



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Comparação de diferentes metodologias para purificação de PHA: uma revisão bibliográfica

Autor: Ethiane Poerschke Bissacot

Orientador: Prof^a. Dr. Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre, janeiro de 18

Sumário

Sumário	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Conceitos Chave	3
2.1 Biopolímeros e biodegradação	3
2.2 Polihidroxialcanoatos	4
2.3 Microrganismos produtores de PHA	6
2.4 Métodos de recuperação do PHA	7
2.4.1. Métodos mecânicos de recuperação	8
2.4.2. Métodos químicos de recuperação	9
2.4.3. Métodos de recuperação biológicos	10
2.4.4. Outros métodos de recuperação	10
3 Formulação do problema e Metodologia	11
4 Revisão Bibliográfica - Aplicação dos métodos de recuperação de Polihidroxialcanoatos	13
4.1. Métodos Químicos	13
4.2. Métodos Biológicos	21
4.3. Métodos Mecânicos	26
4.4. Outros Métodos	28
5 Inferências quanto ao uso potencial dos métodos	30
5.1 Recuperação e pureza do biopolímero	31
5.2 Preservação das propriedades do polímero	32

5.3	Custo de produção	32
5.4	Utilização de compostos tóxicos	33
5.5	Tempo de processamento e obtenção do produto final	34
6	Conclusões e Trabalhos futuros	36
7	Referências	38
8	Apêndice I - Resumo das características, vantagens e desvantagens dos métodos de tratamento abordados na revisão bibliográfica	42
9	Apêndice II - Vantagens e desvantagens gerais dos métodos de tratamento abordados na revisão bibliográfica	44

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares que tanto me apoiaram e me tranquilizaram. Que ao longo destes anos de muito estudo e dedicação tiveram muita paciência comigo, meu estresse e suportaram a minha ausência. Sou muito grata por todo amor e carinho, e pela amizade de todos vocês.

Obrigada mana por ser a mulher mais forte que já conheci, por ser meu porto seguro, por me apoiar, por ser além de mãe, minha grande amiga. Para ti e minhas duas dindas dedico esta conquista, pois vocês merecem todo orgulho e felicidade que eu puder oferecer. Vocês são meus modelos de mulheres guerreiras, e sou muito grata por tudo que fizeram e fazem por mim, principalmente por serem as melhores fontes de inspiração que eu poderia sonhar.

À minha avó Geni, que foi o presente mais lindo que a vida me deu: tu és a minha luz e meu amor por ti não tem limites. Obrigada por todos os ensinamentos.

Ao meu pai que infelizmente não pode acompanhar minha jornada desde o vestibular até a graduação, nem da minha transição para a vida adulta: eu te dedico toda a minha vida e continuarei te amando para sempre.

Um agradecimento muito especial para a minha orientadora Débora, cuja paciência e apoio desde o início deste projeto até correções em pleno recesso de final de ano foram imprescindíveis para este trabalho. Muito obrigada por estar comigo nesta jornada, pela dedicação, pelas explicações e conselhos. Muito obrigada por também ter sido uma professora que marcou tanto a minha trajetória nesta universidade.

"Que nada nos limite.

Que nada nos defina.

Que nada nos sujeite.

Que a liberdade seja a nossa própria substância."

Simone de Beauvoir

Resumo

Biopolímeros, que são polímeros biodegradáveis e/ou de origem renovável, assim como os polihidroxicanoatos (PHA), são alternativas sustentáveis para competir com plásticos derivados de fonte fóssil. Esta é a principal motivação para diversos pesquisadores estudarem a produção deste polímero biodegradável. Entretanto, a produção de PHA com um bom custo-benefício para a aplicação industrial é o fator limitante para inserir este material no mercado e requer o estudo e desenvolvimento de métodos de recuperação com alta eficiência e que não gerem impactos ambientais. O presente trabalho visa reunir estudos em que metodologias de recuperação de PHA foram testadas. Para encontrar o método de maior potencial para a possibilidade de aplicação em escala industrial, foram estudados diversos métodos e a partir deste estudo foi proposta uma metodologia de classificação para os tratamentos considerados viáveis para tal aplicação, comparando-os através de critérios (I) recuperação e pureza do biopolímero; (II) preservação das propriedades do biopolímero; (III) custo de produção; (IV) utilização de compostos tóxicos; (V) tempo de processamento e obtenção do produto final. Em todos os artigos selecionados, observou-se que métodos químicos estão presentes em pelo menos uma etapa deste processo obtenção de PHA. Conclui-se que, entre as metodologias avaliadas, os métodos químicos utilizando agentes solventes ou digestores não tóxicos são os mais vantajosos. Além destes, destacaram-se os métodos biológicos por também serem tratamentos com menores impactos ambientais. Entretanto, para a recuperação biológica alcançar percentuais mais elevados no processo, seria necessário combiná-los com outros métodos (mecânicos ou químicos). Utilizando-os de forma combinada facilitaria o processo de rompimento celular e na de recuperação polimérica, obtendo assim elevadas taxas de recuperação e pureza.

Palavras-chave: polihidroxicanoatos, poli(3-hidroxi-butirato), recuperação, extração, purificação, digestão enzimática, digestão química, métodos mecânicos, biopolímero, biodegradável.

Lista de Figuras

Figura 1 – Classificação dos polímeros de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade (Adaptado de SHEN et al., 2009).....	4
Figura 2 - Estrutura química geral dos PHAs (Adaptado de LEE; CHANG, 1995).	5
Figura 3 – Grânulos de PHA acumulado sob microscópio eletrônico de transmissão (YU, J.; SHANG-TIAN, 2007).	7
Figura 4 – Resumo esquemático de métodos de recuperação. Adaptado de Pacheco (2014).	8
Figura 5 – Fluxograma esquemático das etapas utilizadas em cada experimento (Adaptado de NOR et al., 2013).....	15
Figura 6 - Representação das metodologias de pré-tratamentos e tratamentos para a extração de PHB empregadas nos artigos selecionados (elaboração própria).....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparativo de recuperação, pureza e massa molar dos polímeros extraídos por com diferentes solventes. (Adaptado de ROSENGART et al., 2015).	14
Tabela 2 – Comparativo de recuperação de PHA por diferentes métodos de extração (Adaptado de KSHIRSAGAR et al., 2013).	17
Tabela 3 – Comparação da recuperação de PHA através de dois métodos de digestão química: solução de NaClO e solução de NaOH (Adaptado de VILLANO et al., 2014).....	18
Tabela 4 - Características físicas do PHB obtidas por extração via solvente com clorofórmio e com carbonato de 1,2-propileno (Adaptado de FIORESE et al., 2009).	20
Tabela 5 – Experimentos com adição simultânea de Tripsina e Bromelina. (Adaptado de KAPRITCHKOFF et al., 2006).	23
Tabela 6 – Comparação do grau de pureza entre diferentes métodos de extração pelos experimentos de Kunasandari (Adaptado de KUNASUNDARI et al., 2017).	26
Tabela 7 - Efeito de etapas de recuperação e purificação na remoção de proteína solúvel e pureza de PHA (Adaptado de MOHAMMADI et al., 2012).....	29
Tabela 8 –Valores de massas molares de PHA recuperados MOHAMMADI et al., 2012). 29	
Tabela 9 – Classificação dos métodos de extração abordados na revisão bibliográfica de acordo com os parâmetros definidos (elaboração própria).	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

PHAs	Polihidroxicanoatos
P(3HB)	Poli(3-hidroxicbutirato)
LPS	Lipossacarídeos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDBS	Dodecil benzeno sulfonato de sódio
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DMS	Dimetilsulfureto
DES	Succinato de dietila
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
AR	Absorbância Relativa

1 Introdução

Os materiais poliméricos são indispensáveis para a vida dos seres humanos, e a cada dia ganham mais espaço e novas aplicações, substituindo outros materiais. Entretanto, o crescente acúmulo de materiais plásticos na natureza tem recebido atenção mundial e por isso têm motivado estudos para buscar uma solução ecologicamente sustentável e ao mesmo tempo competitiva para reciclar e/ou remover esses materiais do meio ambiente. Sendo assim, produzir materiais biodegradáveis e utilizando matérias-primas renováveis, através de processos que não são agressivos ao meio ambiente é a melhor alternativa para competir com os plásticos petroquímicos.

Uma família importante de biopolímeros biodegradáveis são os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres produzidos por uma grande variedade de microrganismos em corpos de inclusão dentro da célula para reserva de energia. Contudo, o custo de produção desses materiais é bem alto, sendo difícil competir no mercado de plásticos.

Em termos gerais, o processo para a obtenção de PHAs envolve o preparo do meio de cultivo e do inóculo (suspensão contendo microrganismos de interesse), o cultivo em biorreator e a separação dos produtos. Uma vez que a síntese e o armazenamento deste biopolímero ocorrem no interior das células, a etapa de separação do polímero da célula é peça fundamental deste processo (JACQUEL et al., 2008; LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2015). Esta etapa de remoção do interior da célula é um fator importante para a viabilidade econômica do processo, podendo contribuir com metade do custo de todo este processo. De maneira geral o processo de separação pode ser dividido em três partes: um pré-tratamento, a recuperação de dentro da célula e a purificação do produto final. Os principais métodos de recuperação de PHAs utilizados são dos tipos mecânicos, químicos e biológicos. Na escolha do método é de fundamental importância manter as propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas do produto além de uma técnica que possua um alto rendimento para tornar viável a produção.

Este trabalho almeja reunir pesquisas em que metodologias de recuperação de PHA foram testadas, de modo a discutir e comparar as tecnologias abordadas. É proposta uma metodologia de classificação dos métodos, comparando-os através de critérios pré-estabelecidos e apontando a tecnologia com melhor potencial para aplicação em escala industrial. Dentre os critérios escolhidos os principais foram: (I) altos percentuais de recuperação e pureza do produto final; (II) manter as propriedades do biopolímero e (III)

custo de produção. A discussão crítica para a viabilidade do método para a aplicação industrial não considerou todos os estudos abordados neste trabalho, porém um estudo mais abrangente é importante para poder visualizar com maior clareza a problemática de produção dos polihidroxialcanoatos.

2 Conceitos Chave

Neste capítulo serão apresentados conceitos importantes para a compreensão das técnicas existentes para a extração e purificação de PHA, de modo a viabilizar a comparação dos métodos existentes.

2.1 Biopolímeros e biodegradação

Os materiais poliméricos foram ganhando espaço no cotidiano das pessoas, substituindo materiais, como vidro, papel e metais. A grande variedade de aplicações dos plásticos, o custo relativamente baixo e a filosofia de consumo excessivo no mundo, contribuem para que eles estejam presentes em grandes quantidades nos lixos urbanos. Com o impacto ambiental que estes materiais causam devido ao seu descarte incorreto, uma alternativa promissora é a substituição dos polímeros derivados de petróleo (fonte não renovável) por materiais poliméricos sustentáveis, ou seja, de fonte renováveis e biodegradáveis.

Segundo a instituição *European Bioplastics*, um bioplástico é um polímero biodegradável, ou um polímero produzido a partir de uma matéria-prima renovável, ou ambos. Os biopolímeros biodegradáveis são aqueles que podem ser degradados pela ação de microrganismos como bactérias, fungos e algas. Eles podem ser provenientes de fontes fósseis ou de fontes renováveis. Na Figura 1 estão apresentados exemplos de polímeros classificados de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade (European Bioplastics, disponível em: http://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf).

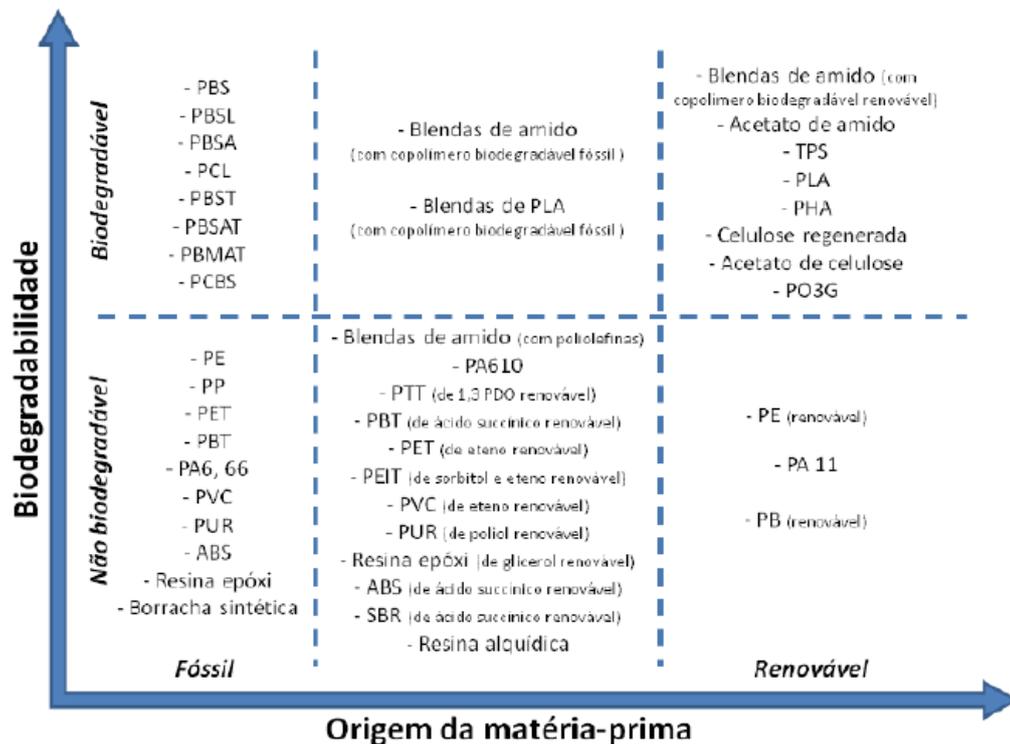


Figura 1 – Classificação dos polímeros de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade (Adaptado de SHEN et al., 2009).

Dentre os biopolímeros destacados na Figura 1, classificados por sua origem e sua capacidade de biodegradabilidade, podemos destacar os Polihidroxialcanoatos (PHAs) que são poliésteres biodegradáveis sintetizados por microrganismos a partir de fontes renováveis.

2.2 Polihidroxialcanoatos

Os Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos por uma grande variedade de microrganismos em corpos de inclusão dentro da célula para reserva de energia. Os tipos de monômeros, polímeros e copolímeros produzidos dependem da fonte de carbono e do microrganismo utilizado. Na Figura 2 está esquematizada a estrutura química geral dos Polihidroxialcanoatos, com alguns exemplos destes poliésteres. Os PHAs assemelham-se em algumas características com alguns polímeros comerciais, como o polietileno e o polipropileno. Além disso, o tempo para a sua degradação é muito menor quando comparado com os materiais de origem petroquímica. Sendo assim, estes polímeros têm grande gama de aplicações, como por exemplo, embalagens, produtos descartáveis e sacolas plásticas (ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2017; FACCIN, 2012; PACHECO, 2014).

Algumas aplicações, com alto valor agregado, se estendem para a área médica, farmacêutica e biotecnológica. Isto se deve à composição dos PHAs (diversidade de tipos e propriedades físicas) e à biocompatibilidade, principalmente pela sua não toxicidade. Nestes campos são exemplos de aplicações suturas, próteses, placas de osso, válvulas cardíacas, telas cirúrgicas, microcápsulas para a liberação controlada de fármacos para o uso humano, além de outros dispositivos terapêuticos (ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2017).

Na comparação dos polihidroxicanoatos com os plásticos convencionais de propriedades semelhantes a maior problemática se dá no elevado custo de produção. Este custo está relacionado com diversos fatores como a seleção da fonte de carbono para o microrganismo, bem como o processo de separação e recuperação do polímero de dentro célula. Na análise de recuperação deve-se levar em conta o rendimento e duração do processo, além da pureza do produto final. O método de separação ideal deve manter as propriedades do polímero e possibilitar a recuperação com baixos custos e alto grau de pureza. Alguns estudos indicam que 50 % do custo está relacionado com as etapas de recuperação e purificação do polímero. Em escala industrial, o uso de solventes halogenados é o método mais comum para a extração de PHA. No entanto pode apresentar riscos ambientais. Entre os processos alternativos de recuperação que foram propostos, a digestão das células com produtos químicos ou com enzimas receberam destaque pela simplicidade e menores riscos ambientais (LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2015).

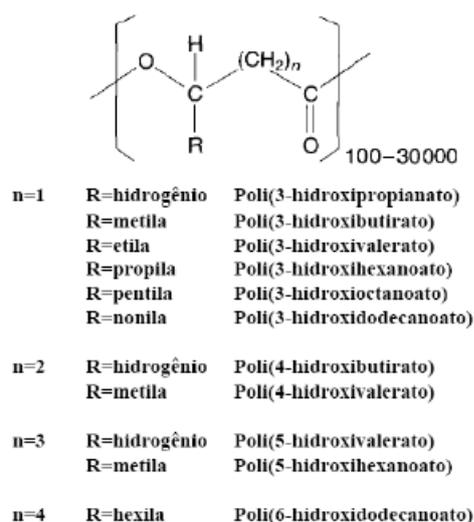


Figura 2 - Estrutura química geral dos PHAs (Adaptado de LEE; CHANG, 1995).

Dentro da família de compósitos de PHA, o principal polímero é o polihidroxi butirato (PHB), também chamado de poli(β -hidroxi butirato), poli(3-hidroxi butirato) ou P(3HB)

(Figura 2, n=1 R = metila). O polímero encontra-se dentro das células bacterianas em forma de grânulos, podendo atingir até 90 % de sua massa em base seca (BRITO et al., 2011).

2.3 Microrganismos produtores de PHA

Existem diversas bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, com capacidade de sintetizar PHAs, já foram identificadas mais de 100 diferentes espécies produtoras (REDDY et al., 2003).

A maior parte das bactérias utilizadas atualmente na síntese de PHA são as Gram-negativas, tais como *Azohydromonas australica*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator H16*, *Azohydromonas lata* e *Burkholderia* sp. USM. Estas bactérias são capazes de produzir em média entre 50 % e 88 % de PHB e por sua alta capacidade são empregadas em escala industrial (TAN et al., 2014). Embora o grupo das Gram-negativas tenha um alto grau de síntese, sua estrutura celular possui além da membrana citoplasmática, do periplasma e da parede celular composta por peptidoglicano, uma membrana externa rica em liposacarídeos (LPS). O LPS da membrana externa pode conter um antígeno que provoca uma resposta imunológica no organismo, o que torna o polímero extraído inadequado para aplicações biomédicas sem uma purificação adequada. É possível fazer a remoção desta endotoxina, utilizando técnicas como extrações com solventes, podendo ainda combinar com a purificação com carvão ativado, ou então tratar com agentes oxidantes (ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, etc). Esta etapa implica em um aumento no custo total de produção, além de ter potencial de alterar as propriedades do PHA obtido, como por exemplo a redução na massa molar (TAN et al., 2014). Na Figura 3 é apresentada a micrografia de células de *Ralstonia eutropha*, bactéria reclassificada como *Cupriavidus necator*, contendo grânulos de PHA acumulados em corpos de inclusão.



Figura 3 – Grânulos de PHA acumulado sob microscópio eletrônico de transmissão (YU, J.; SHANG-TIAN, 2007).

No grupo das Gram-positivas foram relatados diversos gêneros de bactérias produtoras, tais como *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*. Este grupo quando comparado com as Gram-negativas geralmente acumula quantidades menores de PHA, porém são mais vantajosas para aplicações biomédicas por não apresentarem a membrana contendo LPS. Em contra partida, a espessura da camada de peptidoglicano nas Gram-positivas é de 10 a 20 vezes mais espessa que das Gram-negativas (BOS; TOMMASSEN, 2004; PACHECO, 2014; TAN et al., 2014).

2.4 Métodos de recuperação do PHA

Em termos gerais, o processo de obtenção de PHAs envolve o preparo do meio de cultivo e do inóculo, o cultivo em biorreator e a separação dos produtos. Uma vez que a síntese e o armazenamento deste biopolímero ocorrem no interior das células, a etapa de separação do polímero da célula é fundamental. Na escolha do método é de fundamental importância manter as propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas do produto além de uma técnica que possua um alto rendimento para tornar viável a produção.

Diversas estratégias para separação deste polímero da célula estão sendo estudadas. De maneira geral o processo de separação pode ser dividido em três partes: um pré-tratamento, a recuperação de dentro da célula e a purificação do produto final.

Os pré-tratamentos envolvem mecanismos de aquecimento, congelamento, imersão em solução alcalina ou solução salina. Estes processos visam enfraquecer a parede celular a fim de facilitar o processo de ruptura celular na etapa de extração (JACQUEL et al., 2008).

A etapa de recuperação do biopolímero que pode ser realizada com a utilização de métodos químicos, biológicos e físicos ou com a utilização de métodos combinados como físico e químico, biológico e químico, entre outros. Na Figura 4 é apresentado um esquema envolvendo os principais métodos encontrados na literatura.

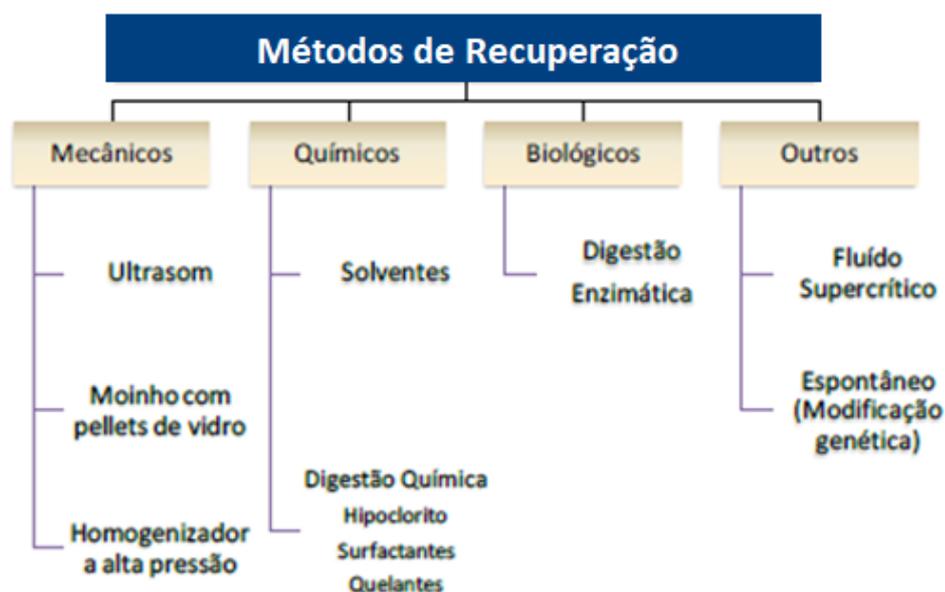


Figura 4 – Resumo esquemático de métodos de recuperação. Adaptado de Pacheco (2014).

Conforme apresentado na Figura 4, os métodos de recuperação são separados por tipos e pelo princípio de ação para a obtenção do biopolímero. Esses métodos podem ser combinados para aumentar o rendimento e a pureza.

Os métodos de purificação envolvem tratamentos com peróxido de hidrogênio combinado com agentes quelantes ou ação de enzimas e tratamento com ozônio (JACQUEL et al., 2008; PACHECO, 2014).

2.4.1. Métodos mecânicos de recuperação

Os métodos mecânicos de recuperação são muito utilizados, sendo que o moinho de pellets de vidro e a homogeneização por alta pressão dominam a ruptura celular em escala industrial. Estas técnicas causam pouco ou nenhum dano ao produto e ao meio ambiente, tendo isso como maior vantagem. As desvantagens dos métodos mecânicos geralmente estão associadas ao alto custo de investimento e ao longo tempo de processamento e por nem sempre conseguem um alto rendimento e são utilizados combinados com outros métodos (JACQUEL et al., 2008; KOSSEVA; RUSBANDI, 2017; PACHECO, 2014).

O moinho de esferas/pellets de vidro tem como princípios de ação a agitação, o impacto e o atrito da parede celular com as esferas. No homogeneizador de alta pressão existe uma passagem forçada das células por um orifício pequeno, onde há uma grande diferença de pressão, causando assim o rompimento da parede celular.

Geralmente estas técnicas são utilizadas combinadas com tratamentos químicos (uso de surfactantes ou solventes), ou seja, o método mecânico acaba sendo um tratamento que antecede um método químico (KOSSEVA; RUSBANDI, 2017).

2.4.2. Métodos químicos de recuperação

Dentro dos métodos químicos encontram-se duas abordagens que dependerão do tipo de substância química utilizada. Pode-se classificar estas substâncias como:

- Agentes solventes: substâncias que solubilizam o PHB;
- Agentes digestores: substâncias que solubilizam o material não-PHB, ou seja, a biomassa residual, ou que solubilizam a parede celular do microrganismo.

Um dos métodos mais empregados para a recuperação de PHA é por extração com solvente. Vários foram os compostos estudados e testados ao longo dos anos, como por exemplo, solventes contendo hidrocarbonetos clorados tais como clorofórmio, 1,2-dicloroetano, cloreto de metileno. Também alguns carbonatos cíclicos, como carbonato de propileno e carbonatos de etileno. Também foram testadas algumas misturas de solventes, como clorofórmio e metanol ou diclorometano e etanol. Cabe mencionar que após a remoção da fase contendo solvente e PHA solubilizado é necessária uma etapa para separar o polímero. Essa separação pode ser obtida via evaporação do solvente ou por precipitação em um não-solvente, como por exemplo, água (JACQUEL et al., 2008).

Outro método que merece destaque é a digestão química que tem como princípio digerir parede celular, carboidratos, proteínas, lipídeos e enzimas da célula. Alguns agentes são: tensoativos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), hipoclorito de sódio (podendo ser combinado com clorofórmio), hipoclorito surfactante, dissolução seletiva por prótons, dentre outros.

2.4.3. Métodos de recuperação biológicos

A digestão enzimática utiliza enzimas para degradar a membrana celular e assim liberar o polímero para o meio externo. São exemplos de enzimas utilizadas a lisozima, a fosfolipase, a proteinase, a bromelina, a papaína e a tripsina (JACQUEL et al., 2008; KAPRITCHKOFF et al., 2006).

Algumas variedades de enzimas proteolíticas têm altas atividades em dissoluções de proteínas e efeitos na degradação de PHB. A digestão enzimática pode ser complementada por outros métodos de extração (JACQUEL et al., 2008; KAPRITCHKOFF et al., 2006; POSADA et al., 2011).

2.4.4. Outros métodos de recuperação

Existem ainda outros métodos para separar o biopolímero da biomassa residual, como a extração por fluidos supercríticos e a liberação espontânea por modificação genética. O método de extração com fluidos supercríticos tem como vantagem o fluido nesta condição apresentar propriedades físico-químicas únicas, como altas densidades e baixas viscosidades que os tornam adequados como solventes de extração, sendo o fluido mais utilizado o CO₂. Este método de extração também pode ser combinado com pré-tratamentos de NaOH ou sal (NaCl) para obter maiores níveis de ruptura (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; JACQUEL et al., 2008; KHOSRAVI-DARANI et al., 2004; POSADA et al., 2011).

Além destes, outros métodos de recuperação utilizam o ar, tais como: classificação do ar e flotação de ar dissolvido, porém estes são geralmente utilizados como uma etapa que antecede um método químico ou biológico (JACQUEL et al., 2008).

Existe ainda um método de fragilidade celular utiliza modificações genéticas entre espécies para apresentar esta característica de rompimento espontâneo após as células acumularem grandes quantidades de PHB. São exemplos destas bactérias: *Escherichia coli* e *Azotobacter vinelandii*. Um dos genes utilizados nesta modificação é citado por Jacquell (2008) e recebe o nome de *Alcaligenes phbCAB* (JACQUEL et al., 2008; POSADA et al., 2011).

3 Formulação do problema e Metodologia

O presente estudo teve por objetivo reunir trabalhos que recuperaram PHA por diferentes métodos de separação e purificação, comparando-os através de parâmetros definidos e apontando a tecnologia com melhor potencial de aplicação em escala industrial, considerando diferentes pontos importantes. Como artigo base para iniciar a busca por artigos que tiveram como foco os métodos de recuperação e purificação, foi utilizado o artigo de revisão do autor Jacquelin et al. (2008). Diversos estudos têm como objetivo encontrar um método que preserve às características do polímero, possibilite altos rendimentos, baixo custo e de consciência ambiental sustentável.

Deste modo, de acordo com Jacquelin et al. (2008) e López-Abelarias et al. (2015), o método ideal precisaria garantir algumas características, que foram usadas como parâmetros no presente estudo:

- I. Obter altos níveis de pureza e grande taxa recuperação;
- II. Manter as propriedades do polímero (em especial a massa molar);
- III. Garantir baixos custos de produção.

A principal propriedade monitorada nos experimentos foi a massa molar do biopolímero por ela influenciar diretamente as propriedades, como temperatura vítrea, resistência mecânica, entre outras. Embora o custo do processo seja um fator decisivo e limitante, principalmente quando se considera escala industrial de produção e se faz necessário um preço competitivo para a comercialização, existem outras considerações a se fazer:

- Reduzir riscos e impactos ambientais, como por exemplo, o uso de produtos químicos perigosos e tóxicos;
- Considerando aplicações na área médica é absolutamente necessário que o PHA esteja livre de endotoxinas bacterianas e outros produtos químicos e solventes contaminantes.
- Tempo do processo;

A metodologia de buscar de artigos baseou-se então no estudo de Jacquelin et al. (2008), em que as principais tecnologias de extração de poli(3-hidroxiácido) são abordadas. A busca foi realizada na plataforma do *ScienceDirect* e foram priorizados estudos científicos com data de publicação a partir de 2006. As palavras-chave utilizadas foram tais como: “*polyhydroxyalkanoate*” (polihidroxiácido), “*recovery and purification*” (recuperação e purificação), “*Enzymatic digestion*” (digestão enzimática), “*poly(3-hydroxybutyrate)*” (poli(3-hidroxiácido)) e “*PHA recovery*” (recuperação de PHA), dentre outros.

Além disso, alguns estudos citados e referenciados nos artigos, encontrados a partir da busca descrita acima, entraram neste trabalho de forma a complementar e esclarecer alguns métodos. Nem todos trabalhos estavam dentro do período datado escolhido, porém pela importância do seu conteúdo também fizeram parte deste estudo.

Devido à limitação de páginas do trabalho e tempo de execução, optou-se por abranger variadas técnicas, porém priorizando as que provavelmente possuem maior viabilidade econômica para a aplicação em escala industrial. Desse modo, o presente trabalho não contemplará todos os estudos publicados no período estipulado de publicação com as palavras-chave escolhidas, porém proporcionará uma análise crítica dos artigos selecionados.

4 Revisão Bibliográfica - Aplicação dos métodos de recuperação de Polihidroxialcanoatos

Nesta seção serão apontados os resultados encontrados nos artigos, selecionados conforme descrito no capítulo anterior, para os diferentes métodos de recuperação do polímero. Os resultados estão apresentados em tópicos separados por tipo de método empregado.

4.1. Métodos Químicos

No trabalho de *López-Abelairas et al.* (2005), foram estudados alguns métodos para a recuperação de polímero de células de *Cupriavidus necator* H16. Um dos tratamentos utilizados foi a digestão alcalina com NaOH, por se tratar de um método de baixo custo. Os autores testaram diferentes proporções de sólidos (2,5, 5, 7,5 e 10 % w/v), e diferentes concentrações de NaOH (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 N), com tempo de contato de 4 h na temperatura de 37 °C. As amostras foram centrifugadas e a fase sólida foi lavada com água e com etanol e foram liofilizadas. Os melhores valores de pureza (92 %) e recuperação (79 %) foram obtidos com um teor de sólidos de 2,5 % utilizando solução de NaOH 0,5 N como agente digestor (LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2015). Com concentrações de sólidos acima de 5 % a pureza diminuiu para 90 % e a recuperação reduziu drasticamente, o que foi explicado pela dificuldade em separar as fases por centrifugação. Além disso, tratamentos com temperaturas de 37 °C e tempos superiores a 5 h não aumentaram a eficiência de recuperação. Também foi empregado por *López-Abelairas* (2005) o método para a recuperação de PHB via digestão com hipoclorito de sódio (NaOCl), devido à sua alta eficácia e à sua simplicidade. A metodologia utilizada foi similar à realizada com NaOH, nas mesmas condições de temperatura e tempo, com solução de NaOCl (13 % v/v) para diferentes concentrações de sólidos (entre 2,5 e 7,5 %, p/v). Com uma carga de sólidos de 5 % a pureza encontrada foi de 90 % e com uma carga de sólidos de 7,5 % foi de 80 %. Esta queda na recuperação foi justificada pela presença de biomassa não digerida na solução, que não pode ser recuperado por centrifugação. A melhor condição encontrada foi com 2,5 % que resultou em uma pureza de 98 % e recuperação de 82 %. Os autores também testaram Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) como agente de digestão. As variáveis estudadas foram a temperatura, a concentração de ácido e o tempo de tratamento utilizando planejamento de experimentos. Os autores reportaram para o ponto ótimo (80 °C, concentração de ácido de 0,64 M e tempo 6 h) recuperação de 79 % e com pureza de 98 %. Resultado semelhante

ao encontrado em tratamentos com hipoclorito. *López-Abelairas et al.*, 2005, também testaram método combinado, utilizando hipoclorito de sódio a 13 % v/v (agente digestor de parede celular) e diclorometano (solvente para PHB) na proporção 1:1 v/v para o isolamento de PHB. Foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e agitação dos experimentos anteriores, com a concentração de sólidos de 2,5 % (w/v). A precipitação de PHB foi realizada utilizando etanol e o sólido resultante foi lavado com água e etanol e liofilizado. Essa precipitação produziu um polímero com alta pureza, mais de 99 % sendo a recuperação 90 %.

Com a preocupação dos impactos com a saúde e com o meio ambiente causados pelo uso de solventes orgânicos clorados (clorofórmio e diclorometano) para a extração em larga escala de P(3HB), a pesquisa de *Rosengart* e colaboradores (2015) buscou solventes alternativos para extração a partir de células de *Burkholderia sacchari*. Na Tabela 1 estão apresentados os solventes utilizados e os resultados reportados pelos autores, em todos os ensaios os autores utilizaram células liofilizadas com 57,7 % de P(3HB).

Tabela 1 – Comparativo de recuperação, pureza e massa molar dos polímeros extraídos por com diferentes solventes. (Adaptado de ROSENGART et al., 2015).

Solvente	Amostra	T (°C)	t (h)	Célula / solvente (%w/v)	Recuperação bruta (%)	Pureza (%)	Recuperação (%)	Recuperação relativa	Mn (Da)	Mw (Da)	PI
Clorofórmio	S	4	36	1.5	97.4 ± 3.9	98.2 ± 2.5	95.6	1.00	2.4 × 10 ⁵	5.6 × 10 ⁵	2.33
Anisol	A1	60-70	2	6.0	2.8	-	-	-	-	-	-
	A2	120-130	0.25	6.0	92.6 ± 4.3	92.1 ± 4.9	85.3	0.89	2.4 × 10 ⁵	4.5 × 10 ⁵	1.88
	A3	120-130	0.50	1.5	98.4 ± 1.5	98.3 ± 0.6	96.7	1.01	2.9 × 10 ⁵	6.8 × 10 ⁵	2.34
	A4	120-130	0.50	6.0	89.4 ± 1.9	96.5 ± 4.2	86.3	0.90	2.8 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁵	2.14
	A5	120-130	1	1.5	99.6 ± 0.9	95.3 ± 5.3	94.9	0.99	2.7 × 10 ⁵	5.2 × 10 ⁵	1.93
Etoxibenzeno	P1	60-70	2	1.5	0.9	-	-	-	-	-	-
	P2	120-130	0.25	6.0	39.0	-	-	-	2.4 × 10 ⁵	5.2 × 10 ⁵	2.17
	P3	120-130	0.50	6.0	32.2	-	-	-	2.5 × 10 ⁵	5.6 × 10 ⁵	2.24
	P4	120-130	1	1.5	96.8	-	-	-	2.5 × 10 ⁵	4.8 × 10 ⁵	1.92
Ciclo-hexanona	C1	60-70	2	1.5	0.3	-	-	-	-	-	-
	C2	120-130	0.25	1.5	95.2 ± 0.7	98.2 ± 1.6	93.4	0.98	5.5 × 10 ⁵	8.0 × 10 ⁵	1.46
	C3	120-130	0.25	6.0	90.9 ± 0.7	91.9 ± 2.8	83.5	0.87	4.5 × 10 ⁵	7.2 × 10 ⁵	1.61
	C4	120-130	0.50	1.5	100.9 ± 3.6	92.3 ± 4.8	93.1	0.97	2.9 × 10 ⁵	6.1 × 10 ⁵	2.10
	C5	120-130	0.50	6.0	93.3 ± 1.2	91.2 ± 4.9	85.1	0.89	2.8 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁵	2.14
	C6	120-130	1	1.5	94.7 ± 3.1	96.4 ± 3.7	91.3	0.96	2.7 × 10 ⁵	6.4 × 10 ⁵	2.37

Mn: massa molar em número; Mw: massa molar em massa; PI: polidispersão.

Para ter um comparativo entre os solventes, *Rosengart* e colaboradores (2015) realizaram um experimento padrão extraíndo PHB com clorofórmio. A quantidade de 0,6 g de células foi colocada em suspensão numa solução de 40 mL de clorofórmio e foram homogeneizadas durante 36 h em uma temperatura de 4 °C. Após este período as células foram filtradas a vácuo e a o polímero foi separado por precipitação em não solvente (etanol). Para os demais solventes, o protocolo de extração descrito anteriormente foi testado em duas condições: a 60 °C por 2 horas e a 120 °C por 1 h, ambas utilizando 1,5 %

de célula por volume de solvente. Os autores reportaram que os 3 solventes apresentaram uma recuperação maior na temperatura de 120 °C. Para tentar reduzir a quantidade relativa de solvente, os autores aumentaram a proporção de biomassa em relação ao solvente (2,4 g mantendo mesmo volume). A recuperação relativa foi definida pela razão entre o rendimento de recuperação usando o solvente em questão e o rendimento de recuperação obtido pela extração padrão de clorofórmio a 4 °C (recuperação de 95,6 % e pureza de 98,2 %). Segundo estes, o bom desempenho na extração e a alta pureza dos polímeros extraídos (Tabela 1) tornam os solventes anisol e ciclo-hexanona alternativos ao uso de clorofórmio.

No trabalho de Nor e colaboradores (2013) foram realizados testes envolvendo a digestão das células de *C. necator* utilizando NaOH (0,1 M). Foram analisadas 5 estratégias para recuperação de PHA, conforme esquematizado na Figura 5.

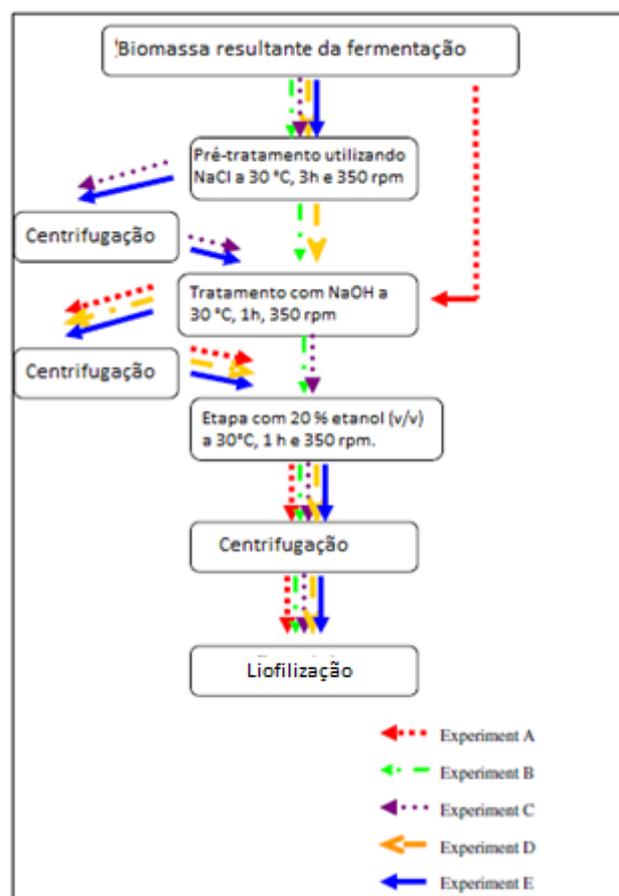


Figura 5 – Fluxograma esquemático das etapas utilizadas em cada experimento (Adaptado de NOR et al., 2013).

Os experimentos foram realizados em biorreator de 10 L utilizando células que continham 68 % em peso de PHA. Dos 5 experimentos, 4 passaram por um pré-tratamento

com NaCl (8 g/L), com temperatura de 30 °C, agitação de 350 rpm, durante 3 horas. A recuperação utilizando NaOH foi realizada na mesma temperatura e agitação, porém com duração de 1 h. Ao final de todos os experimentos as suspensões de células foram tratadas com etanol (20 % v/v) durante uma hora para a precipitação, finalizando o teste com as etapas de centrifugação e liofilização. O pré-tratamento com NaCl mostrou-se um passo essencial para o aumento da eficiência do processo de extração via a digestão da membrana celular pelo NaOH. O experimento que obteve maior pureza (97 %) apresentou massas molares menores (quase metade do encontrado nos outros experimentos). O experimento D, escolhido pelos autores como a melhor estratégia de recuperação de PHA, foi o que proporcionou uma alta pureza (90 %) e uma recuperação (95 %) com degradação insignificante e similaridade de massa molar com o polímero recuperado com extração de clorofórmio (base comparativa). Este processo passou pelo mesmo pré-tratamento e digestão, porém antes de ser tratada com etanol, a solução passou por um processo de centrifugação (NOR et al., 2013).

No estudo comparativo de Kshirsagar e seus colaboradores (2013) foram testados três métodos para extrair PHA das células de *Halomonas campisallis*. O primeiro método analisado foi a digestão química com dodecil sulfato de sódio (SDS), o segundo com SDS e hipoclorito de sódio e o terceiro um método combinado utilizando hipoclorito como agente digestor e clorofórmio para a extração. A digestão com SDS foi realizada a 37 °C por um período de 30 minutos, com 0,1 % (m/v) de SDS. A digestão combinada de SDS (1 %) e hipoclorito de sódio (4 % v/v) foi primeiramente aquecida a 100 °C e rapidamente congelada até 4 °C. A massa congelada foi suspensa em solução de SDS por 30 minutos a 55 °C, após passou por uma centrifugação e foi suspensa em solução de hipoclorito por mais 30 min a 30 °C. A extração combinada de hipoclorito e clorofórmio foi realizada na mesma solução, contendo 0,3 g de biomassa, 50 mL de clorofórmio e 50 mL de hipoclorito a 4 %. A mistura permaneceu com agitação por 90 minutos na temperatura de 35 °C. Na extração realizada apenas com clorofórmio (50 mL) a biomassa (0,3 g) foi lavada com acetona durante 10 minutos e após misturada e incubada por 48 h com o solvente. Os estudos de otimização abrangeram 4 extrações diferentes com este solvente: por refluxo, por evaporador de filme rotativo, por aparelho Soxhlet e por extração na temperatura ambiente. Os resultados reportados no estudo estão apresentados na Tabela 2. Os autores avaliaram também o tempo de tratamento (2 a 40 h), massa celular (0,1 a 0,8 % (m/m v)), para os volumes de 50 mL e 100 mL de solvente. A quantidade de massa celular ótima

encontrada foi de 5 g de massa celular seca por litro de clorofórmio, sendo possível recuperar e reutilizar o solvente (KSHIRSAGAR et al., 2013).

Tabela 2 – Comparativo de recuperação de PHA por diferentes métodos de extração (Adaptado de KSHIRSAGAR et al., 2013).

Método de recuperação de PHA	% PHA	Taxa de extração (mg/h)
Digestão da massa celular de não-PHA usando SDS	7.85	3.9
Digestão da massa celular de não-PHA usando SDS e hipoclorito de sódio	16.53	2.6
Dispersão de 4% (v/v) de hipoclorito e clorofórmio	36.43	7.8
Moagem seguida de extração de PHA em clorofórmio usando Soxhlet	45.75	6.9
Clorofórmio na temperatura ambiente	30.1	5.6
Condições de refluxo via com clorofórmio	39	14.6
Extração de PHA via clorofórmio utilizando Soxhlet	62	4.7
Extração de PHA via clorofórmio usando evaporador de filme rotativo	38	63

No estudo de Tripathi et al. (2013), o biopolímero foi extraído da espécie *Alcaligenes sp.* O método de extração utilizado foi pela combinação em dispersão de clorofórmio em hipoclorito (50 mL) a 37 °C durante 4 h. Após período de contato ocorreu formação de 2 fases distintas, a fase superior contendo massa celular e a inferior contendo PHB. O PHB puro foi obtido por precipitação em não-solvente (cinco vezes o volume de clorofórmio) e filtração. O não-solvente utilizado foi uma mistura de metanol e água (70:30). A recuperação encontrada foi de 78 % e a produtividade foi de 0,19 g /L· h (TRIPATHI; SRIVASTAVA; SINGH, 2013).

No estudo de Vizcaino-Caston et al. (2016) foram realizados testes para a extração química das células de *C. necator* a partir de um solvente não tóxico: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO). O estudo concluiu que 50 mL de DMSO poderiam efetivamente dissolver 380 mg de biomassa contendo P(3HB) a 70 °C. A precipitação foi realizada com etanol (60 mL), numa proporção de 3 volumes de etanol para um da mistura (DMSO e PHB), a -20 °C por ter um maior rendimento a frio. Foi realizada a comparação deste método com a extração utilizando 50 mL de clorofórmio (Soxhlet) a 85°C com precipitação também com etanol. Os rendimentos encontrados foram de 2,51 mg e 2,79 mg de PHB para o clorofórmio e para o DMSO, respectivamente. No entanto, diferenças na massa molar e na cristalinidade foram encontradas. Além disso, o estudo indica que o composto dimetilsulfureto (DMSO) foi encontrado em no PHA já isolado e purificado (VIZCAINO-CASTON et al., 2016).

No estudo de Posada (2011) foram realizados diferentes experimentos para extrair PHB das células de *C. necator*. O primeiro processo utilizado começa com um pré-tratamento alcalino com uma solução de NaOH. Em seguida, um processo de digestão é realizado utilizando NaOCl e dodecilsulfato de sódio (SDS). As células são centrifugadas e o PHB é lavado com H₂O₂. A mistura obtida é submetida a um processo de evaporação. Ao final do processo foi obtido PHB a 99,9 % em peso por secagem em *spray drying*. Os autores também testaram a extração utilizando o solvente succinato de dietila (DES). Após a fermentação a biomassa passa pelo homogeneizador de alta pressão, depois a corrente despressurizada é centrifugada e o produto sólido é aquecido e misturado com DES na proporção de 1/20 de biomassa por solvente. A massa de células residuais é retirada por centrifugação e ao final do processo o DES é recuperado. Finalmente, a pureza do PHB obtido após a etapa de *spray drying* foi de 99,9 % (POSADA et al., 2011).

No estudo de Villano et al. (2014) a produção de PHA com culturas microbianas misturadas foi investigada por meio de um processo sequencial envolvendo três etapas diferentes: reator de batelada em escala de laboratório para seleção de MMC, um reator de acumulação de PHA e um reator de extração de polímero. O reator de extração foi operado a temperatura ambiente e a relação entre o volume da biomassa e a solução química foi de 6: 1. Foram testadas duas soluções de digestão: NaClO com 5 % de Cl₂ e NaOH 1 M. O reator de extração todos os dias recebeu a suspensão de biomassa retirada do reator de acumulação a cada 6 h. Como consequência, a biomassa rica em PHA sofreu diferentes tempos de digestão no reator de extração (isto é: 24, 18, 12 e 6 h). Em média, uma vez por dia, todo o conteúdo do reator foi centrifugado (a 8600 rpm por 30 minutos) para separar a solução de sólidos residuais e após a biomassa foi armazenada a -18 °C.

Tabela 3 – Comparação da recuperação de PHA através de dois métodos de digestão química: solução de NaClO e solução de NaOH (Adaptado de VILLANO et al., 2014).

	NaClO (5% Cl ₂)		NaOH (1 M)	
	3-h de tratamento	24-h de tratamento	3-h de tratamento	24-h de tratamento
Recuperação de PHA (% g/g)	106 ± 4	100 ± 5	87 ± 5	80 ± 6

Foi obtida uma alta produtividade no final do estágio de acúmulo, até cerca de 1,86 g/d (cerca de 1,43 g/ L.d), que foi totalmente recuperada após um passo de extração (Tabela 3). Para 24 horas de contato a recuperação para a solução de NaClO foi de 98 % e de NaOH foi de 80 % em massa de PHA. O método de digestão com hipoclorito de sódio resultou

numa alta pureza (98 % em massa para 24 h), enquanto com NaOH permaneceu baixa mesmo aumentando o tempo de tratamento (em torno de 55 %).

Mohammadi e colegas (2012) propuseram um processo de extração de PHA sustentável que envolve a utilização de NaOH em baixa concentração, produzido por *Cupriavidus necator*. O uso do NaOH é baseado no fato que este reagente provoca a saponificação da camada lipídica da célula e aumenta a permeabilidade da membrana celular facilitando assim, a liberação do material polimérico. Foram estudados os efeitos da concentração de NaOH (0,01, 0,05 e 0,1 M), tempo de digestão (1, 3 e 5 h) e temperatura (4 e 30 °C) no processo de recuperação de PHA. Adicionou-se 20 mL de solução de NaOH a células liofilizadas em tubos de centrifugação de 50 mL para preparar suspensões celulares com uma concentração de 20 g/L. Após o tratamento, o material celular foi separado dos grânulos de PHA por centrifugação durante 20 min. Em seguida, adicionou-se 1 % (v / v) de etanol ao sedimento celular e homogeneizou-se bem. A mistura foi incubada a 30 °C num agitador (200 rpm) durante 3 h. A mistura foi centrifugada durante 10 min, lavada com água destilada e novamente centrifugada. Finalmente, o sedimento foi submetido a liofilização. Os resultados de recuperação e pureza foram de 96,9 % e 96,6 %, respectivamente. Além dos resultados satisfatórios obtidos, este tratamento alcalino provocou uma baixa degradação da massa molar (13 %) (MOHAMMADI et al., 2012a).

O estudo de Quines e colaboradores (2015) teve como objetivo avaliar as variáveis que influenciam no processo de extração de P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno como solvente. Os experimentos avaliaram temperatura e tempo de extração (15, 30 ou 45 min), tempo de repouso e volume de solvente (25, 50 ou 75 mL). A massa de células (11,5 g) foi suspensa em carbonato de propileno aquecido (110, 130 ou 150 °C) com agitação constante de 120 rpm. A suspensão foi submetida à filtração a quente sob vácuo. Após um tempo de repouso (12,18 ou 24h), água destilada foi adicionada em uma relação 4:1 (água:solvente) à solução para a precipitação do polímero, a fim de obter uma suspensão de P(3HB) precipitado em uma mistura de água e carbonato de propileno. Essa suspensão foi submetida a uma segunda filtração e o material polimérico retido no filtro foi lavado com 100 mL de água destilada, sendo posteriormente o filtro contendo a massa polimérica disposto em estufa a 65 °C por 24 h para secagem. A recuperação (98 %) e pureza (99 %) mais elevadas foram obtidas com a temperatura de extração de 150 °C, tempo de extração de 45 min e relação células/solvente de 0,15 g/mL.

Sob estas condições o P(3HB) recuperado apresentou massa molar de 155 kDa, com índice de polidispersão de 1,87 (QUINES et al., 2015).

No estudo de Fiorese et al. (2009) foi realizado o estudo (Tabela 4) da extração via clorofórmio e a extração via carbonato de 1,2-propileno, das células de *C. necator*. Na extração padrão a biomassa molhada (2 g) foi aquecida em clorofórmio (100 mL) até uma temperatura de 60 °C, sob agitação, durante 2 h. Mais tarde, os restos celulares foram separados por centrifugação (15 min, à temperatura ambiente). O polímero foi recuperado por evaporação do solvente. Na extração com carbonato de 1,2-propileno, cerca de 11,5 g de biomassa molhada foram suspensos em 150 mL de carbonato, em um balão equipado com um condensador e agitação magnética, imerso em um banho de óleo termostático. A suspensão foi homogeneizada e aquecida a diferentes temperaturas (100, 115, 130 e 145 °C), sendo a temperatura mais alta o ponto de ebulição do solvente, e com diferentes tempos de contato (15, 30 e 45 min). O melhor desempenho foi obtido com a combinação de uma temperatura de 130 °C e um tempo de contato de 30 min, com uma recuperação de 95 % e uma pureza de 84 %. O polímero assim obtido foi caracterizado com polidispersão de 3,1 (FIORESE et al., 2009).

Tabela 4 - Características físicas do PHB obtidas por extração via solvente com clorofórmio e com carbonato de 1,2-propileno (Adaptado de FIORESE et al., 2009).

Temperatura (°C)	Tempo de contato (min)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)
Extração padrão - clorofórmio		4.9	173.5	80.0	56
Carbonato de 1,2-propileno					
145	45	4.8	170.1	77.8	55
145	30	5.0	180.1	85.0	60
145	15	5.0	177.5	88.5	62
130	30	4.9	175.0	85.0	60
130	15	4.9	173.5	87.8	62
115	45	4.9	175.1	87.0	61
100	45	4.9	175.8	84.5	60
100	15	4.8	171.7	80.5	57

a) T_g , temperatura de transição vítrea; T_m , temperatura de fusão; ΔH_m , entalpia de fusão; χ_c , cristalinidade

Em alguns artigos os percentuais de recuperação e pureza não foram relatados. Ainda assim possuem importância para ressaltar a ampla utilização da extração via clorofórmio e por isso foram selecionados para este estudo.

No estudo de Wang e colegas (2013), o método utilizado para extração e quantificação de PHB, a partir da espécie *Alcaligenes latus*, foi uma combinação de métodos químicos. Uma mistura de hipoclorito de sódio (12,5 mL, 30 % (v/v)) e clorofórmio (12,5 mL) com 1 g de massa celular seca foi deixada a 30 °C por 90 min. Foi então centrifugado e ocorreu formação de três fases distintas, sendo a do topo uma solução aquosa de hipoclorito; no meio as células e material orgânico; e no fundo a fase de clorofórmio rico em PHB. Para a recuperação do PHB, a fase de clorofórmio foi precipitada utilizando uma mistura de metanol e água (7: 3). Após a filtração a mistura foi deixada secando por 48h.

No estudo de Duque e colaboradores (2014) o método de recuperação de PHA utilizado foi extração utilizando clorofórmio. Após a etapa de fermentação, foi adicionado ao PHA acumulado 3 M de HCl para chegar ao pH 3 e então a amostra foi centrifugada por 15 min. A massa resultante foi lavada, filtrada e liofilizada (removendo toda a água que continha). Foi utilizado 40 mL de solvente por grama de células secas e foram deixadas para dissolver por 3 dias a 37 °C. A mistura então foi filtrada e o solvente foi evaporado (DUQUE et al., 2014).

No estudo de Altaee e colaboradores (2016) foram utilizadas as células de *Rhodococcus equi*, para a extração de PHB utilizando clorofórmio como solvente. Os grânulos de PHB acumulados foram extraídos por agitação das células liofilizadas durante 5 dias em clorofórmio com uma proporção de 1 g de biomassa para 100 mL de solvente. Após as células foram filtradas e então a solução foi concentrada utilizando um evaporador rotativo. A solução de polímero concentrada foi precipitada por adição de metanol (não solvente) e deixadas para secar ao ar (ALTAEE et al., 2016).

4.2. Métodos Biológicos

O método de digestão enzimática é utilizado como alternativa à extração de solvente. Kapritchkoff et al. (2006) investigou a eficiência de diferentes enzimas em células de *Ralstonia eutropha*. O estudo deste artigo se baseou na concentração de enzima por biomassa e não pela atividade enzimática. Foram testadas as enzimas: bromelina, tripsina (bovina), quimotripsina (bovina), papaína, lisozima e celulase. O procedimento foi o mesmo para todos os testes realizados pelos autores com as diferentes enzimas. A quantidade de biomassa utilizada foi de 8,25 g e esta foi suspensa em uma solução tampão específica para cada enzima e após foram homogeneizadas em um blender, segundo os autores, não houve

rompimento mecânico significativo das células. Os autores buscaram condições ótimas (concentração de enzima, pH e temperatura) para a aumentar eficiência da reação enzimática. Com a enzima tripsina foi determinado como melhor conjunto de condições: 2 % de tripsina, 50 °C e pH de 9, resultando na pureza de aproximadamente 53 %, e 87,7 % de recuperação de PHB, com o menor tempo de processamento. Com a enzima bromelina o melhor conjunto de condições foi 2 % de bromelina a 50 °C e um pH de 4,75, com uma recuperação de PHB de 88,8 % e uma pureza de 59 %. Na seleção das enzimas, a lisozima foi a que apresentou o pior percentual de purificação de PHB. Com 5 % de enzima a 37 °C e pH de 8,00, a pureza do biopolímero foi de aproximadamente 20 %. A quimotripsina mostrou a maior eficiência com 78 % de Absorbância Relativa (AR) para 1,0 % de enzima por biomassa, sendo a Absorbância Relativa a ferramenta utilizada para calcular a eficiência das enzimas. A AR é calculada a partir da subtração de Abs_{min} e Abs_0 e dividido pelo Abs_0 , sendo Abs_{min} correspondendo a máxima lise celular e a Abs_0 o padrão (para absorbância igual a zero). Este resultado sugere que a ação dessa enzima não ocorre apenas no peptidoglicano. A alta eficiência de tripsina (AR de 77,5 e 75,9 %, com 0,1 e 1,0 % de massa enzimática por biomassa, respectivamente) pode ser devido à sua especificidade para as ligações peptídicas onde a lisina está presente. As preparações enzimáticas com concentração próximas de 1 % resultaram na respectiva ordem crescente de eficiência na solubilização das células *R. eutropha*: celulase, lisozima, papaína, bromelina, tripsina e quimiotripsina. Os autores testaram também a enzima pancreatina, devido ao seu baixo custo. Entre todas as condições testadas, o resultado com maior eficiência foi encontrado na temperatura de 50 °C e com solução de pH igual a 8,0. O percentual recuperado de PHB foi de 90,3 % e a pureza de 62,2 %, sendo maiores que os valores encontrados para a bromelina. Após os experimentos e comparações de eficiências foi realizada uma análise de custo das enzimas estudadas e os autores concluíram quais as preparações com menor custo de processamento: bromelina com 1,2 %, tripsina com 0,1 % e a quimotripsina com 0,1 %. Os autores realizaram então experimentos de recuperação e purificação de PHB com estas três enzimas. A tripsina foi selecionada devido à sua especificidade para ligações peptídicas com lisina e bromelina devido à sua ampla especificidade. Embora a lisozima tenha uma baixa eficiência na quebra celular e seja uma enzima de elevado custo, também foi escolhida para o estudo, uma vez que é frequentemente citada como uma enzima para a quebra do peptidoglicano. Dentre as enzimas escolhidas e suas características, a possibilidade do uso combinado simultaneamente e sequencialmente foram adicionadas ao

estudo. No experimento realizado com a combinação de bromelina e tripsina simultaneamente, foi utilizada uma concentração de 2 % para cada uma das enzimas, na temperatura de 50 °C e nos valores de pH de 4,75, 7,00 e 9,00. Os resultados reportados pelos autores estão apresentados na Tabela 5. Com as duas enzimas combinadas, a melhor condição foi com pH igual a 9,00, resultando em uma recuperação de 88,8 % de PHB com uma pureza de 57,2 %. Em contrapartida, estes valores são aproximadamente iguais aos valores encontrados testando as enzimas separadamente.

Tabela 5 – Experimentos com adição simultânea de Tripsina e Bromelina. (Adaptado de KAPRITCHKOFF et al., 2006).

Enzima ^a	pH	PHB% ^b	Δpureza (%)	Tempo para alcançar o máximo (h)
Bromelina e tripsina	4.75	86.6 ± 1.4	52.8 ± 3.2	12.0
Bromelina e tripsina	9.00	88.8 ± 1.5	57.2 ± 3.5	12.0
Bromelina e tripsina	7.00	88.8 ± 1.5	57.0 ± 3.5	12.0
Bromelina	4.75	88.8 ± 1.5	59.1 ± 3.6	10.0
Tripsina	9.00	87.7 ± 1.4	52.8 ± 3.2	1.0

^a Concentração de enzima (massa de enzima por biomassa): 2% por enzima.

^b PHB% inicial , 73.4±1.2%.

Depois de avaliar a eficiência das diferentes enzimas e suas combinações, o melhor resultado para a obtenção de P(3HB) (com recuperação de 88,8 % e pureza de 59 %) foi com 2,0 % de bromelina (massa enzimática por biomassa) a 50°C e pH igual a 9,0. Além disso, os testes com a pancreatina (consideravelmente mais barata que a bromelina) resultaram em valores iguais ou superiores à bromelina.

O processo por via biológica utilizado no estudo de Posada e colegas (2011) utilizou a combinação da digestão por enzima e da digestão química. O primeiro passo foi um tratamento térmico a 85 °C, e depois um processo combinado de digestão foi realizado utilizando a enzima pancreatina de *Burkholdeira sp.* (2 % em massa) e o composto NaOCl (1:2 NaOCl por biomassa) a 50 °C, durante 1h. Este pré-tratamento provoca uma ruptura celular apropriada que libera o PHB para o caldo de fermentação. O produto de digestão contendo entre 7 e 9 % em massa de biomassa é filtrado e a massa celular residual é retirada. A mistura contendo o PHB, 5,5-5,7 % em peso, é tratada com uma solução de peróxido de hidrogênio e água. Então, usando um processo de flash, a maior parte da água é retirada. Finalmente, PHB a 99,9 % em peso é obtido por secagem *spray drying*. Os autores concluíram que o melhor processo custo-benefício foi a este citado acima, quando comparado com os métodos químicos explicados no item 4.1 deste capítulo.

No estudo de Yasotha e colaboradores (2006) foram realizados experimentos para a recuperação de PHA, via digestão enzimática combinada com digestão química, de células da espécie *Pseudomonas putida*. Para o procedimento foram utilizados a enzima *Alcalase* (para digerir as proteínas desnaturadas), SDS para auxiliar a solubilização, ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) para complexar cátions divalentes e *lisozima* para digerir a parede de peptidoglicano envolvendo a célula. Após o processo de cultivo, as células foram coletadas por centrifugação do caldo e foram colocadas em suspensão com água. Esta suspensão foi então submetida a um tratamento térmico por autoclave a 121 °C durante 1 minuto antes do tratamento enzimático. A foi então submetida a digestão com *Alcalase* e SDS, as condições do processo foram pH igual a 8,5 e temperatura de 55 °C. As concentrações dos agentes digestores e o tempo de duração do processo foram otimizados através do método de Taguchi. Seguiu-se outros tratamentos com EDTA e lisozima a pH igual 7 e temperatura de 30 °C durante 15 minutos. Os resultados mostram que a enzima *Alcalase* utilizada teve o efeito mais significativo no processo de tratamento e contribuiu para cerca de 71,5 % em termos de desempenho do tratamento para recuperação de PHA. O experimento obteve 92,6 % de pureza e aproximadamente 90 % de recuperação (YASOTHA et al., 2006).

No trabalho de Suzuki et al. (2008) foram utilizadas células da espécie *Burkholderia cepacia* para a extração de PHB por via enzimática, utilizando a enzima *Esperase*. O estudo reuniu testes enzimáticos isolados e utilizados em conjunto com um tratamento com H₂O₂, além de comparar com o método químico utilizando o agente digestor SDS. A suspensão celular (22 g/L) foi homogeneizada por agitação (200 rpm) durante 30 minutos a 50 °C. Em seguida, os processos químicos (SDS, peróxido de hidrogênio) ou enzimático (*Esperase*) foram realizados. Todos os processos com a enzima duraram 1 h e utilizaram uma concentração de 0,02 de enzima por biomassa. Os testes enzimáticos realizados em conjunto com os químicos, variaram a ordem dos tratamentos. O experimento com a maior taxa de pureza de PHB foi o enzimático seguido de SDS. A taxa utilizada foi 0,56 (SDS/células) e a pureza obtida foi de 71 %. O experimento que utilizou o método enzimático como pré-tratamento seguido de H₂O₂ na taxa de 0,3 (peróxido/células) obteve 60 % de pureza (SUZUKI et al., 2008).

No estudo de Murugan e colegas (2016) foi realizada a recuperação biológica via Bichos-da-farinha ou larva do *Tenebrio molitor* (mealworms). Esta larva pode crescer em altas

densidades, exigir menos água e espaço, e pode consumir até 10 % em peso de alimentação de seu peso corporal durante o dia. É possível a sua utilização para a recuperação de grânulos de PHA enquanto os materiais celulares não-PHA são digeridos pela larva. O processo de alimentação de 50 g larvas durou 16 dias e foram consumidas 40 g de células liofilizadas de *C. necator* cultivadas em óleo de palma. Os grânulos de PHA nas fezes pareciam intactos. As fezes recolhidas contendo grânulos de PHA foram submetidas para purificação usando água, em outro experimento usando SDS a 1 % (p v) e com SDS foi realizado o teste com e sem aquecimento a 50 °C. Após este tratamento de purificação, foi realizada uma lavagem com HCl 0,001. Em seguida, o sedimento resultante foi transferido para uma placa de Petri limpa e foi seco durante a noite em um forno a 60 °C. No processo de purificação com clorofórmio, as células liofilizadas (1 g) foram agitadas em 100 mL de clorofórmio durante 5 dias à temperatura ambiente. A biomassa residual foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado para 10 mL utilizando evaporador rotativo. A precipitação do polímero concentrado foi a partir de 100 mL de metanol refrigerado. O precipitado branco resultante foi recuperado por filtração sob vácuo e seco ao ar durante a noite. A lavagem com água resultou na separação de grânulos fecais dos outros materiais e mostrou uma pureza de PHA de 89 %. As células liofilizadas que foram colocadas para a alimentação das larvas continham 54 % de PHA. Esses resultados mostraram que o sistema digestivo destes animais foi capaz de digerir o material celular bacteriano, que por sua vez resultou na liberação dos grânulos de PHA, porém também continha algumas proteínas e outras impurezas do sistema digestivo. Os outros processos de purificação conseguiram alcançar taxas de purezas bem elevadas (MURUGAN et al., 2016).

No estudo de Kunasandari e pesquisadores (2017) com as células de *Cupriavidus necator H16* um novo método biológico. O método ali estudado iniciou após a observação que o biopolímero foi excretado nas fezes de ratos alimentados com esta bactéria. O estudo demonstra que as células de *C. necator* são uma fonte de proteína adequada para ratos que, simultaneamente, liberando grânulos de P(3HB) passíveis de recuperação. Os animais em uma dieta de células bacterianas excretaram bolachas fecais esbranquiçadas enquanto animais alimentados com alimentos comerciais produziam bolinhas fecais de cor escura normal. A análise de cromatografia em fase gasosa (GC) confirmou que estas pastilhas fecais brancas eram constituídas por 82-97 % em peso de P(3HB). Para fins comparativos, as pastilhas liofilizadas foram purificadas utilizando 3 soluções: água, SDS (2 %) e dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS - 2 %). Para cada solução foi utilizado 20 %

de células e a proporção de água para pastilhas foi de 4:1. Os experimentos foram realizados na temperatura ambiente, por 24 h e com agitação de 250 rpm. Ao final a biomassa foi centrifugada por 15 min, lavada com água e novamente centrifugada, para então secar por 24 h a 60 °C. O P(3HB) acumulado nas células foi extraído por refluxo de 1 g de células liofilizadas em 100 mL de clorofórmio a 60 °C durante 4 h. A biomassa residual foi removida por filtração, o filtrado resultante foi concentrado até 10 mL utilizando um evaporador rotativo e depois a precipitação em metanol (não solvente). O material polimérico foi recuperado por centrifugação a 10 g durante 10 min e seco ao ar durante a noite. Na Tabela 6 encontra-se os resultados reportados pelos autores para os diferentes métodos de purificação utilizados.

Tabela 6 – Comparação do grau de pureza entre diferentes métodos de extração pelos experimentos de Kunasandari (Adaptado de KUNASUNDARI et al., 2017).

Pureza, massa molar e propriedades térmicas de P(3HB) obtidos a partir de métodos de extração biológico e químicos.

Amostras	Pureza (wt%)	M_w^a ($\times 10^5$)	M_w/M_n^b	T_m^c (°C)	T_g^d (°C)
P(3HB) - extração por solvente (clorofórmio)	97 ± 3 ^g	9.5 ± 1.0 ^h	2.7 ⁱ	173	2
P(3HB) - extração biológica	89 ± 3 ^g	9.3 ± 0.5 ^h	2.5 ⁱ	172	3
P(3HB) - 2% SDS	97 ± 2 ^g	8.2 ± 0.6 ^h	2.5 ⁱ	174	2
P(3HB) - 2% SDBS	96 ± 3 ^g	7.8 ± 0.5 ^h	2.7 ⁱ	171	3

SDS - Dodecil sulfato de sódio;

SDBS - Dodecil benzeno-sulfonato de sódio

a Peso molecular médio

b Índice de polidispersão

c Temperatura de fusão

d Temperatura de transição vítrea

4.3. Métodos Mecânicos

Tamer e Moo-Young (1998) realizaram experimentos para a extração de PHB com a célula *A. latus*, a partir das técnicas de moinho de pellets de vidro e de homogeneizador de alta pressão, e estes resultados foram comparados com o método de digestão química por SDS e hipoclorito de sódio. Pelo método químico com dodecil sulfato de sódio (de 0,2 a 2 kg de SDS/kg de biomassa; dados pH igual a 10 e temperatura de 35 °C) por 1 hora, seguido de uma lavagem com hipoclorito de sódio (1,3 kg de hipoclorito/kg de biomassa; pH 13) por 24 h, foi possível extrair 95 % da proteína celular. Em contrapartida, valores próximos foram alcançados em poucos minutos no método de moinho de bolas. A eficiência desta técnica foi independente da concentração de biomassa (de 8 a 66 kg de DW/m³). A velocidade de agitação (2800 rpm) e a taxa de fluxo de biomassa diluída (90 mL.min⁻¹) foram mantidas constantes. As amostras (4 mL) foram coletadas na saída do equipamento

para cada passagem e foram diluídas 2-3 vezes com água deionizada para facilitar a remoção de detritos por centrifugação durante 15 min. A ruptura celular completa foi alcançada dentro de oito passagens (85 % de carregamento de pérolas de 512 μm). Já o desempenho do homogeneizador dependia da concentração de biomassa. Em relação ao moinho, o homogeneizador não teve uma boa eficiência em baixos níveis de biomassa, mas a 45 kg de DWm⁻³ de concentração de células, o rendimento foi um pouco melhor. No entanto, bloqueios frequentes dificultaram o processamento, indicando que a técnica de moinho de pellets de vidro é mais indicada para a aplicação em escala industrial (TAMER; MOO-YOUNG, 1998 Apud KOSSEVA; RUSBANDI, 2017) .

No estudo comparativo de Kshirsagar e colaboradores (2013), além dos métodos químicos citados anteriormente, foi testado o rompimento celular da espécie *Halomonas campisalis* por meio de moinho de bolas. Contudo, o moinho de bolas foi utilizado apenas como um pré-tratamento. A biomassa foi primeiramente lavada com acetona e centrifugada a 10 °C, após passou pela etapa de extração mecânica seguida de uma lavagem com água destilada e nova centrifugação. Esta biomassa foi novamente lavada com acetona e depois passou pelo método de extração com clorofórmio. Todo este processo durou 16 horas. A máxima recuperação deste processo foi de 84,5 % com o experimento a 60 °C e tempo de 3 h, sendo o moinho de bolas responsável por 51,56 % desta recuperação de PHA. Embora não tenha sido fornecido o percentual de pureza, os autores deixam claro que foi possível obter um produto final com alta pureza e alta massa molar (KSHIRSAGAR et al., 2013).

O estudo de Y. Ling e colegas (1997) realizou experimentos para a extração a partir de métodos mecânicos com a espécie *E. Coli*. Após a etapa de cultivo da bactéria a cultura passou por um congelamento (18 °C negativos) e depois por um descongelamento (a 4 °C) sendo diluída em água e ajustada para o pH de 6,9 (com NaOH). Para a homogeneização da mistura foi utilizado um homogeneizador de alta pressão (55MPa) sendo utilizado 3 passes no equipamento, passou por centrifugação, novamente passou pelo homogeneizador e foi mais uma vez centrifugado, ambos processos a 10 °C. Para fins comparativos foi realizado um experimento com hipoclorito de sódio sendo realizada com 2 passes no homogeneizador, um tratamento com 1,5 % de NaOCl (700 mL/min) para a digestão da biomassa não-PHB e novamente centrifugação. A comparação entre os métodos de extração mecânica e combinação de métodos mecânicos e químicos concluiu

que a recuperação de PHB aumentou de 76 % para 92 % quando utilizado os dois métodos em sequência (LING et al., 1997).

4.4. Outros Métodos

O método de extração com fluidos supercríticos foi citado por Kosseva e Rusbandi (2017) por ser um método não tóxico, não inflamável e de baixa reatividade. Este método depende do rompimento celular e tem como desvantagens os custos e a manutenção do equipamento. Na literatura foram encontradas purezas de 86 % a 99 %, porém a grande maioria dos artigos que realizaram o experimento não foram encontrados ou não houve acesso gratuito a eles.

No estudo de Hejazi (2003) foram utilizadas as células de *R. eutropha* para avaliar a extração por fluidos supercríticos. Após o cultivo a biomassa passou pelos processos de centrifugação e lavagem com água destilada para só depois serem suspensas na solução tampão com 4 mL de HCl (pH de 7,2 e 0,05 M) e diferentes volumes de metanol. O metanol é utilizado para aumentar a polaridade da solução que entrará em contato com o CO₂ supercrítico. A mistura resultante contendo células suspensas com uma concentração de 18 g de célula seca por litro de solução foi colocada em um vaso de extração. As células suspensas foram expostas ao CO₂ supercrítico por diferentes períodos de tempo e nas condições especificadas, ao final a pressão é liberada para causar uma queda de pressão que causa a ruptura parcial da membrana celular e liberação de grânulos de PHB na suspensão. Para extrair PHB da suspensão contendo grânulos de PHB e células rompidas, 2 mL desta solução e 4 mL de clorofórmio permaneceram em agitação constante durante 15 minutos e após foi centrifugada a 4000 rpm. A máxima recuperação obtida usando CO₂ supercrítico combinado com a extração com clorofórmio foi de 89 % de PHB. As condições para esta taxa de recuperação foram 200 atm de pressão na temperatura de 40 °C (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003 Apud JACQUEL et al., 2008).

Outros métodos foram citados também por Kosseva e Rusbandi (2017), como o método por fragilidade celular ou irradiação gama (DIVYASHREE; SHAMALA, 2009). Entretanto quando encontrados os artigos referenciados, os métodos não eram usados para a extração do biopolímero e sim usados em conjunto com algum método químico (geralmente extração com clorofórmio).

No estudo de Mohammadi et al. (2012) foi realizado um experimento para a extração de PHB a partir das células de *Cupriavidus necator* utilizando água e etanol. A adequação da

água como um solvente isento de halogênio sob diferentes tempos de incubação (1, 3 e 5 horas) e as temperaturas de 4 °C e 30 °C. Células liofilizadas (0,4 g) foram adicionadas a 20 mL de água destilada e então mantida sob diferentes condições para extração de PHA. Os grânulos de PHA foram separados da fração aquosa contendo material celular não-polimérico por centrifugação por 20 minutos a 4 °C. O precipitado contendo PHA foi misturado com etanol (96 % v/v) a 1 % (v/v), agitado a 200 rpm durante 3 horas a 30 °C e centrifugado durante 10 min a 4 °C. O sedimento que continha PHA foi lavado com água destilada, novamente centrifugado durante 10 minutos na mesma temperatura (4 °C) e foi liofilizado. Os resultados obtidos pelos autores estão apresentados na Tabela 7. Na Tabela 8 podem ser observadas as massas molares dos polímeros obtidos após o procedimento recuperação de PHA das células de *Cupriavidus necator*.

Tabela 7 - Efeito de etapas de recuperação e purificação na remoção de proteína solúvel e pureza de PHA (Adaptado de MOHAMMADI et al., 2012).

Amostra	Células de <i>Cupriavidus necator</i>	
	Remoção da proteína solúvel (%)	Pureza de PHA (%)
Após incubação com água	62.8 ± 0.02	67.7 ± 1.8
Após lavagem com etanol	8.3 ± 0.01	79.7 ± 2.0
Após lavagem com água	8.3 ± 0.01	80.6 ± 0.9

Nas melhores condições encontradas (1 h e 30°C) a taxa de recuperação de PHA foi de 96 % com 81 % de pureza, e quantidade de PHA de 38 % (em massa), o peso total foi de 59,2 g de PHA. Entretanto, a extração de clorofórmio obtida pelos autores na literatura é um PHA com 100 % de pureza com 95 % de recuperação.

Tabela 8 –Valores de massas molares de PHA recuperados MOHAMMADI et al., 2012).

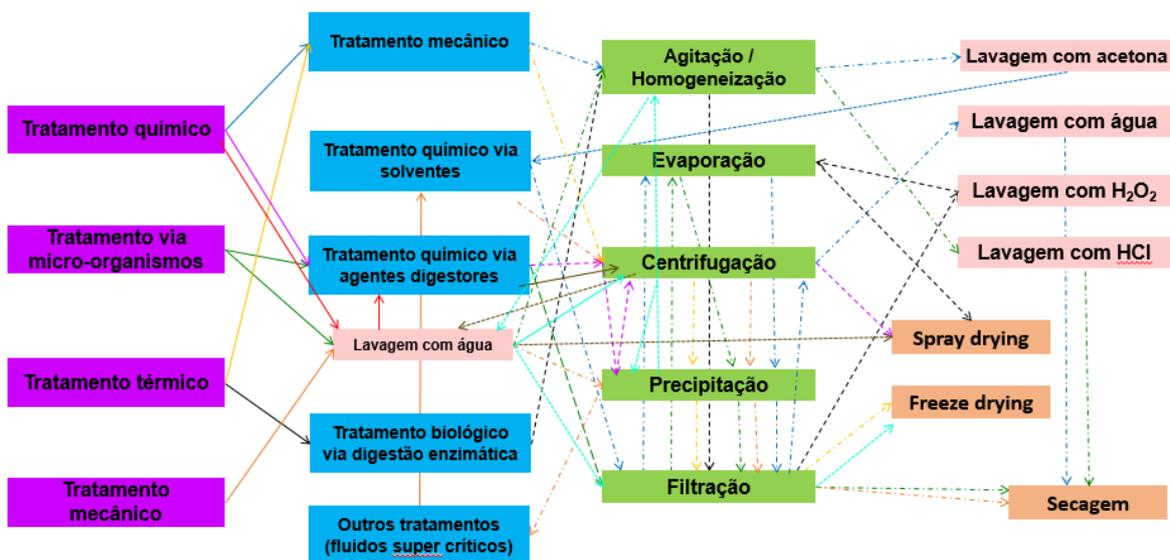
Tratamento	M_n^a (Da)	M_w^b (Da)
Recuperação de PHA via clorofórmio a partir de células <i>Cupriavidus necator</i>	59,000	169,000
Recuperação de PHA via solvente livre de halogênios por 1h e 30°C	127,000	325,000

^a Mn - Peso molecular médio em número

^b Mw - peso molecular médio em massa

5 Inferências quanto ao uso potencial dos métodos

A Figura 6 foi elaborada para ilustrar as metodologias de pré-tratamentos e tratamentos para a extração de Poli(3-hidroxiбутirato) que foram englobadas no capítulo 4 deste trabalho, de forma a mostrar a ligação entre os diferentes métodos. Observa-se que além da combinação de duas técnicas principais para a recuperação do polímero (por exemplo a combinação de método químico e biológico ou químico e mecânico), a maioria dos experimentos utiliza um pré-tratamento (por exemplo o tratamento térmico). Nota-se ainda que todos os experimentos utilizaram tratamentos químicos em alguma etapa, seja como pré-tratamento, como tratamento principal, ou na lavagem da biomassa. Outro ponto observado foi que as operações retratadas nas caixas em verde são comumente utilizadas de forma cíclica e na maioria das situações são utilizados mais de uma vez durante o processo.



No fluxograma apresentado na Figura 6, as caixas em roxo representam operações de pré-tratamento e as caixas em azul representam as operações de recuperação principais. As caixas em verde representam as operações de lavagem e as caixas em laranja representam as operações de secagem. Figura 6 - Representação das metodologias de pré-tratamentos e tratamentos para a extração de PHB empregadas nos artigos selecionados (elaboração própria).

realizadas como uma primeira etapa no processo de recuperação (modificação da parede celular e início de um processo de extração) ou então como pré-tratamentos (apenas enfraquecem a parede celular do microrganismo). Nas caixas em azul são apresentados os métodos de recuperação principais, que em geral são utilizados de forma combinada entre si ou com algum método da primeira etapa, representados em roxo. Nas caixas em verde são operações que visam auxiliar o processo de recuperação, tanto quanto ajudar na

separação da biomassa residual ou solvente do biopolímero e purificação do produto final. As caixas em rosa são processos de lavagem ou “polimento” que têm por finalidade aumentar o percentual de pureza do produto de interesse. E nas caixas de cor salmão são os processos que finalizam este procedimento para a entrega do produto final.

Deste modo, se pode inferir que o processo de purificação de PHB é complexo e afeta consideravelmente o custo de produção e as propriedades deste biopolímero em função da necessidade aparente de mais de uma etapa para purificação. Com isso, a pesquisa e o desenvolvimento do processo de purificação ainda são necessários para redução de custos e obtenção de melhores taxas de rendimento e pureza.

Importante ressaltar que a escolha do método para a recuperação e etapas adicionais de purificação também está ligada à espécie de bactérias escolhida (Gram-positiva ou Gram-negativa) e da aplicação do produto final. A aplicação deste biopolímero no campo médico necessita além de altas purezas, ser livre de toxinas. Além disso, os métodos de recuperação para alta pureza de PHAs de espécies Gram-negativas (possuem toxinas) exigem tratamentos para a retirada destas endotoxinas. Estes pós-tratamentos (lavagens e purificações) aumentam ainda mais os custos associados à produção desses biopolímeros.

Os critérios que devem ser avaliados são: alta recuperação com produtos de alta pureza; propriedades físicas e químicas do PHA mantidas, o baixo custo de produção para ser um produto com capacidade competitiva (respeitando as devidas aplicações); e sem toxinas de cepas Gram-negativas ou resíduos tóxicos dos métodos químicos.

No apêndice I, estão resumidas as características, vantagens e desvantagens de cada método abordado. Para comparar os métodos de tratamento discutidos na seção 4, atribuiu-se uma nota de 1 a 3 em relação a cada parâmetro de eficiência apontado na seção 3. Para garantir maior sensibilidade a análise, atribuiu-se pesos maiores aos parâmetros considerados mais importantes. A classificação de acordo com cada parâmetro será discutida nas seções a seguir.

5.1 Recuperação e pureza do biopolímero

Para este parâmetro foi considerada a nota máxima de importância (peso 3) para a escolha de uma metodologia porque representa o principal objetivo para as aplicações deste polímero além de influenciar diretamente o custo de produção. Para avaliar os

artigos quanto à taxa de recuperação e a pureza foi elaborado um estudo sobre estes dados descritos. Além disso, os artigos que não forneceram estes percentuais, auxiliaram no melhor entendimento da técnica, na visão sobre os rendimentos (g/L) e estratégias.

O método mecânico e de fluido supercrítico atribuiu-se a menor nota (1) pois foram relatadas baixíssimas taxas de recuperação, principalmente quando comparadas com o método químico utilizado atualmente em escala industrial: utilizando extração com clorofórmio. Além disso, foram relatados casos de impurezas por formação de biomassa residual que prejudicou o processo e a pureza do produto final.

Os métodos que se atribuiu a nota máxima foi o que obtiveram valores altos e comparáveis com o processo via clorofórmio (ambas as taxas acima de 95 %). O método biológico recebeu a nota média (2) pois as taxas permaneceram abaixo de 90 %.

5.2 Preservação das propriedades do polímero

De forma semelhante ao parâmetro anterior, este também foi considerado com peso máxima de importância (peso 3) para a escolha de uma metodologia porque afeta diretamente as aplicações do biopolímero. Além disso, as alterações de propriedades como viscosidade ou massa molar afeta o processamento e rendimento dos métodos de extração e recuperação.

Aos métodos mecânicos (simples ou combinados) atribuiu-se a menor nota (1), pois foram relatados diversos problemas de degradação e dificuldade no processamento. Aos métodos químicos foram relatados casos de alta viscosidade da solução polimérica, porém a maior parte dos métodos químicos apresentou baixa degradação da massa molar. Já os métodos biológicos mostraram que não afetam consideravelmente as propriedades do produto final.

5.3 Custo de produção

Para este parâmetro foi considerado o peso intermediário de importância (peso 2) para a escolha de uma metodologia porque mesmo sendo a motivação de estudos e o fator decisivo na hora de se considerar uma produção em escala industrial, ele está fortemente vinculado aos dois primeiros fatores.

Aos métodos mecânicos (simples ou combinados) atribuiu-se a menor nota, pois foram relatados altos custos dos equipamentos ou da manutenção dos equipamentos. Embora

este custo pudesse ser muito elevado inicialmente, mas depois reduzido apenas à manutenção do equipamento.

Aos métodos biológicos atribuiu-se a nota intermediária, embora algumas enzimas possuam um alto custo, enzimas de baixo custo obtiveram um bom resultado e com mais estudos poderiam ter um grande potencial. Os métodos químicos, embora em sua maioria o custo do solvente é consideravelmente mais baixo, o processo encarece pela necessidade de etapas adicionais de retirada de solvente tóxico ou então pelos processos de tratamento de águas residuais.

5.4 Utilização de compostos tóxicos

Além dos impactos ambientais o uso de compostos nocivos afeta diretamente a saúde humana e pode prejudicar na aplicação do produto final. Embora este parâmetro devesse ser considerado com nota máxima, sabe-se que o custo ainda é mais influente na hora de pensar em ampliação de escala e ser viável competir no mercado de polímeros. Ainda assim, não se poderia dar uma nota reduzida pois a principal motivação do uso deste produto é ambientalmente sustentável. Para este parâmetro então foi considerado o peso intermediário de importância (peso 2).

Os principais métodos para serem avaliados neste critério são os métodos químicos e estes utilizados em conjunto com outros métodos. Dentre os compostos químicos mais utilizados estão os solventes halogenados como clorofórmio, dicloroetano, cloropropano e cloreto de metila. Porém, alguns estudos utilizando o solvente carbonato de propileno se mostraram promissores. Sendo assim, foram divididos os métodos químicos que utilizam solventes halogenados ou não. Além disso, os métodos que utilizam solventes possuem a possibilidade de recuperação e reutilização dos produtos químicos utilizados no processo, o que em alguns casos conseguiria diminuir o custo relativo ao solvente. Dos métodos químicos que utilizam agentes digestores, a maior parte dos compostos são clorados e também novamente se faz contraditória à ideia de que estes biopolímeros possam representar alternativas para minimizar as agressões ambientais. Embora a grande maioria dos compostos digestores estudados sejam clorados e/ou tóxicos, o hidróxido de sódio (NaOH) se destacou com altos percentuais de recuperação e pureza. Sendo assim, na tentativa de avaliar os métodos de forma bem criteriosa, se fez também a separação entre os métodos digestores.

5.5 Tempo de processamento e obtenção do produto final

Este parâmetro entra em conjunto com os critérios que influenciam o custo de produção. Embora a maior parte dos artigos não tenha relatado claramente os tempos de processamento, foi possível estimar uma média da duração destes processos. As notas vinculadas ao cada critério representam exatamente essa média aproximada. A importância deste parâmetro para se considerar um aumento de escala de processo se compara com os dois primeiros critérios, porém como os dados analisados não foram precisos, a ele foi atribuído nota mínima.

Os métodos químicos possuem tempos de processamento muito variados. Os tratamentos com solventes possuem um tempo de contato que varia de 1 h a 5 dias, e são necessários processos adicionais de tratamento. Os processos por digestão podem variar de 30 min até 24 h de processamento. Da mesma forma os métodos biológicos que apresentaram tempos de processamento de até 12 h. Em ambos os casos, atribuiu-se a nota intermediária.

Os processos mecânicos necessitam de maior tempo, seja pelo tempo de residência dentro dos equipamentos ou pelo número de passagens da biomassa pelo equipamento. Para estes processos atribui-se nota mínima. Já para o processo de fluido supercrítico, o tempo de processamento é consideravelmente baixo, porém mais artigos seriam necessários para verificar este dado.

A Tabela 9 apresenta o resumo da pontuação total. Observa-se que, em relação aos estudos dos métodos de recuperação avaliados nesta revisão bibliográfica, os métodos químicos que fazem uso de agentes não tóxicos apresentam maior potencial de aplicação industrial de acordo com a metodologia de classificação proposta. Os dois métodos com maior nota se destacam principalmente pelos elevados percentuais de recuperação e pureza. Além disso, a combinação dos métodos biológicos e químicos encontra-se muito próxima na pontuação final quando comparada com as técnicas de maior potencial. O uso destas técnicas combinadas mostrou uma obtenção e pureza maior do que as encontradas apenas com o método biológico, o que mostra que devem ser feitos novos estudos para futuramente reconsiderar esta classificação.

Tabela 9 – Classificação dos métodos de extração abordados na revisão bibliográfica de acordo com os parâmetros definidos (elaboração própria).

Método	Recuperação e Pureza do Biopolímero	Preservar as propriedades do PHA	Custo de produção	Utilização de produtos tóxicos	Tempo de processo	Total
Químico (solventes)	3	2	2	1	2	2,09
Químico (solventes não halogenados)	3	3	3	2	3	2,82
Químico (digestores não tóxicos)	3	3	3	3	2	2,91
Químico (digestores)	3	2	3	1	2	2,27
Biológico	2	3	2	3	2	2,45
Biológico/químico	3	3	2	2	2	2,55
Mecânico	1	2	2	3	2	1,91
Mecânico/Químico	3	2	2	1	1	2,00
Outros	1	3	1	2	3	1,91

Os parâmetros utilizados basearam-se nos focos dos autores que em sua maioria deixaram claro a importância de altos percentuais de pureza e recuperação além da preservação das propriedades do biopolímero. As propriedades do produto final são de extrema importância para a aplicação do biopolímeros, principalmente nas áreas médica e farmacêutica. A massa molar foi a propriedade que recebeu maior atenção e por isso foi a mais testada e relatada, porém alguns autores complementaram suas análises demonstrando que degradação da massa molar influencia diretamente nas outras propriedades do polímero, como as temperaturas e resistência mecânica.

As notas recebidas por cada método em cada parâmetro foram a partir de conclusões pessoais após o estudo e leitura dos artigos abordados, ou seja, são notas que no futuro com mais estudos e experiências podem ser reavaliadas.

6 Conclusões e Trabalhos futuros

Diferentes metodologias de recuperação e purificação de PHA foram discutidas, de forma a avaliar suas vantagens e inconveniências. Para apontar qual método possui maior potencial para a aplicação em escala industrial, foi proposta uma metodologia de classificação com base em cinco critérios, aos quais foram atribuídos diferentes pesos de acordo com a sua importância.

As estratégias de recuperação abordadas neste trabalho indicam claramente que a maior parte dos métodos visa, sobretudo, a obtenção de altos percentuais de recuperação e pureza de biopolímero. Além disso, outra preocupação da maioria dos autores citados foi relação e influência entre o método de recuperação e purificação com as características do produto final, como a massa molar. Esta característica influencia diretamente na aplicação do biopolímero, juntamente com a sua pureza.

Em todos os artigos selecionados, observou-se que métodos químicos estão presentes em pelo menos uma etapa do processo de recuperação de PHA. Quando não são utilizados na etapa principal de recuperação, são utilizados como pré-tratamentos ou ainda para purificação. Dentro destes métodos, a maioria dos estudos faz uso de solventes e digestores tóxicos, sendo contraditórios ao fato de que estes polímeros são estudados para minimizar agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica.

Os métodos químicos que não fazem uso de agentes tóxicos são uma alternativa promissora, pois além de não gerar impactos ambientais, alcançaram altos percentuais de recuperação e pureza. Além destes métodos, a recuperação biológica combinada com métodos químicos também recebe destaque e merece mais estudos. A combinação deste método com métodos mecânicos ou químicos auxiliaria no rompimento celular e na recuperação polimérica, conseqüentemente obteria percentuais de pureza e recuperação mais elevados.

Assim, a partir da metodologia utilizada, foi possível concluir que os métodos químicos com agentes não tóxicos são as técnicas mais vantajosas para a aplicação industrial. Apesar de os métodos biológicos também terem destaque no quesito ambiental, ainda enfrentam limitações, evidenciando, portanto, a necessidade de novas pesquisas que objetivem a viabilidade econômica e maior rendimento do processo.

Além disso, é importante ressaltar que a maioria dos autores não relatam as dificuldades práticas dos processos, nem a necessidade de mão de obra qualificada. Desta forma, se forem adicionados a este estudo conhecimentos da parte prática e experimental, possivelmente a conclusão seria outra.

7 Referências

ALBUQUERQUE, P. B. S.; MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

ALTAEE, N. et al. Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil. **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 543–550, 2016.

BOS, M. P.; TOMMASSEN, J. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 610–616, 2004.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros , Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

DIVYASHREE, M. S.; SHAMALA, T. R. Ñ. Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus*. v. 78, p. 147–152, 2009.

DUQUE, A. F. et al. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 276–288, 2014.

FACCIN, D. J. L. Avaliações das condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso. **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos**, v. Ph.D, p. 138, 2012.

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

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 5, p. 1519–1523, 2003.

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

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.
- KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1757–1765, 2004.
- KOSSEVA, M. R.; RUSBANDI, E. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.
- 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.
- KUNASUNDARI, B. et al. Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 1–6, 2017.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 52, p. 27–58, 1995.
- LING, Y. et al. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from recombinant *Escherichia coli* by homogenization and centrifugation. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 6, p. 409–412, 1997.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M. et al. Comparison of several methods for the separation of poly(3hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 250–259, 2015.
- MOHAMMADI, M. et al. Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH. v. 29, n. 8, p. 783–789, 2012a.
- MOHAMMADI, M. et al. Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 2, p. 253–259, 2012b.
- MURUGAN, P. et al. A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*. **Journal of Biotechnology**, v. 239, p. 98–105, 2016.

NOR, S. et al. Effect of different recovery strategies of P (3HB- co -3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium*. **Separation and Purification Technology**, v. 102, p. 111–117, 2013.

PACHECO, M. Extração Do Biopolímero P(3HB) Com Solvente Extração Do Biopolímero P(3HB) Com Solvente. p. 64, 2014.

POSADA, J. A. et al. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011.

QUINES, L. K. M. et al. Extração de Poli(3-Hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. v. 38, n. 2, p. 214–220, 2015.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

ROSENGART, A. et al. Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 39–46, 2015.

SHEN, L. et al. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. **Group Science, Technology and Society**, n. June, p. 41, 2009.

SUZUKI, D. V. et al. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 771–775, 2008.

TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization , Bead Milling , and Chemically Induced Lysis. v. 5885, n. 97, p. 1807–1814, 1998.

TAN, G. Y. A. et al. **Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review****Polymers**, 2014.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 243–250, 2013.

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.

YASOTHA, K. et al. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 260–268, 2006.

YU, J.; SHANG-TIAN, Y. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. v. *Bioprocess*, p. 585–610, 2007.

European Bioplastics, disponível em: <http://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf>. Acesso em 30 de novembro 2017.

8 Apêndice I - Resumo das características, vantagens e desvantagens dos métodos de tratamento abordados na revisão bibliográfica

MÉTODO	AGENTE	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Químico (solvente)	Clorofórmio	Elevada pureza	Volume de solvente elevado;
		Baixa degradação da massa molar	Solvente altamente tóxico (halogenado) e com baixa temperatura de ebulição (perdas processo);
			Soluções poliméricas muito viscosas
	Anisol	Elevada pureza	Altas temperaturas no processo;
	Ciclo-hexanona	Elevada pureza	Altas temperaturas no processo;
	Etóxi-benzeno	Elevada pureza	Altas temperaturas no processo;
Rendimento mais baixo que o obtido com outros solventes.			
Químico (solventes não halogenados)	Carbonato de propileno (C ₄ H ₆ O ₃)	Elevada pureza e Elevada recuperação;	Temperatura de solubilização do polímero no solvente elevada;
		Alta solubilidade do polímero no solvente;	
		Baixa toxicidade;	Possibilidade de degradação da massa molar do polímero
		Elevada temperatura de ebulição permitindo elevada recuperação e reutilização no processo	
Químico (digestores)	Hipoclorito de sódio	Elevada pureza	Elevada degradação da massa molar
			Utilização de solvente clorado (tóxico)
			Elevado custo com o tratamento de águas residuais
	Dodecil sulfato de sódio	Elevada recuperação	Reduzida pureza
			Tratamento das águas residuais mais complexo
	NaOH e NaCl	Elevadas pureza e recuperação	Elevado custo
H ₂ SO ₄ /NaOH/Hipoclorito	Elevadas pureza e recuperação	Elevado volume de águas residuais;	
		Utiliza reagente clorado	
		Redução da massa molar;	

Químico (digestores sem impactos ambientais)	NaOH	Elevadas pureza e recuperação; Baixa degradação da massa molar	
	NaOH/metanol/ acetona	Elevada pureza	Baixa recuperação polimérica
Químico (digestores e solventes)	SDS/hipoclorito de sódio/clorofórmio	Elevada recuperação; Viscosidade reduzida;	Grande volume de reagentes químicos (tóxicos); Elevado custo com tratamento das águas residuais
	Hipoclorito de sódio e clorofórmio	Elevadas pureza e recuperação	Elevada degradação da massa molar do polímero; Produtos químicos clorados e altamente tóxicos
Método enzimático	Bromelina	Produto com elevada qualidade; Condições brandas de processo	Processo complexo; Elevado custo da maioria das enzimas; Dificuldade de aumentar para escala industrial.
	Pancreatina		
	Lisozima		
	Tripsina		
Método enzimático/ químico	Protease/ clorofórmio	Elevadas pureza e recuperação	Processo complexo; Elevado custo das enzimas; Utiliza solvente clorado de elevada toxicidade
	Alcalase/SDS/ EDTA		
Físico	Homogeneizador à alta pressão	Não utiliza produtos químicos;	Baixa recuperação;
		Pode ser aplicado em escala industrial	Possibilidade de degradação da massa molar e da formação de debris celulares muito finos que podem reduzir a pureza do bioproduto.
Físico/Químico	Moinho de bolas / Clorofórmio		Baixa recuperação;
			Processo com muitas variáveis interferentes;
			Dificuldade de ampliação de escala;
			Uso de solvente clorado.
	Homogeneizador à alta pressão/ Hipoclorito de sódio	Elevada pureza	Hipoclorito degrada a massa molar do polímero; Possibilidade de quebra das cadeias do polímero

9 Apêndice II - Vantagens e desvantagens gerais dos métodos de tratamento abordados na revisão bibliográfica

Métodos Químicos

Via solvente

- Altas taxas de recuperação e altas purezas;
- Possível recuperação do solvente;
- Procedimento simples;
- Bom custo-benefício;
- Toxicidade;
- Impacto ambiental e à saúde;
- Temperaturas moderadas de processo;
- Degradação do biopolímero;

Via digestão química

- Altas taxas de recuperação e altas purezas;
- Mais opções menos agressivas ao meio ambiente;
- Procedimento simples;
- Baixo custo;

Métodos Biológicos

Via digestão enzimática

- Processo de baixo custo;
- Podem aumentar os percentuais de pureza e recuperação com o uso combinado com outro método.
- Ambientalmente sustentável;
- Taxas de recuperação e purezas são mais baixas que dos processos com extração via solvente.
- Alto custo de algumas enzimas;
- Não há estudos sobre a recuperação das enzimas;

Métodos Mecânicos

Moinho de pellets de vidro

- Procedimento simples;
- Independe da concentração de biomassa;
- Alto custo inicial;
- Taxas de recuperação e pureza baixas;

Homogeneizador a alta pressão

- Procedimento simples;
- Boas taxas de recuperação e pureza quando combinado com método químico;
- Dificuldade no processamento;
- Alto custo;
- Eficiência depende da concentração da biomassa;

Outros métodos

- ✓ **Tratamento com fluido supercrítico;**
- ✓ **Irradiação com raios *gama*;**
- ✓ **Fragilidade ou modificação celular;**

- Todos os métodos citados acima foram testados como métodos de pré-tratamento / primeira etapa ao invés de métodos de recuperação de PHA;
- O pré-tratamento com raios *gama* modificou a massa molar do biopolímero obtido;
- Recuperações abaixo de 90 %.
- Custos altos (equipamentos ou técnicas);