas tem como base a oxi-carbonilação do metanol promovido em fase líquida, catalisada por cloreto de cobre, Figura A.9. A outra rota alternativa prevê a reação em fase gasosa via reação do metanol com metil nitrato (MN) catalisada por paládio, conforme reação química mostrada na Figura A.10 (Delledonne *et al.*, 2001).

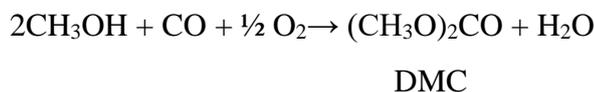


Figura A.9: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC) a partir de metanol.

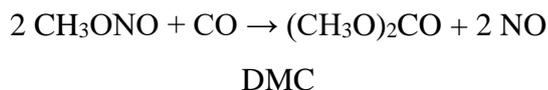
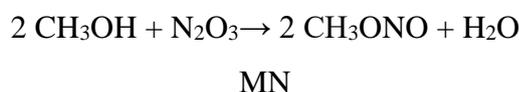
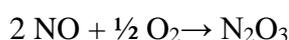


Figura A.10: Reação química de obtenção de dimetil carbonato (DMC) a partir de metanol e metil nitrato (MN).

Propionato de isoamila

O 3-metil-butil propanoato, Figura A.11, também conhecido por propionato de isoamila (PIso), é um ingrediente comumente utilizado na indústria de alimentos, importante especialmente em formulações de saborizantes de abacaxi ou damasco. Além de ser aplicado com plastificante em alguns solventes industriais. Por isso, trata-se de um produto químico de alto valor comercial. (Leyva *et al.*, 2015).

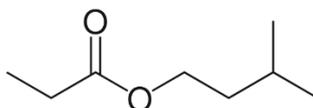


Figura A.11: Fórmula estrutural do propionato de isoamila (PIso).

Sua síntese pode ser promovida a partir da reação de esterificação entre o álcool isoamílico e ácido propanoico, na presença de ácido forte e sob aquecimento, Figura A.12. Como forma de se utilizar um subproduto da indústria alcooleira, tem sido estudada a viabilidade de se utilizar o óleo fúsel, rico álcool amílico, propílico e butílico, como matéria-prima desse processo. (Küçük e Ceylan, 1998; Patil *et al.*, 2002).

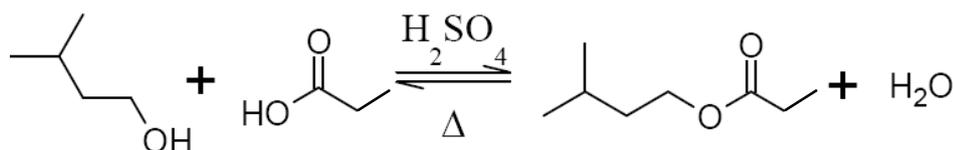


Figura A.12: Reação de síntese de propionato de isoamila (PIso).

Outro mecanismo possível de síntese do PIso é a catálise enzimática por lipases que apresenta vantagem no produto obtido, pois este pode ser classificado como natural ao do obtido pela rota anterior, classificado como artificial. O apelo por produtos naturais tem sido cada vez mais valorizado no mercado consumidor (Hari Krishna e Karanth, 2002).

Dimetilsulfóxido

Dimetilsulfóxido (DMSO), Figura A.13, é um solvente bastante polar e aprótico, que devido sua baixa toxicidade, alta taxa de absorção pela pele e efeitos anti-inflamatórios é largamente utilizado na área da saúde. Este solvente orgânico tem cheiro característico de alho, o que pode ser indesejado em algumas aplicações industriais (Kligman M., 1965). Trata-se de um subproduto da indústria de papel e celulose, observado pela primeira vez durante pesquisas que culminaram na conversão de sulfetos, compostos altamente tóxicos, em sulfóxidos em meados do século 19 (Capriotti e Capriotti, 2012).

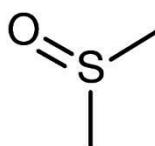


Figura A.13: Fórmula estrutural do dimetilsulfóxido (DMSO).

Destaca-se a alta permeabilidade do DMSO em tecidos animais, tendo sido estudada sua aplicação nas áreas veterinária e médica. Em veterinária foi estudado como crioprotetor de folículos ovinos isolados (Santos *et al.*, 2005). Na área médica foi avaliado como agente capaz de reduzir a necrose residual em retalhos de pele implantados em ratos, o que indica provável efeito anti-inflamatório dessa substância (Duarte *et al.*, 1998). Caracteriza-se por ser um reagente químico de baixa toxicidade a seres humanos, raramente causando efeitos colaterais e irritação da pele, o que torna sua aplicação bastante promissora para aplicações dermatológicas (Capriotti e Capriotti, 2012).

Carbonato de propileno

Carbonato de propileno (CP), cuja fórmula é mostrada na Figura A.14, é uma substância polar, de baixa volatilidade, sem odor característico, não corrosivo, não-tóxico e biodegradável, usualmente aplicado na indústria farmacêutica (Karunasekara e Poole, 2011; Grizic *et al.*, 2016). Pesquisas já publicadas fazem uso do CP, por exemplo, na produção de pomadas (Yoshida *et al.*, 2004) e de cápsulas de gelatina para remédios (Dahl e Burke, 1990).

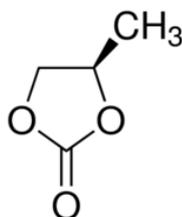


Figura A.14: Fórmula estrutural do carbonato de propileno (CP).

A síntese de carbonatos cíclicos é possível por três metodologias distintas: (i) reação catalítica de CO_2 e epóxidos; (ii) reação eletroquímica entre CO_2 e epóxidos; e (iii) carboxilação oxidativa de olefinas (Sun *et al.*, 2005). O primeiro método foi estudado por Comin (2010), sendo o mecanismo de formação de CP por emprego de catalisador a base de zinco apresentado na Figura A.15. A zeólita utilizada nessa pesquisa foi produzida empregando-se líquidos iônicos, líquidos de baixo impacto ambiental, como agentes direcionadores de crescimento da estrutura, dispensando o uso de solventes orgânicos no processo. Atingiu-se conversões superiores a 99% para geração de carbonatos cíclicos.

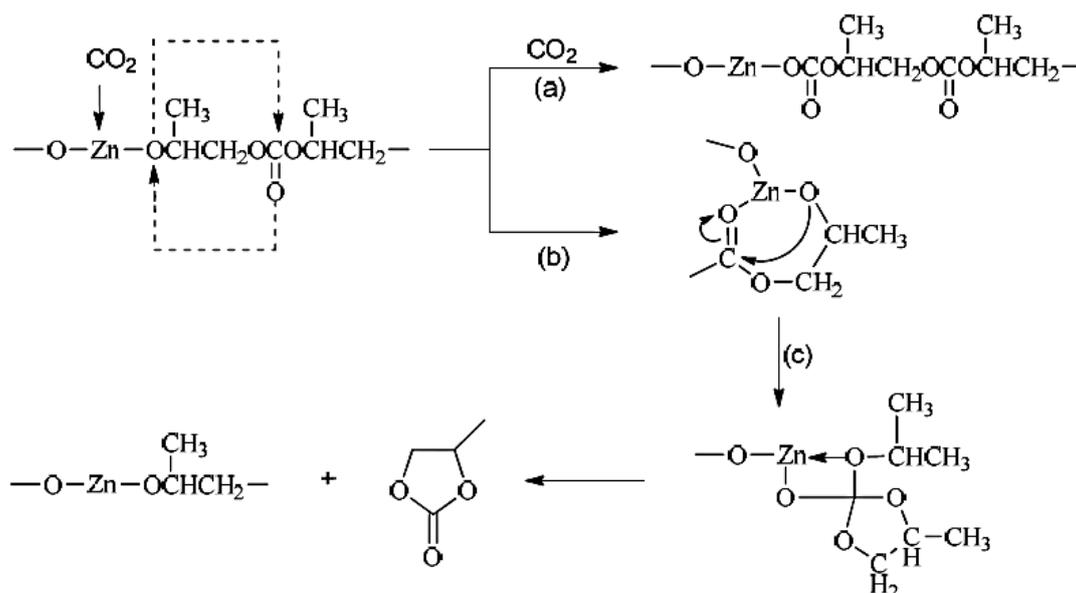


Figura A.15: Mecanismo de formação do carbonato de propileno através do emprego de catalisadores a base de zinco (Comin, 2010).

2-heptanona

A 2-heptanona (2-Hp), Figura A.16, também conhecida como metil amil cetona, é um composto químico encontrado naturalmente no leite pasteurizado, sendo inclusive, um dos parâmetros de comparação de tratamentos térmicos do leite, pois deriva da modificação de composto gerados na glândula mamária por ação da temperatura (Avalli *et al.*, 2004). Industrialmente, a 2-Hp é bastante utilizada como solvente de lacas a base de nitrocelulose (Cheremisinoff, 2003).

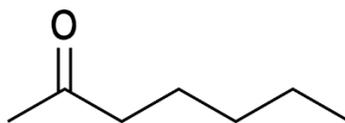


Figura A.16: Fórmula Estrutural de 2-heptanona.

Em estudos toxicológicos executados com ratos e macacos, durante e após 10 meses de exposição de cobaias sujeitas a inalação de até 1025 ppm de 2-Hp por 6 h diárias por 5 dias por semana, não foi possível identificar diferença estatística significativa na incidência de doenças pulmonares, cardiológicas ou hepáticas relativas entre o grupo de indivíduos sujeito a exposição e ao grupo de indivíduos controle (Lynch *et al.*, 1981). Assim como não é catalogado na literatura efeito neurológico para inalação crônica desse solvente, exposição de ratos e macacos por 9 meses a 1000 ppm diários, 5 dias por semana (Johnson *et al.*, 1979).

Uma rota possível de síntese de 2-Hpé feita pela quebra de alcenos, numa reação conhecida por ozólise. Esse método consiste no borbulhamento de ozônio em uma solução resfriada contendo CH_2Cl_2 , sulfeto de dimetila e alceno, conforme reação apresentada na Figura A.17 (Solomons, T.W. Graham e Fryhle, Craig B., 2012).

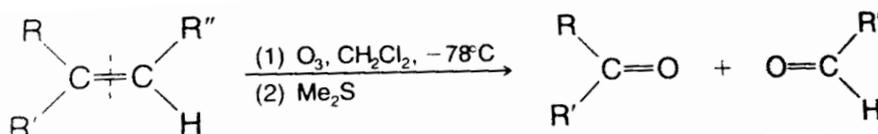


Figura A.17: Reação de ozólise de alcenos para produção de 2-heptanona (2-Hp) (Solomons, T.W. Graham e Fryhle, Craig B., 2012).

Ainda é possível a produção de 2-Hp por esporos de *Penicillium roquefortii* utilizando como substrato o ácido etanoico e operando o sistema em regime de semi-batelada (Creuly *et al.*, 1990).

N,N-dimetil acetamida

N,N-Dimetilacetamida (NNDA) é um solvente polar, miscível com a água, aplicado na produção de uma grande gama de produtos, como fármacos, agroquímicos, tintas, vernizes, entre outros (Liu *et al.*, 2010), Figura A.18. Sua ampla utilização se relaciona à sua capacidade de solubilizar diversas substâncias, inclusive poliméricas (Verma *et al.*, 2017).

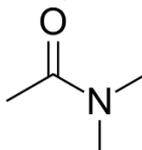


Figura A.18: Estrutura molecular do N,N-dimetilacetamida (NNDA).

Trata-se de uma substância facilmente absorvida pelo organismo humano, por ingestão, inalação ou contato com a pele, podendo causar doenças hepáticas. (Liu *et al.*, 2010; Ghazali e Inayat-Hussain, 2014).

A degradabilidade do NNDA, quando liberado no meio ambiente, é bastante lenta por vias naturais, por isso, diversos estudos apresentam técnicas possíveis de tratamentos de efluentes contendo essa substância. A bactéria *Rhodococcus* sp. cepa B83 foi capaz de metabolizar NNDA transformando-a em acetatos e nitratos, compostos de baixa toxicidade (Chen *et al.*, 2015). Destaca-se, ainda, o método de microeletrólise estudado por Liu *et al.* (2010), que foi capaz de atingir remoção de NNDA do efluente superior a 95%.

Anidridos de ácido reagem com amônia e aminas primárias e secundárias dando origem a amidas, como o NNDA, como mostrado na Figura A.19 (Solomons, T.W. Graham e Fryhle, Craig B., 2012).

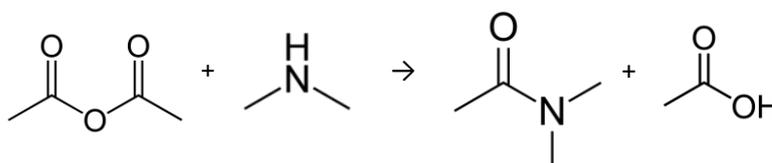


Figura A.19: Reação de obtenção de N,N-dimetilacetamida (NNDA).

A NNDA pode ser obtida, em processo contínuo, através da reação entre acetato de metila e dimetilamina na presença de um catalisador básico com contínua remoção, por aquecimento, de produtos de baixo ponto de ebulição. Utilizando a configuração proposta na patente industrial, foi possível obter NNDA com pureza superior a 99,7% (Grafmans *et al.*, 2012).