

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

LUCI KELIN DE MENEZES QUINES

**EXTRAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO), PRODUZIDO  
POR CUPRIAVIDUS NECATOR, UTILIZANDO CARBONATO DE  
PROPILENO COMBINADO COM MÉTODOS MECÂNICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia M. F. Aragão

**Coorientador:** Prof. Dr. Willibaldo Schmidell

**Florianópolis, SC  
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Quines, Luci Kelin

EXTRAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO), PRODUZIDO POR  
CUPRIAVIDUS NECATOR, UTILIZANDO CARBONATO DE PROPILENO  
COMBINADO COM MÉTODOS MECÂNICOS / Luci Kelin Quines ;  
orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão ;  
coorientador, Willibaldo Schmidell. - Florianópolis, SC,  
2015.

239 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de  
Alimentos.. 3. Biopolímeros. 4. Extração e Recuperação de  
Biopolímeros. I. Falcão de Aragão, Gláucia Maria . II.  
Schmidell, Willibaldo. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. IV. Título.





***Dedico esta tese aos***

***Meus pais***

Pelo amor incondicional, compreensão, apoio e confiança.

***Meu marido***

Meu companheiro, pelo amor e paciência.

***Grupo PHB***

Pelo apoio em todos os momentos, aprendizado, companheirismo, amizade, paciência e carinho.



## ***Agradecimentos***

A Deus, tão presente na minha vida, minha confiança em ti me deu forças para prosseguir e não desistir dos meus objetivos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão, por todo aprendizado, apoio, paciência, carinho, ideias e incentivo que contribuíram para a realização deste trabalho. Você tem todo meu respeito, gratidão e admiração, tenho orgulho de ter sido orientada por você.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Willibaldo Schmidell, pela disponibilidade, por todos os ensinamentos e contribuição para a realização deste trabalho. Admiro a pessoa e o grande profissional que é, tenho orgulho de ter trabalhado com você.

À relatora desta tese, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Testa Pezzin (Univille), pela disponibilidade, colaboração na realização das análises de caracterização polimérica e ajuda de sempre.

Ao professor Marcelo Cristianine por disponibilizar o laboratório e o Homogeneizador à alta pressão para a realização de parte dos ensaios deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar este trabalho e pelas importantes contribuições.

À Jaciane por todo aprendizado e ajuda no início deste trabalho, deixo aqui registrado com muito carinho todo meu agradecimento e admiração.

À MéloDi pela amizade verdadeira, ajuda, troca de conhecimentos e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, que no abraço mais apertado e

silencioso me deu exatamente o carinho e conforto que precisava.

À Kellen, amiga do meu coração, por todo companheirismo, ajuda sem medir esforços, troca de experiências, carinho, por tornar meus dias mais felizes e por cada abraço dado, nos momentos bons e nos mais difíceis. Quero você sempre presente na minha vida.

Aos alunos de iniciação científica, Willian Ferreira Steffen, Lauren Bergmann Soares e Francielli Martinhago, meus orgulhos, obrigada pelo carinho, aprendizagem, comprometimento e dedicação para a realização deste trabalho. O crescimento e amadurecimento de cada um, para mim, foram o maior resultado desta tese. A ajuda de vocês foi indispensável na realização deste trabalho. Fico muito feliz por cada conquista de vocês.

Às minhas amigas amadas, Janaina e Mariana, pelo companheirismo, amizade e por me acolherem com tanto amor e carinho nas suas casas, na etapa de finalização desta tese.

Aos amigos Andréia, Dani, Jean e Wilzinho por toda amizade, carinho, conversas e momentos de alegria, que foram essências durante esses anos e tornaram meus dias no ENGEPIO mais felizes.

À Denise por todo cuidado e carinho de sempre.

Ao seu Zé por todos os cafés preparados com tanto amor e pelo carinho constante.

Aos colegas do ENGEPIO, por todo respeito, companhia, compreensão, ajuda e incentivo.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Às minhas amigas da vida que estão longe, mas que são tão presentes e me apoiam tanto, Aline, Carine, Caroline e Liliane.

À minha mãe, meu amor, pelo incentivo e apoio de sempre, por acreditar em mim e me deixar livre para conquistar meus sonhos.

Ao meu pai, amor tão presente no meu coração e minha maior saudade, que foi um exemplo de força e superação. Obrigada por me ensinar e incentivar a lutar sempre e não desistir dos meus objetivos.

À minha irmã por todo carinho, amizade, amor e por me dar os presentes mais lindos, meus sobrinhos, amores da minha vida. Obrigada pelo amor inocente e sincero e por fazerem a minha vida muito mais feliz.

Aos meus avós por toda ajuda, incentivo e amor.

Ao meu marido, meu amor, pela compreensão, paciência, ajuda e por ser meu companheiro. Obrigada por arrumar a casa, preparar o coração e esperar, com todo amor, eu conquistar meus objetivos e voltar para casa.

A todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada e compartilham das minhas conquistas comigo.



“Não desanimes. Persiste mais um tanto.  
Não cultives o pessimismo.  
Centraliza-te no bem a fazer.  
Segue adiante, mesmo varando  
a sombra dos próprios erros.  
Avança ainda que seja por entre lágrimas.  
Trabalha constantemente. Edifica sempre.  
Não te impressiones à dificuldade.  
Não desistas da paciência.  
Não creias em realização sem esforço.  
Não contes vantagens nem fracassos.  
Estuda buscando aprender.  
Não se voltes contra ninguém.  
Ama sempre, fazendo pelos outros  
o melhor que possas realizar.  
Age auxiliando. Serve sem apego.  
E assim vencerás.”

- Francisco Cândido Chavier -



## RESUMO

O objetivo deste trabalho é contribuir para o avanço do processo tecnológico de extração de P(3HB), obtido a partir de *Cupriavidus necator* DSM 545, com o desenvolvimento de um processo que combina a aplicação de método mecânico com o solvente carbonato de propileno. Este estudo está dividido em quatro partes. A primeira parte consiste no estudo da influência das variáveis de processo dos métodos mecânicos, ultrassom e homogeneizador à alta pressão, na recuperação e pureza do polímero extraído com carbonato de propileno (150 °C e tempo de contato células solvente de 45 min). Neste estudo as variáveis para aplicação de ultrassonificação foram potência e tempo do ciclo de aplicação e, na homogeneização à alta pressão foram pressão de operação e número de passagens da suspensão celular pelo equipamento. Os resultados demonstraram que, no método de extração que combina aplicação de homogeneizador à alta pressão e solvente, a melhor condição foi obtida com a pressão de 1300 bar e duas passagens pelo equipamento, pois foram obtidos os melhores resultados de recuperação de P(3HB) (97,7 %) com elevada pureza (97,8 %) e menor degradação da massa molar em relação às outras condições testadas. A extração com ultrassom e solvente também mostrou-se eficaz pois, na melhor condição de tratamento da biomassa com ultrassom, potência de 200 W e três ciclos de aplicação de 59 s, foi possível obter elevada recuperação polimérica (92,0 %) com pureza de 99,0 %. Com base nas condições de aplicação de ultrassom e homogeneização à alta pressão definidas anteriormente, na segunda parte deste estudo foi realizada a avaliação cinética da influência de variáveis do processo de extração: tratamento da biomassa (homogeneizador à alta pressão e ultrassom) para efeito comparativo realizaram-se também ensaios a partir de biomassas sem tratamento e tratadas termicamente, temperatura de extração (130 e 150 °C) e tempo de contato células/solvente (5, 15, 30 e 45 min) sobre a porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza do polímero extraído. Uma vez definido o melhor tratamento da biomassa a ser aplicado em conjunto com carbonato de propileno como método de extração de P(3HB) e, foi verificada a influência deste processo na massa molar do polímero extraído. O método de extração de P(3HB), que associa o tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão e recuperação polimérica com carbonato de propileno a 150 °C por 5 min, foi definido como o mais eficiente para obtenção de elevadas porcentagens de recuperação de P(3HB) (93,6 %) e pureza (99,0 %) em

um menor tempo de contato das células com o solvente, além da menor degradação da massa molar do polímero extraído. A terceira parte é referente ao estudo das variáveis do processo de homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno na recuperação, pureza e características do polímero extraído. Para este estudo, foram variadas as pressões de operação (500, 900, 1300 e 1500 bar), número de passagens (1, 2 e 3) e o tempo de contato das células com solvente (5 e 15 min). A melhor condição de extração foi obtida com a pressão de 900 bar e 5 min de contato das células com carbonato de propileno aquecido a 150 °C, pois foram obtidos elevados percentuais de recuperação de P(3HB) (97,8 %) com apenas uma passagem da biomassa pelo homogeneizador. Através da caracterização do polímero extraído na melhor condição, verificou-se que o mesmo apresentou características térmicas e de massa molar semelhantes aos polímeros (P(3HB)) comerciais. Por fim, a última parte desse trabalho está relacionada com o efeito da reutilização do carbonato de propileno, recuperado do processo de extração de P(3HB) sobre a porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza do biopolímero extraído e com a avaliação das perdas de solvente nas etapas do processo de extração. Foi observada a possibilidade de recuperar 80 % do carbonato de propileno no processo de extração do P(3HB). Sendo que dos 20 % de carbonato de propileno não recuperado, 5 % é referente à perda de solvente no processo de separação deste da água, sendo o restante proveniente de perdas nas etapas de filtração (11 %) e nos resíduos celulares (4 %). O solvente recuperado foi reutilizado por onze vezes sem perder a eficiência no rendimento e na pureza do polímero obtido. Assim, o conjunto de dados obtidos neste estudo é relevante para a melhoria do processo de extração de P(3HB) produzido por *C. necator*, pois propõe o desenvolvimento de um método de extração eficaz que combina homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno, solvente de baixa toxicidade que pode ser reutilizado no processo de extração, contribuindo para a redução dos custos de produção deste biopolímero, o que torna a extração de P(3HB) com este solvente mais competitiva no que se refere à economicidade do processo.

**Palavras chave:** Poli(3-hidroxiбутирато), *Cupriavidus necator*, extração, carbonato de propileno, homogeneizador à alta pressão.

## ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to the advancement on the technological process of P(3HB) extraction by *Cupriavidus necator* DSM 545, with the development of a process with the combination of a mechanical method and the solvent propylene carbonate. This study is divided into four parts. The first one was the study of the influence of the mechanical process variables using ultrasound and high pressure homogenizer, on the recovery and purity of the extracted polymer with propylene carbonate (150 °C during 45 min). In this study the variables were the power of applying ultrasonification and application time and in the high pressure homogenization method, the variables were the operating pressure and the cell suspension number of passages through the device. The results showed that, in the method that combines the homogenizer at high pressure and solvent, the best condition was obtained with 1300 bar and two passages, with the best recovery results of P (3HB) (97.7 %) with high purity (97.8 %) and lower molecular weight degradation against other conditions tested. The method with solvent and ultrasound was also effective, because using ultrasound with 200 W of potency and three 59 s application cycles, it was possible to obtain high polymer recovery (92 %) with purity of 99.0 %. Based on ultrasound application conditions and high pressure homogenization previously defined, the second part of this study was performed to evaluate the influence of kinetic extraction process variables: biomass treatment (homogenizer at high pressure and ultrasound, for comparison biomass thermally treated and untreated were performed); the extraction temperature (130 to 150 °C) and contact time cells/solvent (5, 15, 30 and 45 min). Once defined the best treatment of the biomass to be used with propylene carbonate, and its influence on the process, the molecular weight of the extracted polymer was verified. The P(3HB) extraction method combining the biomass treatment using high pressure homogenizer and propylene carbonate at 150 °C for 5 min, was the most efficient for achieving high recovery percentages P(3HB) (93.6 %) and purity (99.0 %) in a shorter time of contact of the cells with the solvent, in addition to less degradation of the molecular weight of the polymer. The third part relates the study of the process variables using high pressure homogenization and propylene carbonate on the purity and recovery of P(3HB) and at the characteristics of the extracted polymer. In this part of the work, different operating pressures (500, 900, 1300 and 1500 bar) and number of passages (1, 2 and 3) were tested as well

as the contact time between the cells and the solvent (5 and 15 min). The best performance was obtained by the combination of treatment with high-pressure homogenizer (900 bar) and extraction with propylene carbonate, during 5 min, at 150 °C, the recovery of P(3HB) was 97.8 % with only one biomass passage through the homogenizer. The characterization of the polymer extracted in the best condition, showed that it had thermal characteristics and molecular weight similar to the commercial P(3HB). The last part of this work related the effect of propylene carbonate reutilization on the percentage of recovery and purity of the extracted biopolymer and the evaluation of the solvent loss during the steps of the process. The ability to recover 80 % of propylene carbonate in the extraction process P(3HB) was observed. Since 20 % of unrecovered propylene carbonate, 5 % is related to the loss of solvent in the separation process of this water, the remainder being losses from filtration steps (11 %) and cellular debris (4 %). The recovered solvent was reused eleven times without losses in the yield and purity of the obtained polymer. Thus, the set of data from this study is relevant to improve the P(3HB) extraction process produced by *C. necator*, it proposes the development of an efficient extraction method that combines high pressure homogenization and propylene carbonate, a low toxicity solvent which can be reused in the extraction process, contributing to reduction of production costs of this biopolymer, which makes the extraction of P(3HB) with this solvent more competitive in respect to economy of the process.

**Keywords:** Poly(3-hydroxybutyrate), *Cupriavidus necator*, extraction, propylene carbonate, High pressure homogenization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estrutura molecular geral dos poli-hidroxicanoatos (PHAs), com $m = 1, 2, 3$ e $4$ , $n$ variando de 100 a milhares de unidades e $R$ variável .....	46
<b>Figura 1.2.</b> Aplicações para os PHAs produzidos por bactérias.....	55
<b>Figura 1.3.</b> Estratégias de processos de extração de PHA produzido por bactérias e a definição do método de extração que envolve todas as etapas do processo, desde o tratamento da biomassa para desestabilização e/ou rompimento da parede celular até a obtenção do biopolímero .....	59
<b>Figura 1.4.</b> Fórmula estrutural do carbonato de propileno (4-metil-1,3-dioxolan-2-ona) .....	66
<b>Figura 2.1.</b> Etapas envolvidas no processo de extração de P(3HB), produzido por <i>C. necator</i> , com carbonato de propileno a partir de biomassa bacteriana.....	100
<b>Figura 2.2.</b> Solução de carbonato de propileno e polímero após a primeira filtração do processo de extração.....	102
<b>Figura 2.3.</b> Suspensão de água, carbonato de propileno e P(3HB) sob agitação (A) e sem agitação (B) .....	103
<b>Figura 2.4.</b> Aparato utilizado na filtração para separação do P(3HB) da solução formada por água e solvente (A) e biopolímero extraído após a etapa de filtração e secagem (B).....	103
<b>Figura 2.5.</b> Homogeneizador à alta pressão Niro Soavi Panda 2K, modelo 1001 L, utilizado neste estudo.....	104
<b>Figura 2.6.</b> Suspensão celular após a etapa de homogeneização à pressão com 1, 2 e 3 passagens .....	105
<b>Figura 2.7.</b> Equipamento de ultrassom utilizado no tratamento da biomassa .....	106
<b>Figura 3.1.</b> Etapas envolvidas nos processos de extração de P(3HB) estudadas neste Capítulo: térmico, ultrassom, homogeneizador à alta pressão todos seguidos pela extração com carbonato de propileno (CP), além do controle apenas com o CP .....	122

- Figura 3.2.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno (controle) a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 73,0 % de P(3HB), sem tratamento ..... 127
- Figura 3.3.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 69,0 % de P(3HB), tratada com ultrassom ..... 128
- Figura 3.4.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 73,0 %, tratada termicamente ..... 129
- Figura 3.5.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de recuperação com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassas de *C. necator*, tratadas com homogeneizador. Extração de biomassa com 35 % de biopolímero (A e B); Extração de biomassa com 69,0 % de biopolímero (C) ..... 130
- Figura 3.6.** Recuperação de P(3HB), pureza, massa molar e índice de polidispersão em função do tempo de extração a 150 °C com: (A) método controle; (B) com o método sob alta pressão (1300 bar, 2 passagens) e carbonato de propileno. Os dados de porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza correspondem à média de dois ensaios de extração e os respectivos desvios médios estão representados pelas barras de erro ..... 135
- Figura 4.1.** Homogeneizador à alta pressão Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália) utilizado neste estudo ..... 144
- Figura 4.2.** Solução de P(3HB) e solvente após a primeira filtração (A) (tempo de repouso), e suspensão de P(3HB), água e solvente sob agitação (B) (tempo de agitação) ..... 146
- Figura 4.3.** Espectro de FTIR para as amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio, carbonato de propileno (controle), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich ..... 154
- Figura 4.4.** Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, das amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio (a), carbonato de propileno (controle) (b), homogeneizador à alta pressão e carbonato de

propileno (c), e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial (d) e Sigma-Aldrich (e) ..... 158

**Figura 4.5.** Curvas de DSC para as amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio (a), carbonato de propileno (controle) (b), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno (c), e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial (d) e Sigma-Aldrich (e)..... 162

**Figura 5.1.** Resultados de rendimento de recuperação de carbonato de propileno (CP), obtidos nos ensaios realizados com solvente puro (■) e com CP recuperado no processo de extração (●). Os dados de rendimento de recuperação de CP após extração do polímero correspondem a uma média de dois ensaios e os respectivos desvios médios estão representados pelas barras ..... 179

**Figura A.1.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno ..... 223

**Figura A.2.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 3 passagens, e carbonato de propileno ..... 224

**Figura A.3.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1200 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno ..... 225

**Figura B.1.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 5 min ..... 226

**Figura B.2.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 15 min ..... 227

**Figura B.3.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 30 min ..... 228

<b>Figura B.4.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 45 min .....	229
<b>Figura B.5.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 5 min.....	230
<b>Figura B.6.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 15 min.....	231
<b>Figura B.7.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 30 min.....	232
<b>Figura B.8.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 45 min.....	233
<b>Figura C.1.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 900 bar e 1 passagem, e carbonato de propileno a 150 °C por 5 min.....	234
<b>Figura C.2.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 12 h e 12 h, respectivamente.....	235
<b>Figura C.3.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 0 h e 12 h, respectivamente.....	236
<b>Figura C.4.</b> Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 0,5 h e 0,5 h, respectivamente.....	237

**Figura C.5.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 0 h e 0,5 h, respectivamente ..... 238

**Figura D.1.** Curvas de TGA da amostra de P(3HB) extraída com carbonato de propileno (não reutilizado) puro ..... 239

**Figura D.2.** Curvas de TGA da amostra de P(3HB) extraída com carbonato de propileno reutilizado 11 vezes ..... 239



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1.** Comparação das propriedades do P(3HB) com as do PP ..51
- Tabela 2.1.** Condições dos ensaios de ultrassom com variação da potência, do tempo do pulso de ultrassom em um volume de suspensão celular de 35 mL. Em cada ensaio foram realizados três ciclos de aplicação do ultrassom na suspensão celular..... 107
- Tabela 2.2.** Recuperação, pureza, massa molar (Mw) e índice de polidispersão (IP) de P(3HB) obtidos na extração com homogeneizador à alta pressão e solubilização com carbonato de propileno, com variação da pressão de operação e do número de passagens da biomassa pelo equipamento, e resultados de recuperação e pureza para a extração controle. Os dados de recuperação e pureza correspondem a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios ..... 111
- Tabela 2.3.** Recuperação e pureza de P(3HB) extraído com ultrassom e carbonato de propileno, variando-se a potência e o tempo de aplicação do ultrassom, comparado ao método de extração controle. Em cada ensaio foram realizados três ciclos de aplicação do ultrassom na suspensão celular. Os dados de recuperação e pureza obtidos com a extração controle correspondem a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios ..... 115
- Tabela 4.1.** Tempos de repouso e agitação das etapas do processo de extração de P(3HB) com carbonato de propileno..... 146
- Tabela 4.2.** Recuperação e pureza para polímeros extraídos com o método controle e com homogeneizador à alta pressão, em diferentes pressões e número de passagens, e carbonato de propileno, a 150°C e tempos de contato das células com solvente de 5 e 15 min. Ensaios realizados em duplicata, onde os dados de recuperação e pureza correspondem à média dos ensaios com os respectivos desvios médios ..... 150
- Tabela 4.3.** Bandas características no espectro de FTIR para os P(3HB) extraídos pelos diferentes métodos, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, controle, clorofórmio e das amostras de P(3HB) comerciais, comparadas com a literatura ..... 156

**Tabela 4.4.** Dados de temperatura de início de degradação (Ti), temperatura máxima de degradação (Tp) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA das amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes métodos, clorofórmio, carbonato de propileno, homogeneizador e carbonato de propileno e dos polímeros comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich ..... 157

**Tabela 4.5.** Dados de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm) e porcentagem de cristalinidade (Xc) obtidos para as amostras de P(3HB) extraído com os diferentes métodos e para os polímeros (P(3HB)) comerciais ..... 163

**Tabela 4.6.** Dados de massa molar (Mw) e de índice de polidispersão (IP) para o polímero extraído com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, juntamente com as amostras de P(3HB) comerciais (dados reportados da literatura) ..... 165

**Tabela 4.7.** Resultados obtidos para recuperação polimérica, pureza e massa molar ponderal média (Mw) do P(3HB) extraído com carbonato de propileno com variação nos tempos de repouso (Tr) e agitação (Ta). Os dados de recuperação e pureza correspondem a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios ..... 168

**Tabela 5.1.** DL<sub>50</sub> aguda (ratos) para alguns solventes empregados no processo de extração de PHAs a partir de microrganismos ..... 173

**Tabela 5.2.** Resultados de porcentagens de perdas de solvente nas etapas de filtração do processo de extração de P(3HB) (Pf (%)) Eq. 5.5) e perdas de solvente que permanece nas células após a primeira filtração (Pcel (%)) Eq. 5.6)..... 181

**Tabela 5.3.** Resultados de recuperação e pureza de P(3HB) nas extrações realizadas a cada recuperação do carbonato de propileno (11 vezes). Os dados correspondem a uma média de dois ensaios e os respectivos desvios médios ..... 182

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.1.** Possibilidades de aplicações de P(3HB) de acordo com sua massa molar.....57

**Quadro 1.2.** Vantagens e desvantagens de métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.) ..... 85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG – cromatografia gasosa

CP – carbonato de propileno

DSC – calorimetria exploratória diferencial

FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

GPC – cromatografia de permeação em gel

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IP – índice de polidispersão

$m_f$  – massa de P(3HB) obtido após a extração (g)

$m_i$  – massa total de P(3HB) nas células antes da extração (g)

$M_n$  – massa molar numérica média (Da)

$m_p$  – massa de P(3HB) puro (g)

$m_{P(3HB)}$  – massa de biopolímero detectada por cromatografia (g)

$m_t$  – massa do material extraído utilizado para análise cromatográfica (g)

$M_w$  – massa molar ponderal média (Da)

P(3HB) – poli(3-hidroxibutirato)

P(3HB-*co*-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)

P<sub>cel</sub> – perda de solvente aderido nos resíduos celulares (%)

P<sub>f</sub> – perda de solvente nas etapas de filtração do processo (%)

PHALCL – poli-hidroxialcanoatos de cadeia longa

PHAMCL – poli-hidroxialcanoatos de cadeia média

PHAs – polihidroxialcanoatos

PHASCL – poli-hidroxialcanoatos de cadeia curta

PLA – poli(ácido L-lactíco)

PP – polipropileno

P<sub>pex</sub> – perda de solvente no processo de extração de P(3HB) (%)

PS - poliestireno

P<sub>sp</sub> – perda de solvente apenas na etapa de recuperação deste (%)

R<sub>f</sub> – rendimento de recuperação de solvente após as etapas de filtração (%)

R<sub>s</sub> – rendimento de recuperação de solvente após extração (%)

R<sub>sp</sub> – rendimento de recuperação de solvente (%)

Tg – temperatura de transição vítrea (°C)

TGA – análise termogravimétrica

THF - tetraidrofurano

Ti – temperatura de início de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ) (°C)

Tm – temperatura de fusão (°C)

Tp – temperatura máxima de degradação (°C)

UV – ultravioleta

$V_A$  – volume de carbonato de propileno puro a ser adicionado a cada nova extração com solvente recuperado (mL)

$V_i$  – volume de carbonato de propileno utilizado na extração (mL)

$V_r$  – volume de carbonato de propileno recuperado (mL)

$X_c$  – grau de cristalinidade (%)

$\Delta H^{\circ m}$  – entalpia de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $J g^{-1}$ )

$\Delta H_c$  – entalpia de cristalização do polímero ( $J g^{-1}$ )

$\Delta H_m$  – entalpia de fusão ( $J g^{-1}$ )

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....</b>	<b>35</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>45</b>
1.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAS).....	45
1.1.1 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P(3HB)).....	47
1.1.1.1 <i>Cupriavidus necator</i> .....	48
1.2 PROPRIEDADES DOS PHAS.....	50
1.3 APLICAÇÃO DE PHA.....	52
1.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS.....	62
1.4.1.1 Solvente.....	62
1.4.1.2 Digestor químico.....	67
1.4.1.3 Digestor químico e solvente.....	70
1.4.1.4 Fluido supercrítico.....	72
1.4.2 MÉTODOS FÍSICOS.....	73
1.4.2.1 Homogeneizador à alta pressão.....	74
1.4.2.2 Ultrassom.....	76
1.4.2.3 Moinho de bolas.....	77
1.4.3 MÉTODOS COMBINADOS FÍSICO (MECÂNICO) E QUÍMICO.....	78
1.4.3.1 Homogeneizador à alta pressão e digestor químico.....	78
1.4.3.2 Prensa francesa e digestor químico.....	79
1.4.3.3 Moinho de bolas e solvente.....	79
1.4.3.4 Ultrassom e solvente.....	80
1.4.4 MÉTODO BIOLÓGICO.....	80
1.4.5 MÉTODOS COMBINADOS BIOLÓGICO E QUÍMICO.....	82
1.4.5.1 Enzimas e digestor químico.....	82
1.4.5.2 Enzimas e solvente.....	83
1.4.6 MÉTODO COMBINADO FÍSICO, BIOLÓGICO E QUÍMICO ( ENZIMAS, HOMOGENEIZADOR À ALTA PRESSÃO E DIGESTOR QUÍMICO).....	83
1.4.7 SÍNTESE DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PHAS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS.....	84
1.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS.....	90
1.5.1 DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLAR.....	90

1.5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	91
1.5.3 ANÁLISES TÉRMICAS.....	92
1.5.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA) .....	92
1.5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	93
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94

**INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO DOS MÉTODOS MECÂNICOS NA RECUPERAÇÃO E PUREZA DO POLÍMERO EXTRAÍDO .....97**

2.1 INTRODUÇÃO.....	98
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	99
2.2.1 BIOMASSA.....	99
2.2.2 EXTRAÇÃO DE P(3HB).....	99
2.2.2.1 Extração com carbonato de propileno (controle).....	101
2.2.2.2 Extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno .....	104
2.2.2.2.1 Tratamento da biomassa com homogeneizador.....	104
2.2.2.2.2 Recuperação de P(3HB) .....	105
2.2.2.3 Extração com ultrassom e carbonato de propileno .....	105
2.2.2.3.1 Tratamento da biomassa com ultrassom.....	105
2.2.2.3.2 Recuperação de P(3HB) .....	107
2.2.3 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	108
2.2.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DE P(3HB) .....	109
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	110
2.3.1 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE HOMOGENEIZAÇÃO NA EXTRAÇÃO COM ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO .....	110
2.3.2 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA EXTRAÇÃO COM ULTRASSOM E CARBONATO DE PROPILENO.....	115
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	117

**AVALIAÇÃO CINÉTICA DA INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS DE PROCESSO DE EXTRAÇÃO SOBRE A RECUPERAÇÃO, PUREZA E MASSA MOLAR DO POLÍMERO EXTRAÍDO..... 119**

3.1 INTRODUÇÃO .....	120
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	121
3.2.1 BIOMASSA.....	121
3.2.2 EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM DIFERENTES TRATAMENTOS DA BIOMASSA .....	122
3.2.2.1 Tratamento da biomassa.....	123
3.2.2.1.1 Tratamento térmico da biomassa.....	123
3.2.2.1.2 Tratamento da biomassa com ultrassom .....	123
3.2.2.1.3 Tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão ...	124
3.2.2.2 Estudo cinético da recuperação de P(3HB).....	124
3.2.3 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	125
3.2.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DE P(3HB) .....	125
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
3.3.1 ENSAIOS CINÉTICOS DE EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM DIFERENTES TRATAMENTOS DA BIOMASSA .....	125
3.3.2 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM HOMOGENEIZADOR À ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO NA MASSA MOLAR POLIMÉRICA.....	134
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	139

**ESTUDO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE HOMOGENEIZAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO NA RECUPERAÇÃO, PUREZA E CARACTERÍSTICAS DO POLÍMERO EXTRAÍDO .....**

<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>142</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2.1 BIOMASSA.....</b>	<b>143</b>
<b>4.2.2 EXTRAÇÃO COM HOMOGENEIZADOR À ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2.2.1 Tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2.2.2 Recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno.....</b>	<b>144</b>
<b>4.2.3 EXTRAÇÃO COM CARBONATO DE PROPILENO (CONTROLE).....</b>	<b>145</b>
<b>4.2.4 EXTRAÇÃO COM CLOROFÓRMIO .....</b>	<b>145</b>

4.2.5 AVALIAÇÃO DOS TEMPOS DE REPOUSO E AGITAÇÃO NA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E NA MASSA MOLAR DE P(3HB) EXTRAÍDO COM CARBONATO DE PROPILENO.....	145
4.2.6 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	147
4.2.7 CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB) .....	147
4.2.7.1 Identificação do polímero por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	148
4.2.7.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	148
4.2.7.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	148
4.2.7.4 Determinação da massa molar de P(3HB).....	149
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	149
4.3.1 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE HOMOGENEIZAÇÃO NA EXTRAÇÃO COM ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO.....	149
4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DO P(3HB) EXTRAÍDO COM CARBONATO DE PROPILENO.....	153
4.3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	154
4.3.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	157
4.3.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	161
4.3.2.4 Determinação da massa molar de P(3HB).....	165
4.3.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE REPOUSO NA RECUPERAÇÃO E NA MASSA MOLAR DE P(3HB) EXTRAÍDO COM CARBONATO DE PROPILENO.....	167
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	169

**RECUPERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO CARBONATO DE PROPILENO EMPREGADO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE P(3HB)..... 171**

5.1 INTRODUÇÃO.....	172
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	174
5.2.1 EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM CARBONATO DE PROPILENO.....	174
5.2.2 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	175
5.2.3 RECUPERAÇÃO DO CARBONATO DE PROPILENO.....	175
5.2.3.1 Recuperação do carbonato de propileno após extração polimérica.....	175

5.2.3.2 Recuperação do carbonato de propileno puro (controle).....	177
5.2.3.3 Recuperação do carbonato de propileno após etapas de filtração na extração de P(3HB).....	177
5.2.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	178
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	179
5.3.1 RECUPERAÇÃO DO CARBONATO DE PROPILENO APÓS EXTRAÇÃO POLIMÉRICA.....	179
5.3.2 RECUPERAÇÃO E PUREZA DE P(3HB) EXTRAÍDO COM CARBONATO DE PROPILENO REUTILIZADO.....	181
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	184
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>221</b>
ANEXO I.....	223
ANEXO II.....	226
ANEXO III.....	234



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

**Extração de poli(3-hidroxiacetato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos**

### Por quê?

- Não há trabalhos na literatura que apliquem os métodos mecânicos, ultrassom e homogeneizador à alta pressão, em conjunto com carbonato de propileno, um solvente de baixa toxicidade, para a extração de poli(3-hidroxiacetato) (P(3HB)).
- A maioria dos trabalhos de extração de P(3HB), produzido por bactéria, utilizam solventes e digestores de elevada toxicidade. O presente trabalho pretende contribuir com informações sobre o processo de extração de P(3HB) combinando a aplicação de método mecânico, para romper a biomassa e facilitar a ação do solvente na recuperação polimérica, com carbonato de propileno.

### Quem já fez?

- Não há trabalhos que utilizem os métodos mecânicos de extração, ultrassom e homogeneizador de alta pressão, em conjunto com carbonato de propileno para extração de P(3HB). No entanto, estudos com aplicação destes métodos mecânicos em conjunto com outros solventes e digestores químicos são relatados na literatura e se mostram eficientes.

### Hipóteses

- A adição da etapa de tratamento mecânico da biomassa pode facilitar a ação do solvente na etapa de recuperação polimérica, permitindo assim, reduzir o tempo de contato das células com o solvente sob aquecimento e, conseqüentemente, reduzir a diminuição da massa molar do polímero.
- Possibilidade de apontar o tratamento mecânico mais eficiente para ser utilizado em conjunto com carbonato de propileno (dentre os métodos estudados) na extração de P(3HB) e ainda, verificar a sua influência nas características do polímero extraído.
- Possibilidade de recuperação do carbonato de propileno após o processo de extração de P(3HB) com a obtenção de alto rendimento de recuperação, devido ao seu alto ponto de ebulição, e de reutilização no processo de extração de P(3HB) sem perder sua eficiência na recuperação do biopolímero.

### **Método experimental**

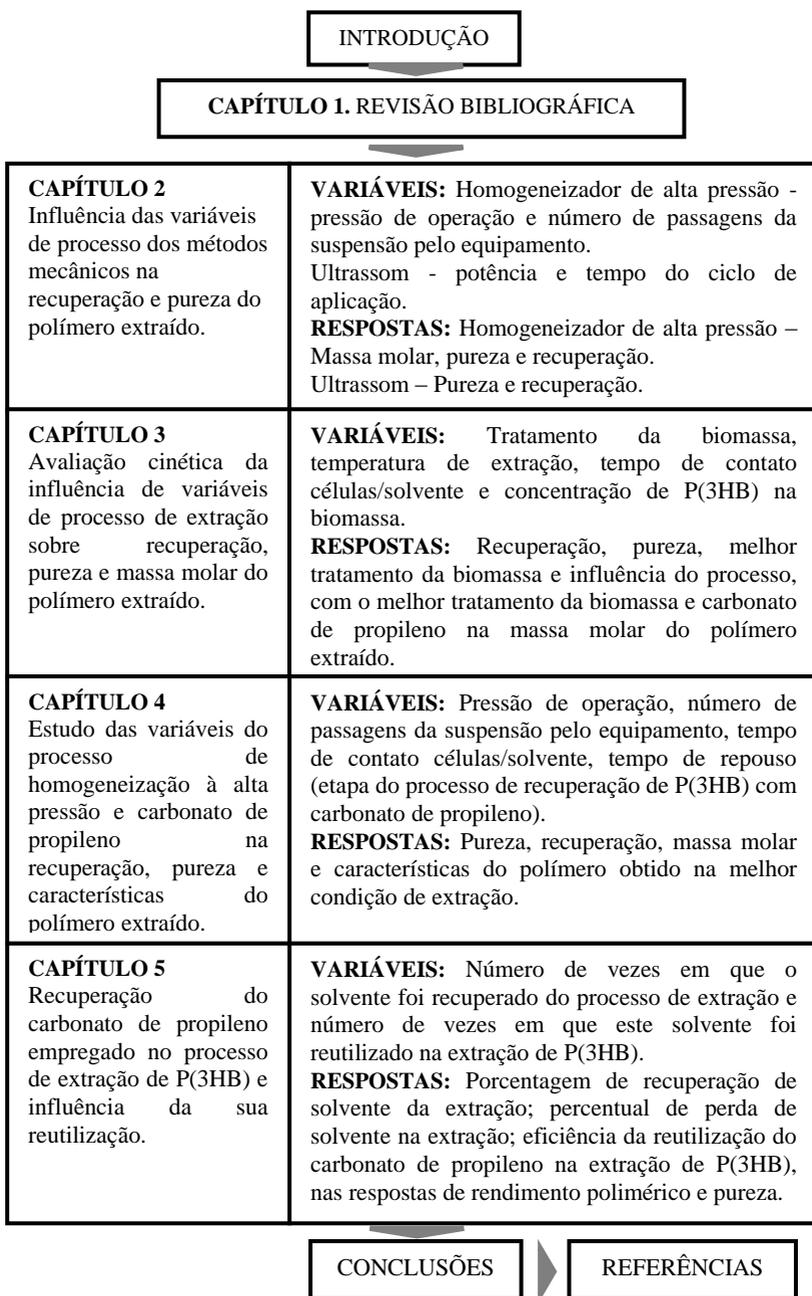
- Tratamento da biomassa com diferentes métodos (térmico, ultrassom e homogeneizador à alta pressão).
- Recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno.
- Ensaios cinéticos de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno.
- Determinação de P(3HB) (para a obtenção dos percentuais de recuperação e pureza).
- Ensaios de recuperação de solvente após o processo de extração e de reutilização deste neste processo.
- Caracterização do P(3HB) a partir das seguintes análises: FTIR, DSC, TGA e GPC.

### **Respostas**

- Definição do melhor tratamento mecânico da biomassa (dentre os estudados) para ser aplicado combinado com carbonato de propileno para extração de P(3HB) e determinação das variáveis de processo do tratamento mecânico escolhido.
- Influência do método de extração de P(3HB) com método mecânico e carbonato de propileno nas características do biopolímero obtido.
- Eficiência da reutilização do carbonato de propileno no processo de extração de P(3HB).

Para estruturar os conteúdos e apresentar os temas tratados em uma sequência lógica, este trabalho foi estruturado conforme disposto na Figura 1. Os capítulos dois, três, quatro e cinco foram subdivididos em introdução, material e métodos, resultados e discussão e considerações finais.

**Figura 1.** Organograma do documento de tese.





## INTRODUÇÃO

Os polímeros destacam-se como a segunda maior demanda dentre os derivados do petróleo, recurso natural não renovável. Devido ao fato dos plásticos petroquímicos demorarem cerca de 100 a 400 anos para serem degradados, estes acabam propiciando um grande acúmulo de resíduos no ambiente, o que tende a impactá-lo negativamente. Assim, deve-se pensar numa maneira sustentável de produzir, utilizar e descartar objetos de plástico, visando minimizar os impactos negativos desses materiais (SILVA *et al.*, 2007; TELLES; SARAN; TREVISOLLI, 2011; GUMEL; ANNUAR ; CHISTI, 2012).

Em resposta à preocupação crescente com o ambiente, plásticos biodegradáveis têm sido amplamente estudados, a fim de competir com os de origem petroquímica (MANANGAN; SHAWAPHUN, 2010). Dentre esses, destaca-se o poli(3-hidroxi butirato) (P(3HB) (integrante da família dos poli-hidroxi alcanoatos (PHAs)), que se caracteriza por sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e algumas propriedades térmicas e mecânicas próximas às do polipropileno (MADISON; HUISMAN, 1999; BENGTTSSON *et al.*, 2010), podendo ainda, ser produzido por diversos microrganismos a partir de fontes renováveis de carbono. Dentre os microrganismos, *Cupriavidus necator* é uma das bactérias que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial de P(3HB) (RAMSAY, 1994).

Apesar da ampla faixa de aplicações e das características relevantes do P(3HB), sua utilização em embalagens de alimentos, na área farmacêutica e outras aplicações é limitada devido ao seu elevado custo em relação aos plásticos petroquímicos. Neste sentido, para se tornarem comercialmente competitivos com os plásticos petroquímicos, há a necessidade de redução dos custos de produção dos PHAs e que suas características sejam semelhantes e/ou superiores às apresentadas pelos plásticos convencionais ou que suas aplicações possam estar vinculadas a produtos de alto valor agregado, como o uso em aplicações médicas, por exemplo (PENLOGLOU *et al.*, 2010).

Por se tratar de um produto intracelular, o P(3HB) deve ser extraído das células, ao término do cultivo, utilizando-se métodos de extração. Neste contexto, vários métodos de extração de PHAs têm sido reportados na literatura. Estes incluem a extração com solventes, digestão química, digestão enzimática, extração mecânica com homogeneizador à alta pressão e ultrassom, extração com fluido supercrítico ou, ainda, a aplicação destes métodos combinados (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; YANG *et al.*, 2011; RIEDEL *et al.*, 2012; NEVES; MÜLLER, 2012).

Uma etapa de tratamento da biomassa celular pode ser inserida no início do processo de extração e tem por finalidade desestabilizar e/ou romper a parede celular da bactéria e facilitar a ação do solvente no processo de extração, melhorando assim a recuperação do polímero a ser extraído (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; JACQUEL *et al.*, 2008; FIORESE *et al.*, 2009; MADKOUR *et al.*, 2013).

Os métodos químicos de extração de PHAs, que fazem uso de solventes e digestores, são extensivamente utilizados por proporcionar altos percentuais de recuperação de PHAs (DALCANTON, 2006; MANANGAN; SHAWAPHUN, 2010; RIEDEL *et al.*, 2012). A maioria dos estudos realizados com métodos químicos faz uso de solventes, digestores tóxicos e altamente voláteis, sendo contraditórios ao fato de que estes polímeros são amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009). Dentre os solventes orgânicos que podem ser utilizados, Lafferty e Heinzle (1979) propuseram a utilização do carbonato de propileno para a recuperação de P(3HB) devido à sua baixa toxicidade e temperatura de ebulição próxima a 240 °C. Estas características permitem que, durante o processamento, ocorra baixo risco de perda desse solvente por evaporação, possibilitando ainda sua reutilização, minimizando assim, os custos de produção (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009).

Adicionalmente, os métodos mecânicos (moinho de bolas, ultrassom, homogeneizador à alta pressão) são uma alternativa relevante para a extração de PHAs, pois não exigem a inserção de produtos

químicos ao processo. Contudo, os resultados de recuperação polimérica obtidos são inferiores aos encontrados nos demais métodos (TAMER; MOO-YOUNG, 1998b; GARCIA, 2006). Os métodos mecânicos podem ter sua eficácia aumentada quando combinados aos químicos, pois são aplicados como tratamento da biomassa anterior à aplicação de digestores químicos e solventes. A combinação de métodos de extração possui potencial neste contexto, pois facilita o rompimento da parede celular, a recuperação polimérica e muitas vezes, reduz o tempo de processo, bem como a aplicação de produtos químicos tóxicos (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; GARCIA, 2006; NEVES; MÜLLER, 2012; PENLOGLOU *et al.*, 2012).

Em trabalho anterior realizado no nosso grupo de pesquisa (QUINES, 2010), avaliou-se a aplicação de tratamento térmico na biomassa anterior à recuperação polimérica com carbonato de propileno como método de extração de P(3HB), com objetivo de obter elevada recuperação de P(3HB), com pureza elevada. Os resultados de recuperação (98 %) e pureza (99 %) mais elevados foram obtidos com temperatura de extração de 150 °C, tempo de contato das células com solvente de 45 min e relação células/solvente de 0,15 g mL<sup>-1</sup>. Ao aplicar o tratamento térmico na biomassa, uma vez que o produto é intracelular, tem-se uma desestabilização da parede celular, o que facilita a ação do solvente na etapa de recuperação polimérica. Desta forma, estudos de tratamentos da biomassa aplicados em conjunto com solventes mostram-se relevantes para proporcionar aumento de recuperação de P(3HB) após o processo de extração.

As estratégias de extração de PHAs reportadas na literatura indicam que a maioria dos métodos visa, sobretudo, a obtenção de elevados percentuais de recuperação e pureza de biopolímero. No entanto, é imprescindível a realização de estudos que relacionem os métodos de extração com a eficiência do processo e com a sua influência na qualidade do produto final (massa molar, por exemplo), uma vez que estas características estão diretamente relacionadas às futuras aplicações do polímero, bem como ao tempo de degradação do mesmo quando descartado.

Por essas razões, na etapa de extração busca-se: reduzir as perdas de produto, obter um produto de elevada pureza e com suas características físicas e térmicas preservadas, obter um produto que se enquadre no termo “sustentável”, do qual se utilize produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente, reduzir custos de processo pela reutilização dos produtos químicos (solventes e não solventes) e desenvolver um processo possível de ser aplicado em escala comercial. Neste trabalho, foi avaliada a aplicação de métodos mecânicos, ultrassom e homogeneizador à alta pressão, em conjunto com carbonato de propileno para a extração de P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator*.

## Objetivos

O objetivo central deste trabalho foi contribuir para o avanço do processo tecnológico de extração de P(3HB), obtido a partir de *Cupriavidus necator* DSM 545, com o desenvolvimento de um processo que combina a aplicação de método mecânico com carbonato de propileno.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar a influência da utilização de homogeneizador à alta pressão e ultrassom, no tratamento da biomassa de *Cupriavidus necator*, na recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno, sobre os valores de pureza e recuperação de biopolímero extraído;
- Estabelecer o melhor tratamento da biomassa para ser aplicado em conjunto com carbonato de propileno no processo de extração de P(3HB) e avaliar a influência deste na massa molar do polímero extraído;
- Estudar a influência das variáveis do processo de homogeneização à alta pressão com carbonato de propileno sobre a recuperação de biopolímero extraído e definir as

melhores condições de extração. Ainda, avaliar a influência do método de extração proposto na qualidade do P(3HB) extraído (na melhor condição), através de sua caracterização;

- Estudar a influência dos tempos de repouso e agitação do processo de extração com carbonato de propileno nos resultados de recuperação de P(3HB), pureza e massa molar do polímero extraído;
- Verificar a eficiência da reutilização do carbonato de propileno recuperado do processo de extração de P(3HB), considerando o rendimento e pureza do biopolímero extraído, além de avaliar as perdas do solvente nas etapas do processo.



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo aborda os tópicos de aspectos gerais da produção de poli-hidroxicanoatos (PHAs), características dos PHAs e suas aplicações, estratégias de processos de extração de PHAs, produzidos por bactérias, que envolvem desde o tratamento de desestabilização e/ou rompimento celular, recuperação e purificação do biopolímero e técnicas de caracterização de PHAs.

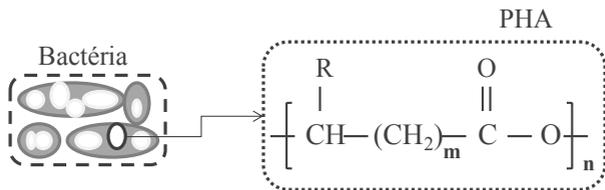
### 1.1 Poli-hidroxicanoatos (PHAs)

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros biodegradáveis que podem ser produzidos por inúmeros microrganismos como forma de reserva energética e de carbono, podendo ser sintetizados a partir de matérias primas renováveis (BYRON, 1987; ANDERSON; DAWES, 1990). Dependendo do substrato utilizado e do metabolismo do microrganismo, diferentes polímeros e copolímeros podem ser obtidos (SQUIO; ARAGÃO, 2004).

A estrutura dos PHAs é apresentada na Figura 1.1. Estes polímeros são classificados de acordo com o número de átomos de carbono que compõe o grupo funcional R. Mais de 150 diferentes unidades monoméricas são identificadas como constituintes dos PHAs, fazendo com que diferentes tipos de polímeros sejam criados aumentando a gama de utilizações deste material (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013).

Na Figura 1.1 o valor de “n” representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero que podem variar de 100 a 30.000. Este valor está diretamente relacionado à massa molar do polímero e, conseqüentemente, às suas propriedades físicas (LEE, 1996).

**Figura 1.1.** Estrutura molecular geral dos poli-hidroxicanoatos (PHAs), com  $m = 1, 2, 3$  e  $4$ ,  $n$  variando de 100 a milhares de unidades e  $R$  variável.



m	R		
1	—CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi butirato)	P(3HB)
	—H	Poli(3-hidroxi propionato)	P(3HP)
	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi valerato)	P(3HV)
	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi hexanoato)	P(3HX)
	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> —CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi octanoato)	P(3HO)
	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> —CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi decanoato)	P(3HD)
—CH <sub>2</sub> —		Poli(3-hidroxi-5-fenil valerato)	P(3HPV)
2	—H	Poli(4-hidroxi butirato)	P(4HB)
	—CH <sub>3</sub>	Poli(4-hidroxi valerato)	P(4HV)
3	—H	Poli(5-hidroxi butirato)	P(5HB)
	—CH <sub>3</sub>	Poli(5-hidroxi valerato)	P(5HV)
4	Hexil	Poli(6-hidroxi dodecanoato)	P(6HD)

**Fonte:** Adaptado de Shrivastav, Kim e Kim (2013).

Os PHAs são classificados em três grupos dependendo do número de átomos de carbono nas unidades monoméricas: PHAs constituídos por unidades de ácidos hidroxicarboxílicos de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub>), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono, os PHAs constituídos por unidades de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub>), apresentando de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia e

os de cadeia longa com mais de 15 átomos de carbono (PHA<sub>LCL</sub>) (STEINBUCHER *et al.*, 1992).

Em condições de excesso de nutrientes (fontes de carbono), e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação celular (N, P, Mg, Fe, O<sub>2</sub>), muitos microrganismos normalmente assimilam estes nutrientes e os armazenam. As fontes de carbono assimiladas são bioquimicamente transformadas em unidades de hidroxialcanoatos, polimerizadas e armazenadas na forma de inclusões insolúveis (grânulos) em água, no citoplasma da célula, como um composto de armazenamento de carbono e energia (RAMSAY, 1994).

A capacidade de realizar a polimerização é dependente da presença da enzima PHA sintase. O polímero é acumulado dentro das células bacterianas em forma de grânulos, atingindo até cerca de 80 % de sua massa em base seca (BASTIOLI, 2005). Sua composição depende de condições de cultivo, do microrganismo utilizado e da natureza da fonte de carbono (ARAGÃO *et al.*, 1996; REDDY; GHAI; KALIA, 2003; BASSAS *et al.*, 2006).

Dentre os PHAs, o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e seu copolímero o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) são os biopolímeros mais estudados, apresentando, além de alto grau de biodegradabilidade, propriedades termoplásticas e mecânicas semelhantes às do polipropileno (RAMSAY, 1994; LEE, 1996; MADISON; HUISMAN, 1999; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

### **1.1.1 Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB))**

O P(3HB) foi o primeiro PHA estudado (LEMOIGNE, 1926). É um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, sendo um poliéster natural e biodegradável, sintetizado e acumulado no interior de diferentes bactérias como grânulos intracelulares (inclusões insolúveis em água), com diâmetro de 100 a 800 nm (ANDERSON; DAWES, 1990; BRAUNEGG; LEFEBYRE; GENSER, 1998; TSUGE, 2002).

O acúmulo de P(3HB), na forma de grânulos, no citoplasma de alguns gêneros de bactérias, geralmente ocorre quando há excesso da fonte carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação celular. Esta síntese ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Na segunda etapa, interrompe-se o crescimento celular (através da limitação de um nutriente essencial) e estimula-se ao máximo o acúmulo do polímero no interior da célula com excesso da fonte de carbono (ARAGÃO *et al.*, 1996; TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005).

Os microrganismos mais estudados para a síntese de PHAs são as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. Alguns fatores como habilidade para utilizar fontes de carbono de baixo custo, velocidades de crescimento e síntese de polímero, e elevada produtividade, devem ser levados em consideração na escolha do microrganismo (LEE; CHANG, 1995).

Os microrganismos utilizados na síntese de PHAs são divididos em dois grupos, o primeiro grupo é constituído pelos microrganismos que requerem limitação de um nutriente como N, P, Mg, K, O ou S para produção de PHAs. A bactéria mais estudada pertencente a esse grupo é a *Cupriavidus necator*. O segundo grupo de bactérias não requer a limitação de nutrientes para a síntese de biopolímeros, com a fase de produção associada à de crescimento. Nesse grupo estão *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes vinelandi* recombinante, *Azotobacter* e *Escherichia coli* recombinante (KRANZ *et al.*, 1997; WRÓBEL; ZEBROWSKI; SZOPA, 2004; YEZZA *et al.*, 2006; THEODOROU; THEODOROU; KYRIAKIDIS, 2011; BALAJI; GOPI; MUTHUVELAN, 2013).

#### **1.1.1.1 *Cupriavidus necator***

*Cupriavidus necator* é uma bactéria procariótica, Gram-negativa, naturalmente encontrada no solo e águas. Sendo o microrganismo mais estudado para a produção de PHAs por apresentar elevada velocidade de crescimento e acumular grande quantidade de

biopolímero (acima de 80 % da massa seca) (KIM *et al.*, 1994). Antes de ser classificada com este nome, ela foi descrita como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VANDAMME; COENYE, 2004).

A síntese de P(3HB) por *C. necator* ocorre a partir de acetil-CoA que entra na via dos ácidos tricarbóxicos (TCA), em crescimento sem limitação, ou pela via de síntese de P(3HB) com excesso da fonte de carbono e limitação de um nutriente essencial (ANDERSON; DAWES, 1990; TEKIN; ATES; KAHRAMAN, 2012).

A biossíntese de P(3HB) por esta bactéria é iniciada pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase (PhaA) para a formação de acetoacetil-CoA. Este, por sua vez, é reduzido pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase (PhaB) a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA. Acetoacetil redutase determina a velocidade específica de biossíntese do polímero e a PHA sintase (PhaC) polimeriza o monômero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA para poli(3-hidroxi-butirato) e tem-se a formação do grânulo de P(3HB). Os grânulos de P(3HB) são envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios e de várias proteínas como a PHA sintase, PHA depolimerase, proteínas reguladoras e proteínas estruturais na superfície do grânulo chamadas de phasinas (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001).

A concentração de PHA sintase na célula determina a massa molar do polímero e sua polidispersidade (SIM *et al.*, 1997). Segundo Gerngross e Martin (1995) e Sim *et al.* (1997), a massa molar do polímero é inversamente proporcional à concentração de PHA sintase presente na célula, estes autores sugerem um mecanismo no qual cada unidade de enzima é responsável pela produção de uma cadeia de polímero. De acordo com Bhubalan *et al.* (2011), a maior concentração de PHA sintase em uma célula pode resultar na formação de um maior número de grânulos, o que leva a formação de PHA com cadeias menores e, conseqüentemente de massas molares menores. Outros fatores que também podem interferir na massa molar de PHA durante a sua síntese são: condições de cultivo, microrganismo produtor, fonte de carbono, tempo da fase produção (limitação de um nutriente)

(KAWAGUCHI; DOI, 1992; TAIDI; MANSFIELD; ANDERSON, 1995).

Vários estudos relatam que a massa molar do PHA produzido por *Cupriavidus necator* diminui ao longo da fase de acúmulo (limitação de um nutriente) (BALLARD; HOLMES; SENIOR, 1987; KAWAGUCHI; DOI, 1992; BRADEL; REICHCRT, 1993). Ballard, Holmes e Senior (1987) observaram que a massa molar de P(3HB) produzido por *C. necator* utilizando como fonte de carbono a glicose reduziu de  $2,5 \times 10^6$  para  $6 \times 10^5$  Da ao longo de 70 h de cultivo. Esta degradação pode ocorrer, pois inúmeros microrganismos são capazes de excretar, no meio em que se encontram, PHA depolimerases que hidrolisam o PHA em oligômeros solúveis em água e em monômeros que podem ser utilizados como nutrientes pela célula (ABE; DOI, 1999).

## 1.2 Propriedades dos PHAs

Os PHAs são diferenciados entre si em função de sua estrutura e da composição de sua cadeia monomérica que influenciam no ponto de fusão, na temperatura de transição vítrea, na massa molar e no grau de cristalinidade, sendo que a composição monomérica depende do substrato utilizado na etapa de produção (MADISON; HUYSMAN, 1999).

O P(3HB) é um termoplástico com propriedades físicas e mecânicas comparáveis às do polipropileno (PP), tais como elevada cristalinidade (55-80 %), resistência à mistura, resistência à água, pureza óptica, boa estabilidade radiação ultravioleta, barreira à permeabilidade de gases, biocompatibilidade, alta regularidade da cadeia carbônica e elevada massa molar (RODRIGUES, 2005; MACHADO *et al.*, 2010; TELLES; SARAN; TREVISOLLI, 2011).

O P(3HB) apresenta degradação térmica a temperaturas próximas a seu ponto de fusão, 170-200 °C (GRASSIE; MURRAY; HOLMES, 1984). Nessas condições, ocorre a quebra das ligações

ésteres entre as unidades repetitivas e a rápida redução de sua massa molar média. Uma vez que a degradação térmica resulta na diminuição da massa molar do P(3HB), todas as propriedades físicas e mecânicas também são alteradas (QUENTAL *et al.*, 2010).

A Tabela 1.1 apresenta uma comparação das principais características dos polímeros P(3HB) e polipropileno (PP). Ambos se fundem a temperaturas muito próximas, 160-180 °C para o P(3HB) e 174-178 °C para o PP. Os valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir  $T_g$  de -17 °C, mostra-se mais flexível que o P(3HB). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada pelo módulo de elasticidade do PP (2,8 GPa), que é bem inferior ao do P(3HB) (4 GPa). No entanto, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade (GOMES; BUENO NETO, 1997; CORNIBET; MARCHESSAULT, 1972; SUDESH *et al.*, 1999; FORMOLO *et al.*, 2003).

**Tabela 1.1.** Comparação das propriedades do P(3HB) com as do PP.

Características	*P(3HB)	*(PP)
Temperatura de fusão (°C)	160 a 180	174 a 178
Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) (°C)	-5 a 5	-17
Grau de cristalinidade (%)	55 a 80	68
Permeabilidade de oxigênio ( $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{atm}/\text{dia}$ )	45	1700
Módulo de elasticidade (Módulo de Young) (GPa)	3,5 a 4	2,8
Tensão de cisalhamento (MPa)	30 a 40	38 a 83
Resistência à ruptura (%)	5 a 45	60 a 400
Massa molar (Da)	$1 \times 10^4$ a $3 \times 10^6$	$2,2$ a $7 \times 10^5$

\*Dados reportados dos seguintes estudos: Cornibet e Marchessault (1972); Gomes e Bueno Neto (1997); Sudesh *et al.* (1999); El-Hadi *et*

*al.* (2002); Khanna e Srivastava (2004); Kabe *et al.* (2012); Divya, Archana e Manzano (2013); Lanham *et al.* (2013); Quines *et al.* (2015).

A massa molar do P(3HB) é uma propriedade pouco abordada na literatura, contudo é de extrema importância, uma vez que muitas propriedades físico-químicas do polímero são dependentes do comprimento da molécula (CANEVAROLO, 2013). Essa propriedade está diretamente relacionada à resistência mecânica do polímero. Após a degradação térmica, por exemplo, pode haver uma diminuição da temperatura de fusão e no grau de cristalinidade, da viscosidade, além de tornar o P(3HB) mecanicamente frágil, afetar a velocidade de biodegradação, a qual está relacionada com a sua cristalinidade. Um fator que evidencia a relação da massa molar com a velocidade de degradação do polímero biodegradável está relacionado com sua proporcionalidade entre os valores da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), ou seja, quanto menor a massa molar, menor será o valor da  $T_g$  do polímero (MONTORO *et al.*, 2010). Segundo Khanna e Srivastava (2004), a massa molar de P(3HB) produzido por bactérias é normalmente na faixa de  $1,0 \times 10^4$  e  $3,0 \times 10^6$  Da, com polidispersão em torno de 2,0.

### 1.3 Aplicação de PHAs

O P(3HB) é um material duro que pode ser processado como termoplástico convencional em muitos processos industriais, na fabricação de peças por injeção, extrusão e termoprensagem (<http://www.biocycle.com.br/site.htm>; TELLES; SARAN; TREVISOLLI, 2011; MANTELLATO, 2011). No Brasil, o P(3HB) é fabricado pela empresa BIOCYCLE<sup>®</sup>, produzido na Usina da Pedra, em Serrana- SP, com a parceria do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, da COPERSUCAR e da Universidade de São Paulo. A principal aplicação do BIOCYCLE está na produção de plásticos de uso rápido, como os descartáveis. Além disso, ele também pode ser utilizado para a produção de artefatos médicos de uso humano e veterinário (<http://www.biocycle.com.br/site.htm>). Este biopolímero apresenta

excelentes aplicações no setor de embalagens e filmes, devido a sua alta resistência à umidade, à gordura, à mudança de temperatura e propriedade de barreira a gases.

Os PHAs também são propensos à preparação de sistemas biomédicos devido às suas propriedades de biocompatibilidade adequadas, biodegradabilidade e termoprocessabilidade (ZURICH, 2008; BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009; ZHOU *et al.*, 2010). Assim, o PHA pode ser usado para enxertos ósseos, telas cirúrgicas, cápsulas de liberação controlada de fármacos, enxertos vasculares e válvulas cardíacas, confecção de tecidos, confecção de fios de sutura absorvíveis, na administração de medicamentos e são ainda polímeros com potencial de aplicações a ser explorado (COSTA, 2009; BRITO *et al.*, 2011; DOAN; NGUYEN, 2012; GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2012; MASAELI *et al.*, 2012; BABU; CONNOR, SEERAN, 2013; SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013; SARANYA; RADHA, 2014). A aplicação deste biopolímero em nanopartículas para liberação controlada de drogas no tratamento de doenças como o câncer e tuberculose foi estudada por Parlane *et al.* (2012), Lee *et al.* (2011) e Althuri *et al.* (2013).

Segundo Costa e Queiroz (2013), o P(3HB) também pode ser aplicado em bioengenharia tecidual ou medicina regenerativa, como suporte para a expansão *in vitro* de células. A construção do suporte permite criar condições ideais de reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesionados, fornecendo elementos celulares requeridos, fatores de proliferação e diferenciação celular que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas.

A aplicação dos PHAs abrange também a fabricação de braçadeiras para plantas ou tubetes para reflorestamento e sistema para liberação controlada de herbicida na lavoura (MANTELLATO, 2011; LATHA *et al.*, 2013). Além da agricultura, os PHAs podem ser aplicados em embalagens de cosméticos, embalagens para alimentos, brinquedos, produtos de higiene pessoal como barbeadores e escovas de dente, entre outros (BUCCI; TAVARES; SELL, 2004; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007; BRITO *et al.*, 2011; CAMARGO *et al.*,

2012; GUMEL; ANNUAR ; CHISTI, 2012; <http://www.biocycle.com.br/site.htm>).

Para aplicação de PHAs em embalagens de alimentos alguns fatores devem ser considerados, como propriedades mecânicas, de baixa fragilidade e resistência à tração adequada, barreira ao oxigênio, CO<sub>2</sub>, e sabores aromáticos residuais, alta resistência-UV e alta retenção de capacidade de água para bloquear o conteúdo de umidade dos alimentos, ou para evitar umidade, respectivamente (KOLLER, 2014). Bucci, Tavares e Sell (2004) investigaram a aplicação de P(3HB) para produção de embalagens alimentícias. O estudo revelou que o P(3HB) é um polímero promissor para ser aplicado na embalagem de alimentos, uma vez que atua como uma boa barreira à incidência da luz UV e em relação à migração de componentes, embalagens P(3HB) pigmentadas também podem ser recomendadas para diferentes alimentos em condições de conservação, tanto em longo e curto prazo.

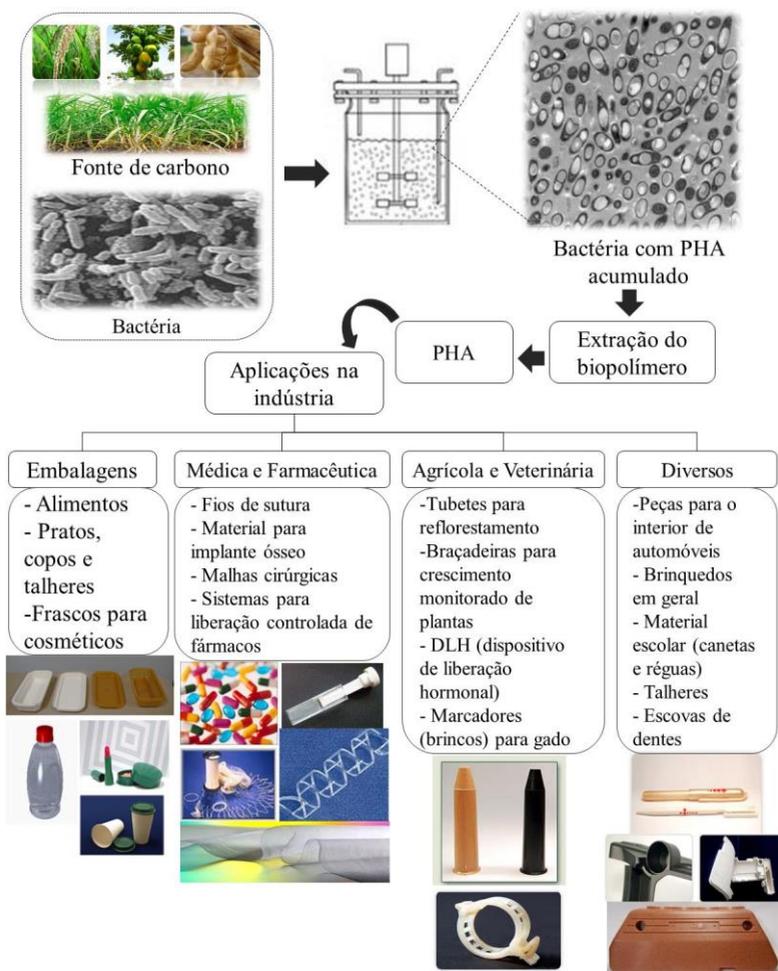
A principal desvantagem da aplicação de PHAs na indústria para confecção de produtos biodegradáveis é seu custo de produção elevado quando comparado aos polímeros provenientes do petróleo (CHEN, 2005; PRADELLA, 2006; CARBAJAL; GARCIA, 2014). A aplicação dos PHAs está focada em produtos diferenciados, onde a biodegradabilidade agrega um valor adicional, enquanto que as resinas convencionais são aplicadas em produtos onde baixo custo é requerido (BRITO *et al.*, 2011). No campo da medicina, por ser aplicação de ponta, de alto valor agregado, o elevado custo de produção dos PHAs não implica na limitação da aplicação (SIMIONI *et al.*, 2008; SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013; PRIYADARSHI; BORSE, 2014).

O emprego dos PHAs está diretamente ligado às suas propriedades específicas: mecânicas, físicas, térmicas, de biocompatibilidade e de biodegradação, dentre outras (VASCONCELOS, 2002; FORMOLO *et al.*, 2003; SCHNEIDER, 2006). Vale ressaltar que estas propriedades dependem da composição monomérica do biopolímero e do tamanho da cadeia. Por outro lado, a composição do PHA e sua respectiva massa molar, dependem da natureza química da matéria prima oferecida como fonte de carbono, das

condições ambientais de operação do biorreator e do microrganismo empregado. Desta maneira, as características do polímero final podem ser moduladas no biorreator de produção e preservadas no processo de extração (PRADELLA, 2006).

Na Figura 1.2 estão apresentadas algumas das possibilidades de aplicações dos PHAs.

**Figura 1.2.** Aplicações para os PHAs produzidos por bactérias.



Em todas as possibilidades de aplicações citadas a massa molar de P(3HB) é uma característica importante a ser considerada, pois determina as propriedades físicas do polímero, e por sua vez, as aplicações finais (CANEVAROLO, 2007; PEÑA *et al.*, 2014). Para Sánchez *et al.* (2003) P(3HB) com massa molar de  $2,23 \times 10^5$  Da é biopolímero com potencial aplicação em filmes para embalegens. Crochemore *et al.* (2013) em estudo de produção de P(3HB) por *Pseudomonas* sp. CMM43 obtiveram polímero com massa molar de  $4,7 \times 10^4$  Da. Os autores concluíram que o biopolímero produzido apresentou baixa massa molar, parâmetro apropriado para várias aplicações nas áreas médicas e farmacêuticas, preparação de determinados enxertos e blendas. O Quadro1.1 resume algumas das aplicações de P(3HB) reportadas na literatura.

Apesar das vantagens da produção de P(3HB), o custo de produção deste biopolímero é muito elevado em comparação aos plásticos de origem petroquímica, ainda apresentam algumas características, como elevada cristalinidade, rigidez e temperatura de fusão próxima a de degradação, que reduzem a gama de suas aplicações. Para contornar esse aspecto, é possível a obtenção de polímeros com propriedades mecânicas melhoradas e com custo mais baixo através de uma mistura física de polímeros denominada blenda (BELTRAMI; SCIENZA; ZATTERA, 2014). A produção de blendas de P(3HB) com outros polímeros têm como objetivo melhorar suas propriedades físicas, o processamento, além de diminuir o seu custo. Dentre estas blendas algumas são biodegradáveis e outras são parcialmente biodegradáveis, dependendo se o polímero combinado com o P(3HB) é ou não biodegradável (QUENTAL *et al.*, 2010; ALMEIDA, 2012; KANJIRATHUMUTIL, 2012).

**Quadro 1.1.** Possibilidades de aplicações de P(3HB) de acordo com sua massa molar (Mw).

Aplicação	Mw (kDa)	Referência
Embalagens para cosméticos, braçadeiras para reflorestamento, utensílios de higiene, peças para automóveis	300 -600	Biocycle
Embalagem para alimentos	290	Bucci <i>et al.</i> (2004)
Embalagem para agrotóxico	290	Gomes (2008)
Filme para aplicação na engenharia de tecidos	263	Kessler (2014)
Micropartículas para liberação controlada de herbicida	312	Grillo <i>et al.</i> (2011)
Microcápsulas para liberação controlada de fármacos para tratamento da periodontite.	17	Domingos (2012)
Suporte de nanofibra para engenharia de tecidos	144	Ramier <i>et al.</i> (2014)
Microcápsulas de liberação controlada de drogas	300	Silva-Valenzuela <i>et al.</i> (2010)
Suportes para engenharia de tecidos	300	Masaeli <i>et al.</i> (2012)
Nanocompósitos	125	Maiti, Batt e Giannelis (2007)

A utilização de blendas, como biomateriais, tem sido testada principalmente na fabricação de regeneração óssea e fabricação de parafusos e placas para osteossíntese (BLAZEC, 2012; CASARIN *et al.*, 2013). Blendas de hidroxiapatita (HAP) e o poli(3-hidroxibutirato) foram utilizadas para fabricar membranas rígidas para regeneração tecidual periodontal e para scaffolds para engenharia de tecidos por Reis *et al.* (2012) e Ramier *et al.* (2014), respectivamente. Carlo *et al.* (2009) estudaram a biocompatibilidade, a osseointegração e a reabsorção de compósitos contendo 10 % de hidroxiapatita e 90 % de poli(3-

hidroxibutirato) após implantação em problemas ósseos em coelhos e concluíram que essa blenda utilizada foi biocompatível, se integrou ao tecido ósseo e foi totalmente reabsorvida in vivo.

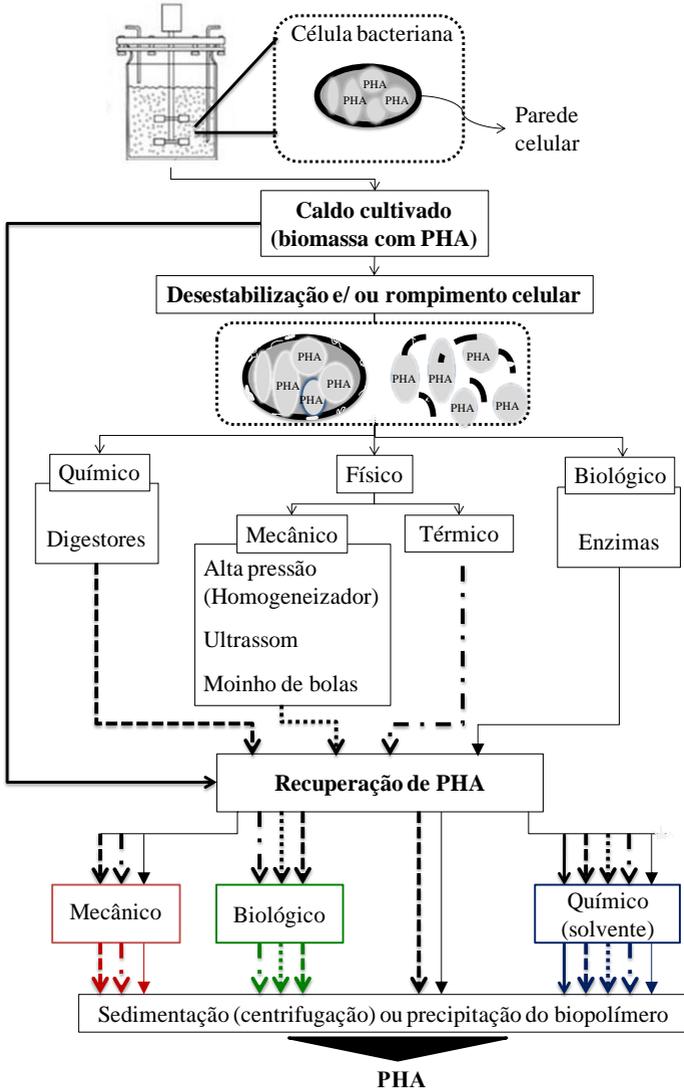
#### **1.4 Extração de PHAs**

Por se tratar de um produto acumulado intracelularmente, no citoplasma das células bacterianas, os PHAs devem ser extraídos das células após a etapa de produção (cultivo). O tratamento da biomassa, após o cultivo para a extração do PHA acumulado, é uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar alterações nas propriedades do produto final (MADKOUR *et al.*, 2013).

A Figura 1.3 apresenta diferentes estratégias de extração de PHAs a partir de biomassa bacteriana.

O processo completo de extração de PHAs é composto por várias etapas, sendo a primeira, que pode ser realizada ou não, de tratamento da biomassa com a finalidade de aumentar a recuperação polimérica por desestabilização e/ou rompimento da parede celular microbiana (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006). Esta primeira etapa é realizada após o cultivo. A biomassa pode ser tratada com métodos químicos (ácidos, álcalis, solvente e detergentes, fluido supercrítico), métodos biológicos (utilização de enzimas), métodos físicos como elevação da temperatura ou mecânicos que são subdivididos em homogeneizador à alta pressão, moinho de bolas, prensa francesa e ultrassom (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; KHOSRAVI *et al.*, 2004; JACQUEL *et al.*, 2008; FIORESE *et al.*, 2009; PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS; KIPARISSIDES, 2012; MANTELLATO; DURÃO, 2013). Após o rompimento ou desestabilização da parede celular obtém-se uma suspensão constituída por biopolímero (quando ocorre rompimento celular), meio de cultivo, células com biopolímero (células que tiveram a parede celular desestabilizada, mas não rompida) e *debris* celulares (mistura de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e fragmentos de parede celular).

**Figura 1.3.** Estratégias de processos de extração de PHA produzido por bactérias e a definição do método de extração que envolve todas as etapas do processo, desde o tratamento da biomassa para desestabilização e/ou rompimento da parede celular até a obtenção do biopolímero.



**Métodos de extração**

- > Químico e físico (digestor e mecânico)      —> Biológico (enzimático)
- ·> Físico (térmico e mecânico)                      —> Químico (solvente)
- > Biológico e físico (enzimático e mecânico)      ---> Químico (digestão e solvente)
- ·> Físico e biológico (térmico e enzimático)      ····> Físico e químico (mecânico e solvente)
- > Físico e biológico (mecânico e enzimático)      - ·> Físico e químico (térmico e solvente)
- > Químico e biológico (digestor e enzimático)      —> Biológico e químico (enzimático e solvente)
- > Químico (digestão)

No caso de um processo de extração sem tratamento prévio da biomassa, este inicia na etapa de separação do material sólido, composto por células com biopolímero intracelular, do caldo de cultivo, que geralmente é realizado por centrifugação. Para biomassa tratada, esta é a segunda etapa do processo de extração.

A etapa seguinte é 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. O processo é finalizado após a recuperação do biopolímero por sedimentação (centrifugação) ou por precipitação.

O processo de extração de PHAs envolve diferentes operações unitárias que garantem a adequada remoção do biopolímero do interior das células. Neste processo, deve-se considerar aspectos como: redução das perdas de produto nas diferentes etapas do processo, obtenção de um produto de elevada pureza e com características físicas e térmicas preservadas e obtenção sustentável do produto, utilizando-se produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente. Estima-se que a etapa de extração dos PHAs possa representar cerca de 50 % no custo total do processo de produção, dependendo de variáveis como processo de *downstream* e o conteúdo de PHA na biomassa (SILVA *et al.*, 2007; IENCZAK; ARAGÃO, 2011). Segundo Chen *et al.* (2001), para potencializar a produção de P(3HB), é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e de extração de baixo custo,

com impacto ambiental reduzido, a fim de tornar este polímero economicamente competitivo e, desta forma, potencializar a sua aplicabilidade.

Dentre os métodos utilizados nos processos de extração de PHAs estão: aplicação de solventes orgânicos, tais como clorofórmio (DALCANTON, 2006; RIEDEL *et al.*, 2012), carbonato de propileno (LAFFERTY; HEINSLE, 1979; FIORESE *et al.*, 2009), acetona (NARASIMHAN *et al.*, 2008), cloreto de metileno (ZINN *et al.*, 2003; MOHAMMAD; STEINBUCHER, 2009), acetato de etila (RIEDEL *et al.*, 2012) e diclorometano (VANLAUTEM; GILAIN, 1982; LÓPEZ-CUELLAR *et al.*, 2011); digestores químicos como dodecil sulfato de sódio (SDS) (YANG *et al.*, 2011), hipoclorito de sódio (YU; PORTER; JARENKO, 2013) e hidróxido de sódio (MOHAMMADI *et al.*, 2012); fluídos supercríticos (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; JAVERS; GIBBONS; RAYNIE, 2012); digestor biológico (enzimas) (HOLMES; LIM, 1990; KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2008; NEVES; MÜLLER, 2012); aplicação de métodos mecânicos como homogeneizador à alta pressão, ultrassom, entre outros (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998a); métodos combinados como mecânico e químico (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; GARCIA, 2006) e estudos de liberação espontânea de PHAs (MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Diversos estudos na literatura propõem o desenvolvimento de metodologias de extração de PHAs, a partir de bactérias, que visam diminuir os custos de processo, substituir e/ou diminuir a aplicação de produtos químicos tóxicos por produtos atóxicos ou de baixa toxicidade, reduzir o tempo e as etapas de extração, diminuir a degradação das cadeias poliméricas e aumentar a recuperação do biopolímero. Neste contexto, esta revisão reporta algumas das estratégias de processos de extração de PHAs, produzidos por bactérias, que envolvem desde o tratamento de desestabilização e/ou rompimento celular até a recuperação e obtenção do biopolímero purificado.

Nos itens seguintes serão descritos os diferentes métodos de extração de PHAs.

### **1.4.1 Métodos químicos**

Os métodos químicos de extração de PHAs, a partir de bactérias, envolvem a utilização isolada ou combinada de solventes e digestores químicos.

#### **1.4.1.1 Solvente**

A técnica de extração de PHAs com solventes orgânicos é a mais utilizada devido à sua simplicidade, obtenção de polímeros com elevada pureza e reduzida redução da massa molar do produto (LEE *et al.*, 1999; JACQUEL *et al.*, 2008; KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2012). Define-se como solvente a substância capaz de dissolver o soluto, a fim de formar uma solução do soluto no solvente (MANTELLATO; DURÃO, 2008). A solubilização do polímero por um determinado solvente é possível quando as interações entre as moléculas do solvente e as cadeias poliméricas apresentam uma magnitude superior à magnitude das interações entre as cadeias poliméricas (GALEGO *et al.*, 2000).

Na extração de PHAs utilizando solvente sob aquecimento, ocorre a modificação da permeabilidade da membrana celular pelo solvente, e a solubilização do polímero, formando uma suspensão dos *debris* celulares na solução de polímero e solvente (JACQUEL *et al.*, 2008).

A solubilização polimérica é um processo físico reversível, que não altera a estrutura química polimérica. O polímero sólido em contato com o solvente tende a inchar através da difusão das moléculas do solvente para dentro da massa polimérica, no volume livre existente entre as cadeias poliméricas, formando um gel inchado (STRUIK, 1989; CANEVAROLO, 2013).

A solubilidade de um polímero em um determinado solvente é acrescida com a elevação da temperatura e/ou redução da massa molar da cadeia polimérica (CANEVAROLO, 2007). De acordo com Fruet (2005) e Souza (2006), polímeros termoplásticos são caracterizados por possuírem ligações covalentes entre os átomos nas macromoléculas e

estas podem ser rompidas com a inserção de energia. Portanto, quando os polímeros são aquecidos, se a energia térmica imposta ao polímero for superior à energia das ligações químicas, algumas dessas ligações podem ser rompidas, causando redução na massa molar do polímero (NAVARRO; ALMEIDA; RABELLO, 2007; TORRES; ALMEIDA; HABAS, 2011).

Após a solubilização do polímero no solvente, o polímero é separado dos *debris* celulares por filtração ou centrifugação e o produto final normalmente é obtido após a evaporação do solvente ou precipitação do polímero através da adição de um “não solvente”, como alcoóis e água (PENG; LO; WU, 2013). Segundo Canevarolo (2013), considerando-se uma solução de um polímero em solvente, ao se adicionar um não solvente (neste caso água), chega-se a uma condição em que as forças atrativas entre as cadeias poliméricas se sobrepõem às forças atrativas entre polímero-solvente, e o polímero precipita. Não solvente é definido como uma substância que é incapaz de dissolver o biopolímero fazendo com que ocorra a precipitação do mesmo por indução e/ou por enfraquecer o poder de diluição do solvente (NODA, 1998).

Os solventes mais utilizados nos processos de extração de PHAs a partir de bactérias são: clorofórmio, acetona, metil isobutil cetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etila e álcool isoamílico (NARASIMHAN *et al.*, 2008; FIORESE *et al.*, 2009; IBRAHIM; STEINBÜCHEL, 2009; BUDDE *et al.*, 2011; RIEDEL *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-CONTRERAS *et al.*, 2013).

De acordo com Mantellato e Durão (2008), o tempo de contato e a temperatura de aquecimento do polímero com o solvente e a eficácia das operações unitárias empregadas na recuperação do biopolímero de bactérias são determinantes na qualidade do produto final, bem como na viabilidade industrial do processo.

Solventes halogenados como clorofórmio, dicloroetano, cloropropano e cloreto de metila são amplamente reportados na literatura para a extração de PHAs a partir de bactérias, sendo o clorofórmio o mais estudado (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002;

DALCANTON, 2006; VALAPPIL *et al.*, 2007; FIORESE *et al.*, 2009). Ramsay *et al.* (1994) realizaram ensaios de extração de P(3HB), a partir de *Cupriavidus necator*, com clorofórmio, cloreto de metileno e dicloroetano. As suspensões de biomassa celular em solvente foram submetidas à agitação constante durante 12 h em temperatura ambiente. Os resultados de recuperação de P(3HB) para a extração com clorofórmio, cloreto de metileno e dicloro-1,2-etano foram de 27 %, 26 % e 0 %, respectivamente. Os polímeros extraídos com os diferentes solventes apresentaram pureza de 95 %.

Um processo de extração com clorofórmio foi utilizado para a recuperação de P(3HB) de células de *Zobellella denitrificans*. Após 72 h de extração a 30 °C, 85 % do P(3HB) foi recuperado com pureza de 98,3 % (IBRAHIM; STEINBÜCHEL, 2009). Estes autores também testaram a utilização de cloreto de metileno como solvente na extração de P(3HB) e obtiveram um produto com pureza de 98,8 %, porém a máxima recuperação de polímero obtida após 72 h de extração foi de 36 %. Dalcanton (2006) e Fiorese *et al.* (2009) também estudaram a extração de PHA de *C. necator* DSM 545 com clorofórmio a 60 °C, obtendo porcentagens de recuperação superiores a 94 % e polímeros com purezas acima de 95 %.

Com a utilização de solventes halogenados, pode-se obter elevadas porcentagens de recuperação de produto com elevada pureza. Porém, o emprego de solventes tóxicos e altamente voláteis para a extração de PHAs (como o clorofórmio) é contraditório à ideia de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica. Além disso, a utilização destes solventes halogenados (tóxicos) em processos em grande escala exige um rigoroso controle, devido à segurança do processo (exposição dos operadores a riscos), utilização de elevados volumes de solventes voláteis (com elevada porcentagem de perda por evaporação, aumentando o custo total de produção) e geração de problemas ambientais (GORENFLO *et al.*, 2001; McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009; KUNASUNDARI; SUDESH, 2011).

Riedel *et al.* (2012) testaram diferentes solventes não halogenados para extração de poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxiexanoato (P(HB-*co*-HHx)), a partir de *C. necator*. Os solventes estudados foram metil-isobutil-cetona, metil-etil-cetona, acetato de butila, acetato de etila e álcool isoamílico, e os resultados mais elevados de recuperação polimérica obtidos foram com os solventes metil-isobutil-cetona e acetato de etila, de 84 % e 93 %, respectivamente.

A PHB Industrial SA., produtora de PHA da marca BIOCYCLE® em escala industrial no Brasil, utiliza processo de extração patenteado, em que são aplicados alcoóis superiores com cadeia superior a três carbonos e seus ésteres, como álcool isoamílico, acetato de amila, acetato de isoamila e óleo fúsel, resíduo do processo de produção de etanol, como solventes para extração de PHA (ROSSEL *et al.*, 2002). Segundo Rossel *et al.* (2002), este método de extração consiste em recuperar PHA de biomassa bacteriana com solvente não halogenado, como propionato de isoamila, para solubilização do polímero na fase orgânica. Os *debris* celulares são separados da solução composta de polímero e solvente por filtração e em seguida, o polímero é precipitado da solução por resfriamento, o solvente é removido, o polímero recuperado e submetido à secagem. As vantagens da aplicação deste método estão na utilização de apenas um solvente, não agressivo ao meio ambiente, como extrator e purificador no processo, não requerendo a utilização de um não-solvente na etapa de precipitação polimérica. A precipitação do PHA da solução com o solvente é realizada por resfriamento da mesma até temperatura próxima a ambiente (MANTELLATO, 2011).

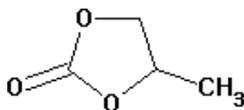
De acordo com McChalicher, Srienc e Rouse (2009), o solvente ideal para a extração de biopolímeros a partir de microrganismos, a pressões atmosféricas, deve ser capaz de dissolver os PHAs abaixo da temperatura de degradação do polímero, minimizando a degradação de suas cadeias, ser reutilizável e apresentar baixos riscos ambientais. Neste contexto, dentre os solventes utilizados na extração de PHAs a partir de biomassa bacteriana, destaca-se o carbonato de propileno, por

apresentar várias das propriedades requeridas para um bom solvente (LAFFERTY; HEINZLE, 1979).

O solvente orgânico carbonato de propileno, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), recebe a nomenclatura de 4-metil-1,3-dioxolan-2-ona, sendo um éster de ácido carbônico cíclico, cuja estrutura é apresentada na Figura 1.4. A extração de P(3HB) com carbonato de propileno foi primeiramente proposta por Lafferty e Heinzle (1979), como alternativa aos solventes clorados.

O processo de extração de PHAs, a partir de bactérias, com carbonato de propileno se baseia nas seguintes etapas: aquecimento da suspensão formada por biomassa e solvente, filtração para separação da solução formada pelo solvente com o polímero solubilizado dos *debris* celulares, adição de um não-solvente para a precipitação polimérica, separação do polímero da mistura composta por solvente e não-solvente e por fim secagem do material polimérico (QUINES *et al.*, 2015).

**Figura 1.4.** Fórmula estrutural do carbonato de propileno (4-metil-1,3-dioxolan-2-ona).



O carbonato de propileno é um líquido claro, altamente polar, não viscoso e com baixa toxicidade. Possui uma elevada capacidade de interação com outros solventes polares, misturando-se com a água, álcool etílico e substâncias de considerável polaridade. Este solvente apresenta também uma elevada capacidade de promover a dissociação de sólidos (sais e polímeros) (TOSTA, 2008). Este solvente apresenta propriedades interessantes como: não persistir no meio ambiente pois é degradado facilmente e não é genotóxico, ou seja, não causa danos aos genes de uma célula ou de um organismo (CIR, 1987; EPA, 1998); possuir elevado ponto de ebulição, próximo a 240 °C, o que reduz perda

por evaporação, podendo ainda ser reutilizado, minimizando assim, os custos de produção (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009).

Embora haja preocupação sobre a presença de residuais provenientes dos solventes nos biopolímeros, o carbonato de propileno já foi aprovado para uso em aplicações sensíveis, tais como cosméticos e medicamentos (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009). A pomada Protopic<sup>®</sup>, utilizada no tratamento de dermatite, apresenta na sua composição carbonato de propileno. Estudos têm demonstrado que o carbonato de propileno não é facilmente absorvido através da pele, podendo ser utilizado em uma variedade de cosméticos em concentrações de até 5 %. Um estudo de longo prazo, que consistiu na aplicação de doses diárias de até 5000 mg de carbonato de propileno por quilograma de peso corporal de ratos, não demonstrou nenhum efeito após 90 dias. Embora esses estudos não sejam conclusivos, sugerem que o carbonato de propileno pode ser adequadamente utilizado para aplicações sensíveis, tais como embalagens para alimentos (CIR, 1987).

A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno encontrado por Lafferty e Heinzle (1979), a partir de células secas de *Azobacter chroococcum* DSM 377, foi de 87 %, com aquecimento a 140 °C e tempo de contato de 30 min. Fiorese *et al.* (2009), utilizando carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB) a partir de *C. necator* na temperatura e tempo de extração de 130 °C e 30 min, obtiveram uma recuperação de 95 % e pureza de 84 %.

#### **1.4.1.2 Digestor químico**

A utilização de digestão química, para extração de PHAs produzido por bactérias, envolve a solubilização dos materiais da parede celular, deixando os grânulos de PHAs em suspensão. Os materiais não poliméricos digeridos neste processo são ácidos nucleicos, lipídios, fosfolipídios, peptidoglicano e materiais proteicos (*debris*) (CHOI; LEE, 1999; YU, 2008).

Vários estudos relatam a utilização de digestores químicos para recuperação de PHAs, mas a eficácia do método depende da espécie microbiana da qual será realizada a extração (KIM *et al.*, 1994;

GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; SUZUKI *et al.*, 2008). Os digestores mais utilizados são o dodecil sulfato de sódio (SDS), hipoclorito de sódio (NaClO), hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (HAHN *et al.*, 1994; LEE, 1996; YU; PORTER; JARENKO, 2013; PENG; LO; WU, 2013).

Hahn *et al.* (1994) utilizando hipoclorito de sódio no processo de extração de P(3HB), obtiveram 86 % e 93 % de recuperação a partir de *Alcaligenes eutrophus* e *E. coli* recombinantes, respectivamente. Porém, durante essa digestão ocorreu degradação de P(3HB), resultando em uma redução da massa molar de 50 % após o processo de extração. Segundo Yu (2008), o hipoclorito de sódio é um agente oxidante não seletivo que digere tanto o material não polimérico como os grânulos poliméricos, resultando na elevada degradação da massa molar do biopolímero recuperado.

Heinrich *et al.* (2012) desenvolveram um método simplificado para extração de P(3HB) em escala piloto (tanque de reação de 50 L), utilizando hipoclorito de sódio. Este método se baseia nas seguintes etapas, células secas suspensas em uma solução de hipoclorito de sódio 13 % (v/v) com pH de 12,3 durante 1 h, precipitação do polímero com adição de água, lavagem do material polimérico com isopropanol para a remoção do material lipídico. O P(3HB) foi extraído de células de *C. necator* H16 com resultados de 96 % de pureza e recuperação de 87,03 %. Estes autores compararam a degradação da massa molar do polímero extraído com hipoclorito de sódio ao extraído com clorofórmio e observaram uma redução da massa molar polimérica de até 70 % quando se utilizou hipoclorito de sódio (460<sup>o</sup>kDa) em comparação com clorofórmio (1700<sup>o</sup>kDa).

Yang *et al.* (2011) realizaram extração de PHA de *C. necator* H16 utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) como digestor e os resultados obtidos após 3 h de extração foram de 95 % de recuperação e 83 % de pureza. Embora o método de digestão com SDS seja simples e eficaz para a digestão dos materiais celulares e a liberação dos grânulos de PHA com elevadas purezas, este causa problemas de águas residuais

(YU, 2008; LO; WU; WEI, 2011; ANIS *et al.*, 2013; PENG; LO; WU, 2013).

Mohammadi *et al.* (2012) propuseram um processo de extração de PHA sustentável, produzido por *C. necator*, que envolve a utilização de NaOH em baixa concentração. 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 (YU, 2008). 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 %).

Yu (2008) utilizou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH e NaClO para a digestão do material não polimérico e recuperação de PHA produzido por bactéria. O método baseou-se no fato de que ácidos inorgânicos, como o ácido sulfúrico, em baixas concentrações, são agentes oxidantes seletivos que podem dissolver a massa celular (não polimérica) em pequenos detritos causando poucos danos aos grânulos de PHA. O método abordado neste estudo compreendeu as seguintes etapas: Primeiramente a biomassa seca foi tratada com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 M) a 100 °C/ 2 h, para dissolver o material não-polimérico, na sequência o pH da suspensão (células e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi elevado de 7 para 10 com a adição de NaOH para a saponificação do material lipídico e, em seguida submetida a centrifugação (4.000 g/20 minutos) para a separação dos *debris* celulares dissolvidos do material polimérico. Após, o material polimérico foi ressuspenso em uma solução de NaClO (6 %) durante 2 h para branqueamento e, por fim, o polímero foi submetido à secagem. Com este método a recuperação de PHA foi de 94,9 % com pureza de 99,9 % e o autor verificou também que os PHAs são vulneráveis à saponificação em solução alcalina, podendo ocorrer degradação polimérica, mas por outro lado, são altamente resistentes à hidrólise ácida.

Estudo semelhante foi realizado por Yu, Porter e Jarenco (2013), que realizaram a digestão de células de *C. necator* H16 para a recuperação de P(3HB). Os autores primeiramente realizaram hidrólise

ácida do material não-polimérico com  $H_2SO_4$  para solubilização da massa celular, após os grânulos poliméricos foram suspensos em água e o pH da suspensão foi elevado para 10-11 através da adição de NaOH, a suspensão foi mantida sob agitação durante 30 – 60 minutos e um branqueamento do material polimérico com hipoclorito de sódio foi realizado e por fim, uma solução de SDS foi adicionada. A recuperação de P(3HB) foi de 92,6 % com pureza de 99,4 %. Segundo estes autores, a parede celular de *C. necator* torna-se porosa com o tratamento ácido, onde ocorre a liberação de proteínas e de outros componentes biológicos do citoplasma, mas a estrutura da célula mantém os grânulos de P(3HB) em seu interior. Com o tratamento alcalino (NaOH), a parede celular é desestabilizada e o branqueamento com hipoclorito de sódio, nesse caso, realiza uma última etapa de digestão do material não polimérico e eleva a pureza do P(3HB) obtido. Embora com esta técnica se obtenha elevadas porcentagens de recuperação polimérica e de pureza, isto não compensa os altos custos dos reagentes como SDS e hipoclorito de sódio, devido aos elevados volumes de reagentes necessários e aos problemas ocasionados pela presença de surfactantes nas águas residuais (HAHN *et al.*, 1994).

#### ***1.4.1.3 Digestor químico e solvente***

O método de extração de PHAs de microrganismos a partir do uso combinado de digestor químico e solvente é amplamente utilizado. O digestor químico digere o material celular (não polimérico) para facilitar a solubilização do polímero pelo solvente, sendo necessária ainda uma etapa de precipitação do polímero, que pode ser através da adição de um não-solvente. Este método, quando comparado aos métodos que utilizam somente digestão química ou somente solvente, apresenta algumas vantagens, como por exemplo, a obtenção de polímeros mais puros, com porcentagens de recuperação mais elevadas e, em alguns casos, reduzido tempo de contato da biomassa com o agente químico (solvente e/ou digestor) (HAHN *et al.*, 1994; ROH; YEOM; YOO, 1995; CHEN *et al.*, 2001; JACQUEL *et al.*, 2008; SALMIATI; SALIM, 2011; SAMROT *et al.*, 2011). Porém, com este

método tem-se um incremento de etapas no processo de extração e a aplicação de mais um produto químico no mesmo.

Tamer, Moo-Young e Chisti (1998a) combinaram dois digestores químicos, SDS e hipoclorito de sódio, para extração de P(3HB) produzido por *Alcaligenes latus*. Após a digestão do material celular com SDS durante 1 h a 35 °C, a suspensão foi centrifugada e o precipitado suspenso em hipoclorito de sódio durante 25 h. Este método, com algumas modificações, foi aplicado por Kshirsagar *et al.* (2013) para a recuperação de PHA de *Halomonas campisalis* e apenas 16,5 % do biopolímero foi recuperado.

Samrot *et al.* (2011) obtiveram 94 % de recuperação de PHA de *Enterobacter cloacae* no processo de extração com clorofórmio e hipoclorito de sódio, e precipitação do polímero com a adição de etanol. Kshirsagar *et al.* (2013) também utilizaram hipoclorito de sódio (4 % v/v) e clorofórmio puro para a recuperação de PHA, a partir de células *Halomonas campisalis*, neste estudo 300 mg de células foram ressuspensas em uma mistura contendo 50 mL de clorofórmio e 50 mL de hipoclorito de sódio, esta suspensão foi aquecida a 35 °C e mantida sob agitação a 150 rpm, durante 90 min e após centrifugação foi obtida recuperação polimérica de 47 %.

A extração de P(3HB) a partir de *Bacillus megaterium* MTCC 453 com digestão química e solubilização do material polimérico em solvente foi descrita por Prasanna *et al.* (2011). O processo de extração envolveu três etapas, na primeira foi adicionado clorofórmio e hipoclorito de sódio à biomassa, seguido de filtração para separação dos *debris* celulares da solução polimérica (polímero e clorofórmio). Na terceira e última, ocorreu a precipitação do P(3HB) através da adição de metanol e água. Ao final do processo, os autores obtiveram uma recuperação de P(3HB) de 84 %.

Bhattacharyya *et al.* (2012) descreveram um método de extração de P(3HB) da biomassa de *Haloferax mediterranei* com a utilização de digestores e solvente. Nesse trabalho, a biomassa foi suspensa em SDS durante 24 h, em seguida foi centrifugada e, ao precipitado formado por polímero e resíduos celulares remanescentes,

foi adicionada uma solução de hipoclorito de sódio (30 % v/v). A mistura foi centrifugada e o precipitado lavado com água, acetona e etanol e posteriormente dissolvido em clorofórmio em ebulição. Finalmente, a suspensão de polímero composta por solvente e resíduo celular, foi filtrada e o clorofórmio então evaporado. A porcentagem de recuperação de P(3HB) a partir do método descrito foi de 97 %.

Acetona foi utilizada como solvente na extração de PHA de cadeia média, produzido por *Pseudomonas putida* KT2440. Neste estudo, foi avaliado o impacto do tratamento da biomassa com dois digestores, metanol e NaOH (0,1 N), sobre a porcentagem de recuperação e de pureza do polímero, após extração com acetona. O metanol se mostrou mais adequado para o tratamento desta biomassa e a porcentagem de recuperação obtida nesse processo de extração com metanol e acetona foi de 94 % (JIANG; RAMSAY; RAMSAY, 2006).

Embora os resultados de recuperação e pureza de PHAs obtidos a partir da extração com a combinação de digestores químicos e solventes, de células microbianas, sejam elevados, eles não compensam os problemas relacionados aos excessivos volumes de produtos químicos utilizados (muitas vezes com elevada toxicidade), tornando o processo caro e com geração de grandes volumes de águas residuais (HAHN *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2001; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; SALMIATI; SALIM, 2011).

#### **1.4.1.4 Fluido supercrítico**

A aplicação de fluidos supercríticos (SCF) tem sido estudada para rompimento celular e extração de PHAs produzidos por bactérias (HAMPSON; ASHBY, 1999; KHOSRAVI *et al.*, 2004; JAVERS; GIBBONS; RAYNIE, 2012). O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o fluido supercrítico mais amplamente estudado devido à sua baixa toxicidade e reatividade, moderada temperatura e pressão crítica (31 °C e 73 atm) e devido ao fato de não ser inflamável e ao ser de baixo custo (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003).

Hejazi, Vasheghani-Farahani e Yamini (2003) desenvolveram um método de extração de P(3HB) de *C. necator* com fluido

supercrítico e 89 % de polímero foi recuperado nas seguintes condições: CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico, tempo de 100 min, pressão de 200 atm e temperatura de 40 °C.

Khosravi *et al.* (2004) estudaram a extração de P(3HB), produzido por *Cupriavidus necator*, com um método que combina a aplicação de hidróxido de sódio e fluido supercrítico. NaOH (0,4 % m/m) foi aplicado na biomassa úmida para a desestabilizar a parede celular e facilitar o rompimento das células na etapa de extração com fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>, 200<sup>o</sup>bar, 30 °C). Com este método, foi obtida uma recuperação polimérica de 81 %. Segundo estes autores, as variáveis que influenciam na extração supercrítica de P(3HB), produzido por bactéria, são estratégia de secagem da biomassa, tempo de cultivo, pressão e temperatura de operação. Esse método de extração apresenta algumas vantagens, pois utiliza produto químico atóxico, de baixo custo e temperatura de operação branda (30 °C), possibilitando a obtenção de PHAs com elevada pureza e características térmicas e mecânicas mais preservadas (JACQUEL *et al.*, 2008; JAVERS; GIBBONS; RAYNIE, 2012; MADKOUR *et al.*, 2013). O maior obstáculo ao uso da tecnologia supercrítica na indústria é a viabilidade econômica do processo, devido ao alto investimento necessário para a instalação de uma unidade de extração com fluido supercrítico. Seu alto custo é principalmente devido aos equipamentos e acessórios em aço inoxidável e pela necessidade de serem resistentes às altas pressões empregadas no processo (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001; AGUIAR, 2011). Porém, este método pode ser aplicado e seu elevado investimento justificado quando o mercado desejado apresenta vantagens, por exemplo, aplicação nobre do polímero (produto com alto valor agregado).

#### **1.4.2 Métodos Físicos**

Segundo Medeiros *et al.* (2008), a ruptura celular pode ser o primeiro passo no processo de recuperação de produtos intracelulares, apresentando influência direta na porcentagem de recuperação e na

qualidade do bioproduto obtido. O rompimento mecânico de células geralmente é um método eficaz, pois causa pequenos danos aos produtos intracelulares (BECERRA *et al.*, 2001; GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; GOGATE; KABADI, 2009; HOROWITZ; BRENNAN, 2010; KLIMEK-OCHAB *et al.*, 2011).

A eficiência dessa técnica de rompimento celular para recuperação de bioprodutos está relacionada com algumas propriedades das células, como resistência física da parede celular e localização intracelular do produto de interesse (SAWER; ROBINSON; GLICK, 1989; KUBOI *et al.*, 1995). No processo de extração de PHAs a partir de bactérias, o rompimento mecânico de células pode representar o processo de extração como um todo, em que após o rompimento celular, é necessária apenas uma etapa de ultracentrifugação do caldo de cultivo para separar os *debris* celulares do material polimérico (LING *et al.*, 1997; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002).

Segundo Garcia (2006), métodos mecânicos de extração, quando comparados aos químicos, conferem melhores propriedades térmicas ao polímero. Esses métodos surgem como uma alternativa interessante, por serem econômicos e de acordo com Middelberg (1995), são amplamente aplicáveis a técnicas de extração em larga escala. A seguir estão descritos os métodos de extração de PHAs com homogeneizador, ultrassom e moinho de bolas.

#### **1.4.2.1 Homogeneizador à alta pressão**

A ruptura celular por homogeneização à alta pressão pode ser utilizada em diversas aplicações, como por exemplo, biotecnológica, farmacêutica, cosmética, entre outras, sendo amplamente utilizada para liberação de proteínas intracelulares e para inativação de microrganismos (HARRISON, 1991; LANCIOTTI *et al.*, 2007; TRIBST; FRANCHI; CRISTIANINI, 2008; CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2009).

Na homogeneização por alta pressão, o rompimento celular está baseado na passagem da biomassa por uma válvula com orifício estreito (na ordem de micrômetros), seguido de despressurização e grande

aumento da velocidade de escoamento, com conseqüente cavitação e alta tensão de cisalhamento ocasionando a deformação/rompimento das células em suspensão (KESHAVARZ-MOORE; HOARE; DUNNIL, 1990; FLOURY; LEGRAND; DESRUMAUX, 2004; TRIBST; FRANCHI; CRISTIANINI, 2008; MASSON, 2010; MARESCA; DONS; FERRARI, 2011). A pressão de operação é controlada pela distância entre a válvula de homogeneização e seu cabeçote (DIELS; MICHIELS, 2005). Segundo Tribst, Franchi e Cristianini (2008), o rompimento celular é causado pelo atrito, cisalhamento e cavitação que ocorrem no momento em que o fluido passa pela válvula de homogeneização, devido ao espaço restrito para a passagem do fluido, às velocidades atingidas ou à queda brusca de pressão.

Tamer, Moo-Young e Chisti (1998a) estudaram o rompimento celular de *Alcaligenes latus* com homogeneizador à alta pressão (pressão de operação de 900 bar) para recuperação de P(3HB). Estes autores avaliaram a eficiência do método com a variação da concentração celular do caldo cultivado e o número de passagens da suspensão pelo equipamento. Foi observado que o desempenho do homogeneizador depende da concentração da biomassa utilizada, ou seja, quanto mais concentrado o caldo cultivado, maior a eficiência da alta pressão no rompimento celular. O número de passagens pelo homogeneizador também apresentou influência no rompimento celular para recuperação de P(3HB). Van Hee *et al.* (2004) reportam a utilização de homogeneizador à alta pressão para extração de PHA produzido por *P. putida* com recuperação polimérica de 46 % e pureza de 80 %. Nesse método, a biomassa foi submetida à pressão de 1600 bar, seguido de centrifugação do caldo a 30.000 g durante 3 h para a separação dos *debris* celulares do material polimérico. Segundo os autores, perdas de PHA podem ter ocorrido na etapa de centrifugação da biomassa, uma vez que nesse estudo os *debris* celulares (densidade de 1,085 kg m<sup>-3</sup>) foram sedimentados e o biopolímero (densidade de 1,000 kg m<sup>-3</sup>) foi recuperado do sobrenadante e, conseqüentemente, podem ter ocorrido perdas de material polimérico no precipitado.

Um método de extração de P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante, com homogeneizador à alta pressão, foi proposto por Ling *et al.* (1997) com pressão de operação de 550 bar, 4 passagens da biomassa pelo equipamento e posterior centrifugação para a recuperação do biopolímero do sedimentado. Os resultados obtidos neste trabalho foram 90,2 % de pureza e 72 % de recuperação. Segundo Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002), a utilização de digestor químico combinado com homogeneizador à alta pressão, na extração de P(3HB), facilita a liberação do polímero das células aumentando a porcentagem de recuperação.

Os principais fatores que influenciam no rompimento celular com homogeneizador à alta pressão são a pressão de operação, o número de passagens da suspensão celular pelo equipamento e a concentração celular da suspensão. A desvantagem do processo de homogeneização na extração de PHAs é a possibilidade de degradação do produto e formação de detritos celulares muito finos que podem comprometer a pureza do biopolímero recuperado (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998a; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; KELLY; MUSKE, 2004). A aplicação de homogeneizador à alta pressão para rompimento celular e recuperação de PHAs, produzidos por bactérias, resulta em porcentagens de recuperação inferiores a 72 % devido a perdas de produto na etapa de separação dos *debris* celulares do material polimérico. Logo, a utilização deste método combinado com a utilização de produtos químicos como digestores e solventes pode aumentar a eficiência na recuperação polimérica de biomassa bacteriana (VAN HEE *et al.*, 2004).

#### **1.4.2.2 Ultrassom**

O rompimento celular por ultrassom tem sido aplicado em diversos processos de separação para obtenção de bioprodutos a partir de microrganismos (CHIN; TSUEY; TAU, 2006; GOGATE; KABADI, 2009; LEMES; ÁLVARES; KALIL, 2012; MICHELON *et al.*, 2012). Esta técnica refere-se a um método de perturbação mecânica, em que as ondas ultrassônicas (alta frequência) são transferidas por uma ponteira metálica e dissipadas em um sistema líquido (suspensão celular), através

de bolhas de cavitação, formando uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de desestabilizar a parede celular (CHUAN *et al.*, 2005; BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008; KLIMEK-OCHAB *et al.*, 2011).

Dados da literatura reportam a utilização de tratamentos da biomassa com ultrassom como uma etapa do processo de extração de PHAs de bactérias para promover a desestabilização da parede celular e, assim, facilitar a ação de solventes e digestores e, conseqüentemente, melhorar a recuperação do polímero obtido (DIVYASHREE; SHAMALA; RASTOGI, 2009). De uma forma geral, o processo de ultrassonificação para recuperação de bioprodutos é bastante aplicado em escala laboratorial, porém em grande escala seu uso ainda é limitado e de custo elevado, devido à necessidade de utilização de uma grande quantidade de sondas e da instalação de um sistema de refrigeração eficiente. (HARRISON; DENNIS;CHASE, 1991).

#### ***1.4.2.3 Moinho de bolas***

Neste método, utilizam-se pérolas de vidro em um recipiente contendo a suspensão celular. O rompimento celular com moinho de bolas ocorre a partir do choque de esferas com a biomassa, o que promove transferência de energia e conseqüente rompimento das células. O tamanho das esferas, a velocidade de agitação do moinho e a concentração celular, são alguns fatores que interferem neste processo (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998a). A eficiência do rompimento celular com moinho de bolas depende de vários parâmetros, como tempo de residência, forças de cisalhamento, tipo de microrganismo, concentração da suspensão celular e velocidade de agitação. A desvantagem deste método está no fato de haver uma grande quantidade de interferentes, como por exemplo, geometria da câmara de rompimento, da velocidade e do tipo de agitador, do tamanho das esferas, da quantidade de esferas, do diâmetro das esferas, da concentração celular e da temperatura, na sua eficiência e a possibilidade de cisão das cadeias poliméricas (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986; GARRIDO *et al.*, 1994). Este método é utilizado

juntamente com a aplicação de produtos químicos, como solventes e digestores, no processo de recuperação de PHAs (GARCIA, 2006).

### **1.4.3 Métodos combinados físico (mecânico) e químico**

A aplicação do método mecânico para extração de biopolímero tem seu potencial de recuperação aumentado se for associado a um método químico adequado, que possibilite elevada recuperação de PHA no processo de extração, sem promover alterações significativas nas suas características (NODA, 1998). Métodos mecânicos de ruptura celular para recuperação de PHAs vêm sendo aplicados em conjunto com solventes, digestores químicos ou enzimáticos e representam uma das etapas de um processo de extração (rompimento celular), sendo necessárias etapas posteriores para a recuperação e purificação do biopolímero (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998b; PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS; KIPARISSIDES, 2012). Porém, após o rompimento mecânico, a escolha criteriosa dos solventes e digestores e das condições operacionais do processo de extração é fundamental para manter ao máximo a integridade do biopolímero. Tendo em vista que as características do biopolímero dependem diretamente do tratamento da biomassa, do solvente ou digestor utilizado, da temperatura de aquecimento utilizada e do tempo de contato do polímero com o solvente (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2010; GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2012).

#### **1.4.3.1 Homogeneizador à alta pressão e digestor químico**

Alguns autores desenvolveram tecnologias de extração de PHAs a partir de bactérias com homogeneizador à alta pressão associado a um tratamento químico e obtiveram resultados de recuperação e pureza elevados (LING *et al.*, 1997; TAMER; MOO-YOUNG; CHIST, 1998b; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002). Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002) utilizaram SDS (5 % m/v) e homogeneizador à alta pressão (dois ciclos de 392 bar) para extração de P(3HB) produzido por *Methylobacterium* SP, e obtiveram uma porcentagem de recuperação de

biopolímero de 98 % com pureza de 95 %. O SDS foi aplicado para facilitar a permeabilidade das células e facilitar a liberação dos grânulos de P(3HB) na etapa de homogeneização da biomassa. Segundo estes autores, o processo combinado de extração com aplicação de SDS na biomassa antes da homogeneização em alta pressão apresenta-se como um método eficiente. Ling *et al.* (1997) realizaram extração de P(3HB) a partir de *E.coli* recombinante com homogeneizador à alta pressão (quatro ciclos de 550 bar) e obtiveram 72 % de biopolímero recuperado. Quando estes autores acrescentaram uma etapa de digestão, do material não-polimérico com hipoclorito de sódio, no processo de recuperação de P(3HB) com homogeneizador, obtiveram 81 % de recuperação de biopolímero, com pureza de 96,5 %.

#### ***1.4.3.2 Prensa francesa e digestor químico***

Gözke *et al.* (2012) desenvolveram um método de recuperação de P(3HB), a partir de *C. necator* DSM 428, que envolveu tratamento da biomassa, para rompimento celular, com tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) / HCl a pH 9 e duas passagens da biomassa em prensa francesa com pressão de 2000 psi. Após o rompimento celular, estes autores propuseram a utilização de eletrofiltração, processo híbrido que combina filtração e eletroforese, para a recuperação do biopolímero. Segundo os autores, é uma estratégia inovadora no processo de recuperação de P(3HB) com redução do tempo de processamento, de energia e dos custos de purificação.

#### ***1.4.3.3 Moinho de bolas e solvente***

Garcia (2006) propôs um método mecânico alternativo para extração do P(3HB) usando para ruptura celular pérolas de vidro em moinho de bolas. Pérolas de vidro e clorofórmio foram adicionados à biomassa e a suspensão foi submetida a aquecimento e agitação constantes. Em seguida, foram centrifugadas, e formaram-se três fases distintas, sendo a fase inferior composta pelas pérolas de vidro, a fase intermediária contendo uma solução de polímero e clorofórmio e a fase superior formada pelos *debris* celulares. Este método mecânico e

químico desenvolvido para extração de P(3HB) de *C. necator* apresentou uma recuperação de 64 % de polímero com pureza de 89 %.

#### **1.4.3.4 Ultrassom e solvente**

Um processo de extração de P(3HB), de *Azohydromonas lata*, com a utilização de método físico e químico foi descrito por Penloglou, Chatzidoukas e Kiparissides (2012). Este método envolveu duas etapas, sendo que a primeira consistiu no rompimento celular com ultrassom (60 pulsos de 30 s de sonicação e 5 s de pausa). Na segunda etapa, a solubilização do biopolímero foi realizada com clorofórmio a 30 °C durante 1,5 h sob agitação constante, e o polímero foi precipitado com a adição de metanol. Segundo os autores, esse método mostrou-se eficiente para a extração de P(3HB) de células de *Alcaligenes latus*, no entanto tem sua aplicação limitada, devido à dificuldade de implantação deste equipamento em grande escala (HARRISON; DENNIS; CHASE, 1991).

#### **1.4.4 Método biológico**

Os métodos biológicos de extração de PHAs bacteriano são uma alternativa aos métodos que utilizam reagentes químicos baseiam-se na aplicação de enzimas, como lisozimas, nucleases e proteases, para a recuperação do biopolímero (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2008).

O método enzimático é um processo complexo para recuperação de PHAs. Este método consiste na adição de enzimas ao caldo cultivado para hidrolisar as células que contêm o PHA. Vários tipos de enzimas são utilizados neste processo, principalmente as proteases. Essa técnica é atraente devido às condições amenas de operação, pela alta seletividade das enzimas em hidrolisar proteínas da parede celular bacteriana e consequente lise, sem agir na degradação polimérica e pela qualidade do polímero recuperado (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2000).

Kapritchkoff *et al.* (2006) estudaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação de P(3HB) produzido por *C. necator*. Nesse método, inicialmente, o caldo cultivado foi tratado a 85 °C durante 15 minutos e depois a 95 °C durante 45 minutos, a fim de desnaturar as proteínas da parede celular e desestabilizar a membrana externa da bactéria. Este tratamento também desnatura a PHB-depolimerase, enzima presente na parede do grânulo polimérico, capaz de degradar o biopolímero (KING *et al.*, 1991). A biomassa foi submetida a tratamento enzimático, para lise celular, com variação da temperatura e tempo de reação. As enzimas testadas foram: quimiotripsina bovina, tripsina bovina, bromelina, papaina, lisozima, celulase e pancreatina bovina. O melhor resultado obtido por esses autores foi utilizando pancreatina, a 50 °C durante 8 h, e obtiveram recuperação de P(3HB) de 90,3 % com pureza de 62,2 %. Garcia *et al.* (2011) utilizaram este método para extração de P(3HB) de *C. necator* com a aplicação de bromelina. Após 10 h da ação enzimática na biomassa, os autores recuperaram 90 % de P(3HB) com 88,8 % de pureza.

A empresa Zeneca BioProducts, produtora de PHAs da marca BIOPOL<sup>®</sup>, na Inglaterra, desenvolveu um processo de extração que envolve digestão enzimática para recuperação de PHA produzido por bactéria. Neste processo, primeiramente a biomassa contendo PHA é tratada termicamente a 100 °C para que possa ocorrer a lise celular; a dissolução de ácidos nucleicos e a desnaturação de proteínas pelo aquecimento. Em seguida, a biomassa é submetida à digestão por uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases entre outras. A maior parte do material celular é hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permanece intacto (MOHAMMAD; STEINBÜCHEL, 2009).

O método de recuperação de PHAs utilizando digestão enzimática é seletivo e eficiente em termos energéticos, conduz a bons níveis de recuperação polimérica e oferece menor risco de danos ao produto. Porém, a complexidade da técnica para aplicação em grande escala, o elevado custo das enzimas empregadas e a impossibilidade de sua reutilização resultam no aumento do custo do processo, tornando

este o principal inconveniente do método (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; JACQUEL *et al.*, 2008).

#### **1.4.5 Métodos combinados biológico e químico**

Estudos reportados na literatura descrevem processos que envolvem a combinação da digestão enzimática com a aplicação de produtos químicos, como digestores e solventes, para a extração de PHAs produzidos por bactéria (HOROWITZ; BRENNAN, 2010; NEVES; MÜLLER, 2012; ZAHARI *et al.*, 2012).

##### **1.4.5.1 Enzimas e digestor químico**

Yasotha *et al.* (2006) estudaram a combinação de alcalase, SDS e Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para digerir o material não-polimérico na extração de PHA de *Pseudomonas putida*. Antes do tratamento enzimático, o caldo de cultivo foi tratado termicamente a 121 °C durante 1 min em autoclave. A suspensão celular foi então submetida à digestão com Alcalase e SDS a pH 8,5 e temperatura de 55 °C, seguido da adição de EDTA e lisozima a pH 7 e temperatura de 30 °C, por 15 min. Com este método, foi obtido um polímero com pureza de 92,6 % e recuperação de 90 %. Martino *et al.* (2014) também utilizaram o método que combina o tratamento da biomassa, de *C. necator* DSM 428, com SDS, EDTA e enzima alcalase. Segundo os autores, o SDS foi utilizado para romper as células, uma vez que penetra na bicamada lipídica, e o EDTA auxilia a ação do SDS por complexação de cátions bivalentes para a desestabilização da membrana celular externa. Após a lise celular, os *debris* celulares foram solubilizados através da digestão com a enzima alcalase (ASENJO *et al.*, 1995). O P(3HB) recuperado com este método de extração, sem a etapa de tratamento térmico anterior à digestão enzimática, apresentou pureza superior a 90 %.

### **1.4.5.2 Enzimas e solvente**

Neves e Müller (2012) desenvolveram um método de extração de P(3HB-co-3HV) produzido por *C. necator* envolvendo tratamento térmico, hidrólise enzimática e recuperação do polímero com clorofórmio. Estes autores avaliaram a ação de diferentes proteases e glicosidasas para hidrólise do material celular, após tratamento térmico em autoclave durante 15 min a 121 °C, para desestabilizar a parede celular e facilitar a hidrólise enzimática. Das nove enzimas avaliadas, a glicosidase, Celumax BC<sup>®</sup>, foi a que apresentou melhor resultado, quando o tratamento com esta enzima foi realizado a 60 °C e pH 4,0. A recuperação de P(3HB-co-3HV) foi realizada com a adição de clorofórmio ao material hidrolizado e posterior centrifugação, onde obtiveram uma solução de polímero em solvente (clorofórmio). Com a evaporação do solvente, ocorreu a formação de um filme polimérico com recuperação de 94,5 % de P(3HB-co-3HV) com 91 % de pureza.

O elevado custo das enzimas e a necessidade de etapas adicionais de digestão do material celular ou de solubilização do biopolímero com uso de solventes tornam este processo complexo e dispendioso (JACQUEL *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2014).

### **1.4.6 Método combinado Físico, biológico e químico ( Enzimas, homogeneizador à alta pressão e digestor químico)**

De acordo com Harrison, Dennis e Chase (1991), o processo de extração de PHA produzido por *C. necator* que envolve homogeneização sob alta pressão e digestão do material não polimérico por enzimas e detergente é eficiente para ruptura celular e recuperação do biopolímero após a remoção dos *debris* celulares.

Horowitz e Brennan (2010) propuseram um método de extração de PHA com a combinação de rompimento celular com digestão enzimática e tratamento mecânico e digestão dos *debris* celulares com a adição de digestores químicos para a recuperação de PHA de *Pseudomonas putida*. Assim, a enzima Benzonase (uma nuclease

comercial) foi adicionada ao caldo cultivado para desestabilizar a parede celular da bactéria e facilitar o processo de rompimento celular por homogeneização de alta pressão (15.000 psi). Posteriormente, a suspensão com células lisadas foi submetida a um segundo tratamento enzimático com Lisozima, Alcalase e Flavourzyme para a digestão do material não polimérico. Ao final desta etapa, uma solução de água e álcool cetosteárilico etoxilado (0,25 %) foi adicionada ao polímero e, por fim, ozônio foi injetado na suspensão contendo PHA, álcool, e impurezas remanescentes, para a purificação do produto. Segundo estes autores, com a adição de ozônio no processo de extração de PHA pode-se obter um produto com elevada pureza, pois este solubiliza impurezas, e livre de odores.

#### **1.4.7 Síntese dos métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias**

O Quadro 1.2 sintetiza alguns métodos de extração de PHAs, a partir de bactérias, reportados da literatura, com seus respectivos resultados de porcentagens de pureza e porcentagens de recuperação, e microrganismo produtor do biopolímero de cada processo de extração.

**Quadro 1.2** Métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.).

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência
Químico (solvente)	Clorofórmio	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 99; Rec. 78	Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002)
		<i>C.necator</i> DSM 545	Pur. 98; Rec. 94	Dalcanton (2006)
		<i>C.necator</i> DSM 545	Pur. 95; Rec. 96	Fiorese <i>et al.</i> (2009)
		<i>Zobellella denitrificans</i>	Rec. 54,5	Mohammad e Steinbüchel (2009)
		<i>Alcaligenes latus</i>	Rec. 84	Manangan e Shawaphun (2010)
		<i>C. necator</i>		Zahari <i>et al.</i> (2012)
		<i>C. necator</i>	Pur. 100; Rec. 99	Riedel <i>et al.</i> (2012)
		<i>Bacillus megaterium</i> <i>Halomonas campisallis</i> MCM B-1027	Rec. 85	Rodriguez-Contreras <i>et al.</i> (2013) Kshirsagar <i>et al.</i> (2013)
Carbonato de propileno		<i>Azobacter chroococcum</i> DSM 377	Rec. 87	Lafferty e Heinsle (1979)
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 84; Rec. 95	Fiorese <i>et al.</i> (2009)
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 99; Rec. 98	Quines <i>et al.</i> (2015)
Acetona		<i>P. putida</i> KT 2440 Biomassa	Pur. 98; Rec. 62 Rec. 80-85	Jiang, Ramsay e Ramsay (2006) Narasimhan <i>et al.</i> (2008)
		<i>P. putida</i> KT 2440	Rec. 15-17	Wampfler <i>et al.</i> (2010)
Éter Metil-terc-butílico		<i>P. putida</i> KT 2440	Rec. 15-17	Wampfler <i>et al.</i> (2010)
Metil isobutil cetona		<i>C. necator</i>	Pur. 99; Rec. 84	Riedel <i>et al.</i> (2012)

**Continuação do Quadro 1.2** Métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza(Pur.) e recuperação (Rec.).

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência
Químico (solvente)	Cloreto de metileno	<i>C. necator</i>	Pur. 98	Zinn <i>et al.</i> (2003)
		<i>Zobellella denitrificans</i> MW	Rec. 33	Mohammad e Steinbüchel (2009)
	Propionato isoamila	<i>C. necator</i>	Rec. 78	Mantellato (2011)
	Acetato de etila	<i>C. necator</i>	Pur. 95; Rec. 93	Riedel <i>et al.</i> (2012)
	Álcool isoamílico	<i>C. necator</i>	Pur. 99; Rec. 90	Mantellato (2011)
Químico (Digestão)	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	<i>C. necator</i> H16	Pur. 87; Rec. 95	Yang <i>et al.</i> (2011)
		<i>Escherichia coli</i> XL BLUE	Pur. 98; Rec. 99	Peng, Lo e Wu (2013)
	Hipoclorito de sódio	<i>C. necator</i> H16	Pur. 96; Rec. 91	Heinrich <i>et al.</i> (2012)
	SDS / Hipoclorito de sódio	<i>Alcaligenes latus</i>		Tamer, Moo-Young e Chist (1998b)
		<i>Halomonas campisalis</i>	Rec. 16	Kshirsagar <i>et al.</i> (2013)
	NaOH	<i>C. necator</i>	Pur. 96,6; Rec. 96,9	Mohammad <i>et al.</i> (2012)
	NaCl e NaOH	<i>C. necator</i>	Pur. 97,7; Rec. 97,5	Anis <i>et al.</i> (2013)

**Continuação do Quadro 1.2** Métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza(Pur.) e recuperação (Rec.).

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência
Químico (Digestão)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /NaOH/ Hipoclorito	<i>C. necator</i>	Rec. 92,6; Pur. 99,4	Yu, Porter e Jarenko (2013)
		Bactéria	Rec. 94,9; Pur. 99,9	Yu (2008)
Químico (Fluído supercrítico)	CO <sub>2</sub>	<i>C. necator</i>	Rec. 89	Hejazi, Vasheghani-Farahani e Yamini (2003)
	NaOH/CO <sub>2</sub>	<i>C. necator</i>	Rec. 81	Khosravi <i>et al.</i> (2004)
Químico (Digestor/ Solvente)	Hipoclorito de sódio e clorofórmio	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 97; Rec. 95	Ghatnekar, Pai, Ganesh (2002)
		Cultura mista	Pur. 94; Rec. 85	Salmiati e Salim (2011)
		<i>Enterobacter cloacae</i>	Rec. 94	Samrot <i>et al.</i> (2011)
		<i>Halomonas campisalis</i>	Rec. 47	Kshirsagar <i>et al.</i> (2013)
	SDS/hipoclorito de sódio/ clorofórmio	<i>Haloferax mediterranei</i>	Rec. 97	Bhattacharyya <i>et al.</i> (2012)
	NaOH/metanol/ acetona	<i>P. putida</i> KT 2440	Pur. 98 Rec. 62	Jiang, Ramsay e Ramsay (2006)
Método enzimático	Bromelina	<i>C. necator</i>	Rec. 90	Kapritchkoff <i>et al.</i> (2006)
	Pancreatina	<i>C. necator</i>	Pur. 88,8; Rec. 90	Garcia <i>et al.</i> (2011)
	Lisozima/novozyme	<i>P. putida</i>	Rec. 90; Pur. 88	Van Hee <i>et al.</i> (2004)

**Continuação do Quadro 1.2** Métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.).

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência
Método enzimático/ químico	Protease/ clorofórmio	<i>P. putida</i>	Rec. 95	Yasothea <i>et al.</i> (2006)
químico	Alcalase/SDS/ EDTA	<i>P. putida</i>	Rec. 90; Pur. 92,6	Yasothea <i>et al.</i> (2006)
		<i>C. necator</i>	Pur. 90	Martino <i>et al.</i> (2014)
	Glicosidase/clorofórmio	<i>C. necator</i>	Rec. 93,2; Pur. 94	Neves e Müller (2012)
Enzimático/ mecânico/ químico	*Enzimas/ homogeneizador /álcool /ozônio	<i>P. putida</i>		Horowitz e Brennan (2010)
Físico	Homogeneizador à alta pressão	<i>Escherichia coli</i>	Pur. 90,2; Rec. 72	Ling <i>et al.</i> (1997)
		<i>Alcaligenes latus</i>		Tamer, Moo-Young e Chisti (1998a)
		<i>P. putida</i>	Pur. 80; Rec. 46;	Van Hee <i>et al.</i> (2004)
Físico/ Químico	Homogeneizador à alta pressão/SDS	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 95; Rec. 98	Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002)
	Homogeneizador à alta pressão/Hipoclorito de sódio	<i>Escherichia coli</i> recombinante	Pur. 96,5; Rec. 80	Ling <i>et al.</i> (1997)

\* Enzimas: benzonase, alcalase, lisozima, flavourzyme; Homogeneizador à alta pressão; Álcool cetosteárico.

**Continuação do Quadro 1.2** Métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.).

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência
Físico/ Químico	Homogeneizador à alta pressão/ SDS	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 95; Rec. 98	Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002)
	Homogeneizador à alta pressão/ Hipoclorito de sódio	<i>Escherichia coli</i> recombinante	Pur. 96,5; Rec. 80	Ling <i>et al.</i> (1997)
	ultrassom/ Clorofórmio/metanol	<i>Azohydromonas lata</i> DSM 1123	Rec. 95	Penloglou, Chatzidoukas e Kiparissides (2012)
	Moinho de bolas /Clorofórmio	<i>C.necator</i>	Pur. 89; Rec. 64	Garcia (2006)
	Moinho de bolas/ NaCl e NaOH	<i>Alcaligenes latus</i>		Tamer, Moo-Young e Chicti (1998b)
Mecânico/ ultrafiltração	Prensa francesa/ Ultrafiltração	<i>C. necator</i> DSM 428		Gözke <i>et al.</i> (2012)

## **1.5 Técnicas de caracterização de polímeros**

Os biopolímeros podem ser empregados em diversas áreas, dependendo de suas características, tais como propriedades mecânicas, grau de cristalinidade, temperatura de transição vítrea, temperatura de degradação, distribuição da massa molar, entre outras. A determinação destas características é de grande importância, pois influenciam diretamente nas aplicações dos biopolímeros (DUARTE, 2004).

### **1.5.1 Determinação de massa molar**

A característica mais importante dos polímeros é sua massa molar. A massa molar e a estrutura química dos materiais poliméricos são os principais responsáveis pelas suas propriedades e, conseqüentemente, pela sua utilização em inúmeras aplicações (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2013).

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), também conhecida como cromatografia de permeação em gel (GPC) é um dos métodos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros. Esta é uma técnica de fracionamento das cadeias poliméricas de um polímero, com relação ao volume hidrodinâmico que cada uma delas ocupa em solução (CANEVAROLO, 2007).

Na cromatografia de exclusão por tamanho, é possível a determinação da massa molar numérica média ( $M_n$ ) e da massa molar ponderal média ( $M_w$ ) (CANEVAROLO, 2013). A  $M_n$  é definida como sendo a massa molar de todas as cadeias, dividida pelo número total de cadeias, isto é, é uma massa molar que leva em conta mais fortemente o número de cadeias e a  $M_w$  depende do número e da massa das moléculas em solução (CANEVAROLO, 2013). O valor da massa molar ponderal média é mais elevado que o valor da massa molar numérica média, sendo mais expressivo no campo dos polímeros, pois valoriza a característica dominante dos polímeros que é o tamanho da molécula (MANO; MENDES, 1999).

O índice de polidispersão (IP) é definido pela relação  $M_w / M_n$ . Este índice é sempre maior ou igual a um, quanto mais variados forem os tamanhos das moléculas, maior será a polidispersão (CANEVAROLO, 2007).

### **1.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise vibracional de polímeros pode fornecer informações em três aspectos estruturais: composição química, estrutura configuracional e conformacional. Além disso, fornece também indicações de forças interatômicas devido à presença de interações moleculares. A técnica de caracterização de materiais por infravermelho está baseada na observação da frequência (análise qualitativa identificando o tipo de ligação química) e intensidade de radiação infravermelha absorvida quando um feixe desta radiação atravessa a amostra (CANEVAROLO, 2013).

As moléculas simples ou macromoléculas são constituídas de átomos e formam uma estrutura tridimensional, com distâncias de ligação química e ângulo de ligações definidas, apresentando uma determinada simetria molecular. A estrutura molecular é responsável pelas diferentes propriedades moleculares, e por esta razão seu conhecimento é de grande importância (CANEVAROLO, 2007). A espectroscopia de infravermelho mede a excitação vibracional dos átomos de uma ligação química. As posições das linhas de absorção no espectro de infravermelho dependem do tipo de grupo funcional presente. Cada grupo funcional ligado a diferentes átomos possui uma banda diferente no espectro. A técnica de FTIR pode ser empregada para a identificação e caracterização de grupos funcionais de polímeros e em estudos de estrutura de macromoléculas.

As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a

interpretação do espectro, visando a caracterização de grupamentos funcionais nele presentes. (SPIER, 2005).

### **1.5.3 Análises Térmicas**

Por serem materiais orgânicos, as características físico-químicas dos polímeros são fortemente dependentes da temperatura. O método de análise térmica é definido como “um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada” (WENDLANDT, 1985; HAINES, 1995; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; CANEVAROLO, 2007). Técnicas de análise térmica, tais como, termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são abordadas a seguir (CANEVAROLO, 2007).

#### ***1.5.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA)***

A análise termogravimétrica é definida como um processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra (perda ou ganho) em função da temperatura (varredura de temperatura), ou do tempo a uma temperatura constante (modo isotérmico) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa de polímeros, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante e a temperatura em que começam a se decompor (CANEVAROLO, 2007). É uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros tantos materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (SPIER, 2005; CANEVAROLO, 2007).

A análise termogravimétrica (TGA) fornece as temperaturas de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_p$ ), onde é possível avaliar a degradação térmica e a perda de massa dos polímeros (CANEVAROLO, 2013; SPIER, 2005).

### ***1.5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)***

Quando uma substância sofre mudança física ou química, observa-se uma variação correspondente na entalpia. Se o processo for promovido por uma variação controlada de temperatura, isto constitui a base da técnica conhecida como calorimetria exploratória diferencial (DSC) (CANEVAROLO, 2013). A variação em função da temperatura é detectada pela medida da variação de entalpia entre o material em estudo, sendo usada uma amostra inerte como referência ou padrão (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica utilizada para determinar as entalpias dos processos de fusão e cristalização (endotérmico e exotérmico). O equipamento geralmente varre linearmente uma faixa de temperatura a uma determinada velocidade de aquecimento. No DSC do tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são aquecidas pela mesma fonte de calor e a diferença de temperatura entre ambas é monitorada em função da temperatura ou do tempo (WENDLANDT, 1985).

As principais aplicações da técnica de DSC são: medir as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), cristalização ( $T_c$ ), etc. Medir as características térmicas do material como: entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), grau de cristalinidade (%C), etc (CANEVAROLO, 2013).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) corresponde ao valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento do polímero de uma temperatura muito baixa para valores mais elevados, permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade. Abaixo da  $T_g$  o polímero não apresenta energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação a outra, está no estado vítreo caracterizado pela dureza e rigidez. Na temperatura de fusão, a energia

do sistema atinge o nível necessário para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias da fase cristalina, desfazendo a estrutura regular de empacotamento, mudando do estado borrachoso para o estado viscoso (fundido). Durante o resfriamento de um polímero semicristalino a partir de seu estado fundido, ele atingirá uma temperatura baixa o suficiente ( $T_c$ ) para que, em um dado ponto dentro da massa polimérica fundida, cadeias poliméricas se organizem espacialmente de forma regular formando uma estrutura cristalina (CANEVAROLO, 2013).

## **1.6 Considerações finais**

Como exposto nesse capítulo, diversos aspectos a cerca da extração de PHAs foram revisados, tais como, o método químico, que faz uso de solventes e é extensivamente utilizado por proporcionar altos percentuais de recuperação de PHAs; a utilização de digestores químicos também é bastante estudada por proporcionar resultados de recuperação polimérica significativos. A maioria dos estudos realizados com métodos químicos faz uso de solventes e digestores tóxicos e altamente voláteis, sendo contraditórios ao fato de que estes polímeros são amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica.

Adicionalmente, os métodos biológico e físico são uma alternativa positiva para a extração de PHAs, pois não há a necessidade de inserção de produtos químicos ao processo, mas apresentam resultados de recuperação polimérica inferiores aos encontrados nos demais métodos. Por outro lado, estes métodos têm sua eficácia aumentada quando combinados aos químicos. A combinação de métodos de extração possui potencial neste contexto, pois facilita o rompimento celular, a recuperação polimérica e muitas vezes, reduz o tempo de processo, bem como a aplicação de produtos químicos tóxicos.

As estratégias de extração de PHAs em desenvolvimento abordados neste artigo indicam claramente que a maioria dos métodos visa, sobretudo, a obtenção de elevados percentuais de recuperação e

pureza de biopolímero. No entanto, é imprescindível a realização de estudos que abordem os métodos de extração e relacionem a eficiência do processo à influência do mesmo nas características do produto final, como na massa molar, por exemplo. Esta característica polimérica é de extrema importância, pois está diretamente relacionada à aplicação do polímero e ao tempo de degradação do mesmo, quando descartado.

Os PHAs são potenciais substitutos aos plásticos de origem petroquímica, por possuírem propriedades semelhantes aos materiais termoplásticos, serem biodegradáveis e passíveis de produção a partir de matérias-primas renováveis, porém a sua aplicabilidade está diretamente ligada aos processos de produção e de extração. Por essas razões, na etapa de extração se deve buscar: reduzir as perdas de produto, obter um produto de elevada pureza e com suas características físicas e térmicas preservadas, obter um produto que se enquadre no termo sustentável, onde se utilize produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente, reduzir custos de processo através da reutilização dos produtos químicos (solventes e não solventes) e desenvolver um processo possível de ser aplicado em escala industrial.

O Brasil dispõe de matérias-primas renováveis de baixo custo (fontes de carbono e energia) e mão-de-obra qualificada, formada pelos diversos grupos de pesquisa estabelecidos, que oferece oportunidades promissoras para a produção de biopolímeros em grande escala no país. Neste sentido, para os PHAs tornarem-se competitivos com os plásticos petroquímicos, são necessárias as seguintes medidas:

- Redução dos custos de produção com a utilização de substratos de baixo custo, como resíduos da indústria de alimentos;
- Obtenção de um produto com características semelhantes e/ou superiores às apresentadas por alguns plásticos convencionais e que possam ser aplicados no desenvolvimento de produtos de alto valor agregado, como o uso em aplicações médicas;
- Na etapa de produção, além da busca por altas densidades celulares e produtividades de polímero, são necessárias pesquisas com o propósito de desenvolvimento de estratégias de

cultivo que proporcionem PHAs com elevados índices de massa molar, bem como, o desenvolvimento de cepas geneticamente modificadas capazes de sintetizar PHAs com massas molares comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica;

- Desenvolvimento de políticas públicas de incentivo à produção de PHAs no país, como estabelecer regulamentação obrigatória da mistura deste biopolímero ao polímero de origem petroquímica em aplicações industriais;
- Estabelecimento de ações concretas de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento pelos órgãos públicos;
- Incentivos fiscais às empresas que desenvolvam tecnologias inovadoras para processos de produção que consigam viabilizar um desenvolvimento sustentável, que é o caso da produção de biopolímeros biodegradáveis;
- Desenvolvimento de programas governamentais para informar, esclarecer e incentivar a população da importância da utilização de bioprodutos sustentáveis.

### **INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO DOS MÉTODOS MECÂNICOS NA RECUPERAÇÃO E PUREZA DO POLÍMERO EXTRAÍDO**

Este capítulo aborda o estudo da influência das variáveis de processo dos métodos mecânicos, homogeneizador à alta pressão e ultrassom, na recuperação e pureza de biopolímero extraído de *Cupriavidus necator*. A aplicação de métodos mecânicos para extração de biopolímero tem seu potencial de recuperação aumentado quando associado a um método químico. Por este motivo, a aplicação de métodos mecânicos de extração de P(3HB) em conjunto com o uso de solventes se mostra uma boa alternativa de processo, pois o tratamento mecânico é aplicado na suspensão celular para o rompimento ou desestabilização da parede celular e o solvente é utilizado para solubilizar e recuperar o biopolímero, visando a obtenção de elevados rendimentos de P(3HB).

## 2.1 Introdução

O processo de extração de P(3HB) envolve diferentes operações unitárias, cujos objetivos principais são: reduzir as perdas de produto, obter um produto de elevada pureza e com características físicas e térmicas preservadas, priorizar a utilização de produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente e obter produtos com custos de processo reduzidos, incluindo a reutilização dos produtos químicos (QUINES *et al.*, 2015). Neste contexto, vários métodos de extração de P(3HB) têm sido reportados na literatura. Estes incluem a extração com solventes, digestão química, digestão enzimática, extração mecânica com homogeneizador à alta pressão e ultrassom, extração com fluido supercrítico ou ainda, a aplicação destes métodos combinados (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; DALCANTON, 2006; VALAPPIL *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2008; FIORESE *et al.*, 2009; NEVES; MÜLLER, 2012; JAVERS; GIBBONS; RAYNIE, 2012).

Os métodos mecânicos de extração de P(3HB) são utilizados em conjunto com os químicos, onde o método mecânico é utilizado para desestabilizar e/ou romper a parede celular e o químico (solvente) para solubilizar o material polimérico com a finalidade de melhorar a recuperação de P(3HB) no processo de extração (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS; KIPARISSIDES, 2012).

Neste sentido, neste capítulo será abordada a aplicação de métodos mecânicos, homogeneizador à alta pressão e ultrassom; em conjunto com carbonato de propileno para a extração de P(3HB). Cabe ressaltar que não há na literatura estudos com aplicação destes métodos mecânicos combinados a este solvente para extração de P(3HB). Este trabalho teve como objetivo definir as melhores condições de aplicação do homogeneizador à alta pressão (pressão de operação e número de passagens da suspensão pelo equipamento) e do ultrassom (potência e tempo do ciclo de aplicação) que forneçam altos valores de pureza e recuperação do biopolímero extraído. E ainda, no método de extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, avaliar a

influência das variáveis do processo à alta pressão na massa molar do biopolímero extraído.

## **2.2 Material e Métodos**

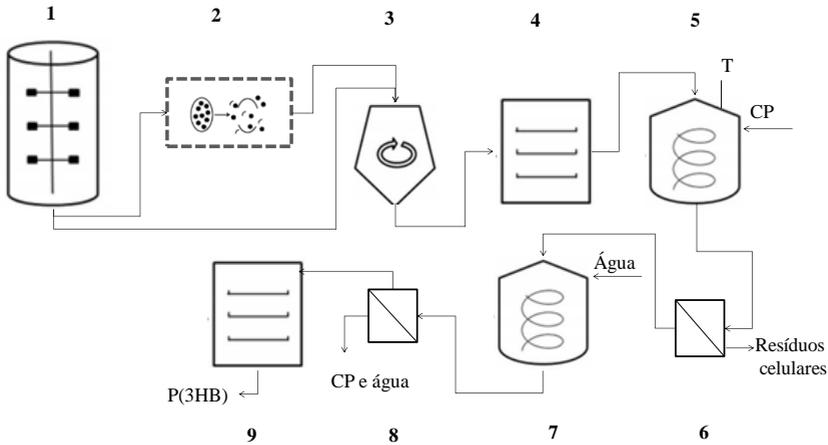
### **2.2.1 Biomassa**

As biomassas de *Cupriavidus necator* DSM 545 contendo P(3HB) foram produzidas utilizando-se glicose e frutose como substrato e nitrogênio como nutriente limitante. Neste capítulo as biomassas utilizadas foram provenientes de diferentes cultivos e, conseqüentemente, continham diferentes porcentagens de P(3HB) acumulado.

### **2.2.2 Extração de P(3HB)**

A Figura 2.1 mostra o fluxograma das etapas de extração com carbonato de propileno (método controle, sem tratamento da biomassa) e com tratamento da biomassa (métodos mecânicos) no início do processo de extração e recuperação polimérica com carbonato de propileno, baseado no trabalho de Quines *et al.* (2015). As etapas envolvidas no processo de extração de P(3HB) com os diferentes métodos, o que utiliza homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno e o que combina a aplicação de ultrassom com este solvente, serão descritas nos itens a seguir, no qual a descrição de cada etapa estará identificada com a numeração apresentada na Figura 2.1.

**Figura 2.1.** Etapas envolvidas no processo de extração de P(3HB), produzido por *C. necator*, com carbonato de propileno a partir de biomassa bacteriana.



1 – Biorreator (células com polímero acumulado e meio de cultivo); 2 - Tratamento da biomassa (homogeneizador ou ultrassom); 3 – Separação das células do caldo de cultivo por centrifugação a 2000 g por 15 min e lavagem com água destilada; 4 – Secagem das células a 65 °C durante 24 h; 5 – Mistura das células com carbonato de propileno (CP) sob agitação e aquecimento (150 °C) durante 45 min, no qual ocorre a solubilização do material polimérico no solvente; 6 – Filtração a quente (100 °C) para separação dos resíduos celulares da solução de polímero com solvente; 7 – Precipitação do polímero com adição de água destilada sob agitação à temperatura ambiente; 8 – Filtração à temperatura ambiente para separação do material polimérico da água e do solvente e saída do solvente e água para posterior recuperação 9 – Secagem do biopolímero a 65 °C por 24 h.

### 2.2.2.1 Extração com carbonato de propileno (controle)

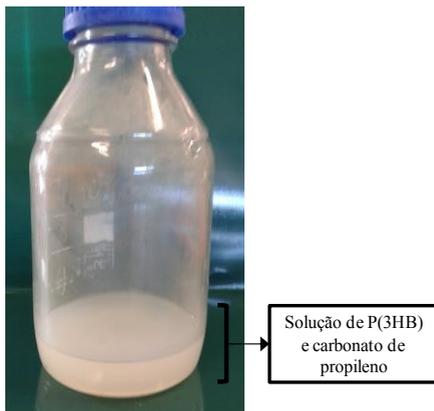
Neste método, o carbonato de propileno foi aplicado com a finalidade de permear na membrana celular da bactéria com biopolímero acumulado, solubilizar e recuperar o P(3HB).

Os ensaios de extração foram conduzidos sem o tratamento da biomassa (etapa 2 da Figura 2.1). Após o cultivo (etapa 1 da Figura 2.1), a biomassa foi centrifugada e submetida à secagem (etapas 3 e 4 da Figura 2.1). A concentração de P(3HB) da biomassa de *C. necator* utilizada nestes ensaios (duplicata) era de 73 % (m/m). A determinação da concentração de P(3HB) nas células foi realizada de acordo com o descrito no item 2.2.3.

Para a recuperação do biopolímero, foi utilizado o método baseado no estudo de Quines *et al.* (2015), com modificação no volume de carbonato de propileno utilizado para lavagem do retido (de 30 para 60 mL), após a primeira filtração do processo. O método se baseia no uso de 0,15 g células secas para cada 1 mL de carbonato de propileno (Sigma Aldrich com pureza de 99,7 %), aquecido a 150 °C. Os experimentos foram realizados em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 basic), sob agitação constante de 120 rpm.

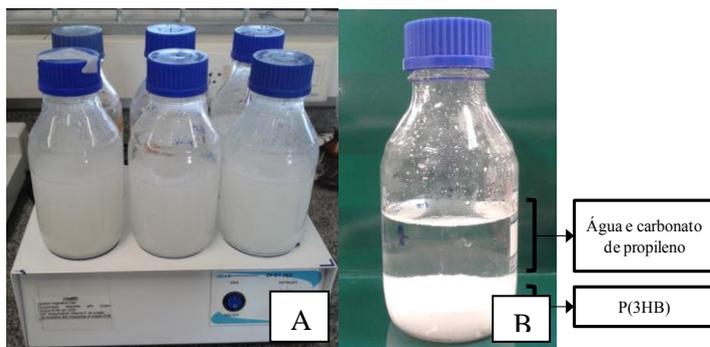
A massa de células secas (4 g) foi suspensa em 26 mL de carbonato de propileno aquecido durante 45 min (etapa 5 da Figura 2.1). A suspensão (carbonato de propileno, *debris* celulares e P(3HB)) obtida após o tempo de extração, foi submetida à filtração a quente sob vácuo (etapa 6 da Figura 2.1) em aparato composto por kitassato, funil de porcelana, filtro de papel qualitativo com poro de 14 µm e diâmetro de 12,5 cm (Qualy®) e bomba a vácuo J. B. Industries – DV 200N 250. Os sólidos, *debris* celulares, retidos no filtro foram lavados com 60 mL de carbonato de propileno aquecido à mesma temperatura da extração. O filtrado contendo P(3HB), dissolvido em solvente, permaneceu em repouso por 12 h à temperatura ambiente (Conforme se pode observar na Figura 2.2).

**Figura 2.2.** Solução de carbonato de propileno e polímero após a primeira filtração do processo de extração.



Após o tempo de repouso, água destilada foi adicionada em uma relação 4:1 (água:solvente) em relação ao volume de solvente utilizado na extração (incluindo o volume de solvente utilizado para lavagem após a primeira filtração) à solução de polímero e solvente, para a precipitação do polímero. Em seguida, a suspensão, composta por água, carbonato de propileno e polímero, foi submetida à agitação constante por 12 h (etapa 7 da Figura 2.1), conforme pode ser observado na Figura 2.3 A. Na Figura 2.3 B está apresentada a suspensão, composta por água, carbonato de propileno e P(3HB) precipitado, sem agitação.

**Figura 2.3.** Suspensão de água, carbonato de propileno e P(3HB) sob agitação (A) e sem agitação (B).



Posteriormente, a suspensão foi submetida a uma segunda filtração, nas mesmas condições que a filtração anterior, porém à temperatura ambiente (etapa 8 da Figura 2.1). O material polimérico que ficou retido no filtro foi lavado com 200 mL de água destilada (Figura 2.4 A) e este filtro foi disposto em estufa a 65 °C por 24 h, para secagem do P(3HB) extraído (Figura 2.4 B) (etapa 9 da Figura 2.1).

**Figura 2.4.** Aparato utilizado na filtração para separação do P(3HB) da solução formada por água e solvente (A) e biopolímero extraído após a etapa de filtração e secagem (B).



### ***2.2.2.2 Extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno***

#### **2.2.2.2.1 Tratamento da biomassa com homogeneizador**

O método de extração com alta pressão e carbonato de propileno se baseia no rompimento da célula bacteriana, com a aplicação de homogeneizador à alta pressão, e na recuperação do biopolímero, a partir da solubilização deste pelo solvente. A biomassa utilizada neste estudo continha 42,5 % de P(3HB).

O equipamento utilizado foi um homogeneizador GEA Niro Soavi, modelo NS 1001 L Panda 2K, conforme pode ser observado na Figura 2.5, com vazão de  $9 \text{ L.h}^{-1}$ . As variáveis do processo de homogeneização sob alta pressão, pressão e número de passagens, foram estabelecidas pela empresa GEA Niro Soavi Brasil, que cedeu o equipamento para o presente estudo.

**Figura 2.5.** Homogeneizador à alta pressão Niro Soavi Panda 2K, modelo 1001 L, utilizado neste estudo.



Ao término do cultivo (etapa 1 da Figura 2.1) realizaram-se três testes com variação de pressão de homogeneização e o número de passagens da suspensão celular pelo equipamento (etapa 2 da Figura 2.1): pressão 1300 bar e duas passagens (Ensaio 1); pressão 1300 bar e três passagens (Ensaio 2); pressão 1200 bar e três passagens (Ensaio 3).

A suspensão celular foi introduzida no reservatório de entrada de produto em temperatura ambiente (23 °C) e processada. A cada passagem da suspensão celular pelo equipamento (1, 2 e 3), à alta pressão (pressão de operação), uma amostra foi coletada e centrifugada a 2.000 g durante 15 min e o precipitado foi seco a 65 °C por 24 h.

Na Figura 2.6 é apresentada a suspensão celular após a etapa de homogeneização à alta pressão.

**Figura 2.6.** Suspensão celular após a etapa de homogeneização à alta pressão com 1, 2 e 3 passagens.



#### **2.2.2.2.2 Recuperação de P(3HB)**

O método de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno empregado foi de acordo com o descrito no item (2.2.2.1).

#### ***2.2.2.3 Extração com ultrassom e carbonato de propileno***

##### **2.2.2.3.1 Tratamento da biomassa com ultrassom**

O ultrassom utilizado para o tratamento da suspensão celular foi o Ultrasonic Dismembrator 500, com potência de 400 W e frequência de 20 kHz da marca Fisher Scientific (representado na Figura 2.7), constituído por um bastão de aço inox, o qual emite ondas de ultrassom

que produzem cavitação no sistema. A biomassa de *C. necator* utilizada nestes ensaios apresentava 69,0 % (m/m) de P(3HB).

**Figura 2.7.** Equipamento de ultrassom utilizado no tratamento da biomassa.



Ao término do cultivo (etapa 1 da Figura 2.1), a suspensão celular foi tratada com aplicação de ultrassom (etapa 2 da Figura 2.1). Para a ultrassonificação da suspensão celular, o volume de 35 mL desta foi disposto em um frasco de vidro de 50 mL, a fim de assegurar maior homogeneidade do sistema e a propagação das ondas em todo o volume de amostra, e colocada em contato com o bastão de aço inox.

Para a definição das melhores condições de aplicação do ultrassom, na recuperação e pureza do biopolímero extraído, foram realizados seis ensaios em diferentes condições de pulso de aplicação do ultrassom e da potência aplicada. O pulso de aplicação corresponde ao tempo em que o equipamento emite a onda ultrassônica à amostra. Durante a aplicação do ultrassom, os ensaios foram realizados em banho de gelo com a finalidade de evitar o aumento de temperatura e, desta maneira, influenciar nos resultados de extração.

As condições de ultrassonificação, potência e tempo do pulso de aplicação, foram estabelecidas com base em estudos reportados na literatura para rompimento celular e estão apresentadas na Tabela 2.1 (JAYAKAR; REKHA; SINGHAL, 2012; LOURENÇO, 2012).

**Tabela 2.1.** Condições dos ensaios de ultrassom com variação da potência, do tempo do pulso de ultrassom em um volume de suspensão celular de 35 mL. Em cada ensaio foram realizados três ciclos de aplicação do ultrassom, com tempo de espera de 30 s entre cada pulso, na suspensão celular.

Ensaio	*Potência (W)	*Tempo do pulso de ultrassom (s)
1	200	59
2	280	59
3	200	20
4	280	20

\*Potência e tempo do pulso de aplicação baseado em dados disponíveis na literatura para rompimento celular com ultrassom (JAYAKAR; REKHA; SINGHAL, 2012; LOURENÇO, 2012).

Posteriormente ao tratamento da suspensão celular com ultrassom, a biomassa foi centrifugada a 2000 g por 15 min (etapa 3 da Figura 2.1) e lavada com água destilada, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado (células com P(3HB)) foi submetido à secagem a 65 °C por 24 h (etapa 4 da Figura 2.1).

#### **2.2.2.3.2 Recuperação de P(3HB)**

O método de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno empregado foi de acordo com o descrito no item (2.2.2.1).

### 2.2.3 Determinação de P(3HB)

A concentração de P(3HB) nas amostras de polímero extraído foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise descrito por Brandl *et al.* (1988).

Em uma massa conhecida de amostra de P(3HB) foram acrescentados 2 mL de metanol acidificado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  15 %), contendo ácido benzóico  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ , como padrão interno, e 2 mL de clorofórmio. Os tubos de ensaio foram fechados, agitados em vórtex e colocados em banho a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 1 h. Decorrido este tempo, os tubos de ensaio foram retirados do banho e agitados em vórtex, voltando ao banho por mais 1 h 20 min. Enfim, as amostras foram retiradas do banho e submetidas a um banho de gelo para interromper a reação. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 s para formação de duas fases. Com uma pipeta *Pasteur*, a fase orgânica (inferior) (clorofórmio + P(3HB)) foi retirada e colocada em *eppendorfs* para análise em cromatografia gasosa (CG).

Na determinação da concentração de P(3HB) na biomassa de cada cultivo utilizou-se o mesmo método citado, onde, após o cultivo, as amostras com volume conhecido de meio de cultura foram centrifugadas a 14000 rpm durante 3 min. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise (conforme descrito acima).

Para a elaboração da curva de P(3HB), o polímero puro (P(3HB) da Sigma-Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,002 e 0,0286 g, e submetido à metanólise.

A determinação quantitativa de P(3HB) foi realizada por cromatografia gasosa (cromatógrafo modelo CG2014, da marca Shimadzu). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna empacotada Restek Rtx-Stabilwax Silcoport W 110/120. As amostras metanolizadas foram injetadas ( $1 \mu\text{L}$ ) no equipamento utilizando nitrogênio como gás de arraste. As condições de operação utilizadas foram: vazão do gás de arraste de  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura do injetor de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura da coluna de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  e temperatura do detector de  $270 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para a determinação da pureza do P(3HB) extraído (%), utilizou-se a Equação 2.1.

$$pureza = \frac{m_{P(3HB)}}{m_t} \times 100 \quad (2.1)$$

Onde:

$m_{P(3HB)}$  = massa de biopolímero detectada por cromatografia (g)

$m_t$  = massa do material extraído utilizado para a análise cromatográfica (g).

A partir da pureza do P(3HB) extraído, foi possível determinar a recuperação de polímero extraído em % por meio das Equações 2.2 e 2.3.

$$recuperação = \frac{m_p}{m_i} \times 100 \quad (2.2)$$

$$m_p = m_f \times pureza \quad (2.3)$$

Onde:

$m_p$  = massa de P(3HB) puro (g)

$m_f$  = massa de P(3HB) obtido após a extração (g)

$m_i$  = massa total de P(3HB) nas células antes da extração (g).

#### **2.2.4 Determinação da massa molar de P(3HB)**

A determinação da massa molar dos polímeros extraídos foi realizada apenas nas amostras de P(3HB) obtidas a partir do método de extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno.

As determinações de massa molar média numérica (Mn), massa molar ponderal média (Mw) e índice de polidispersão (IP) dos P(3HB)

extraídos neste trabalho, foram realizadas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

A análise de GPC foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) *Waters Instruments* equipado com bomba isocrática, modelo 1515, detector por índice de refração, modelo 2414; temperatura do detector de 35 °C, quatro colunas de permeação em gel *Waters Styragel* (7,8 x 300 mm) em THF ligadas em série com faixa de exclusão de 100 a 5.000 (HR1), 500 a 20.000 (HR2), 500 a 30.000 (HR3), e 5000 a 500.000 (HR4), temperatura do set de colunas de 40 °C. Clorofórmio foi utilizado como solvente do polímero na fase móvel e o eluente da coluna foi o tetraidrofurano (THF) puro. Para a calibração do sistema, foram utilizados padrões de poliestireno (PS) com massas molares de 400, 950, 2.800, 6.400, 17.000, 43.000, 110.000 e 430.000 Da. As amostras de P(3HB) foram diluídas na razão de 5 mg mL<sup>-1</sup> de clorofórmio e mantidas em repouso durante 24 h para a total dissolução do polímero no solvente. O volume de injeção foi de 200 µL, sob fluxo de solvente constante de 1 mL min<sup>-1</sup>.

## **2.3 Resultados e Discussão**

### **2.3.1 Influência das variáveis de homogeneização na extração com alta pressão e carbonato de propileno**

Os ensaios de extração, com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis de homogeneização sobre as respostas de recuperação, pureza e massa molar do biopolímero, foram realizados em duplicata (Tabela 2.2). Para efeito comparativo um ensaio de extração controle, sem tratamento da biomassa, foi realizado e os resultados de recuperação e pureza estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Recuperação, pureza, massa molar (Mw) e índice de polidispersão (IP) de P(3HB) obtidos na extração com homogeneizador à alta pressão e solubilização com carbonato de propileno, com variação da pressão de operação e do número de passagens (N<sup>o</sup> pas.) da biomassa pelo equipamento, e resultados de recuperação e pureza para a extração controle. Os dados de recuperação e pureza correspondem a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios.

Pressão (bar)	N <sup>o</sup> pas.	Recuperação (m/m) (%)	Pureza (m/m) (%)	Massa molar (Mw) (Da)	Ip
1300	2	97,7 ± 1,25	97,8 ± 1,25	3,34x10 <sup>5</sup>	2,07
1300	3	96,1 ± 2,85	98,6 ± 0,41	1,68x10 <sup>5</sup>	1,81
1200	3	91,3 ± 1,0	96,3 ± 2,67	1,85x10 <sup>5</sup>	1,96
Controle	--	81,7 ± 0,78	98,5±0,5	--	--

(--) Dados não determinados.

Embora a pressão de operação e o número de passagens da suspensão celular pelo equipamento sejam variáveis importantes no processo de extração, estas não influenciaram os resultados de pureza dos biopolímeros obtidos neste estudo, conforme pode ser observado nos valores apresentados na Tabela 2.2, sendo que a pureza variou entre 96,3 a 98,6 % (m/m). Os resultados de recuperação de P(3HB), com o método que combina homogeneização sob alta pressão e carbonato de propileno, variaram entre 91,3 e 97,7 % (m/m). A pressão de homogeneização influenciou nos valores de recuperação de P(3HB), visto que, com um incremento da pressão de 1200 para 1300 bar e mesmo número de passagens obtiveram-se rendimentos de P(3HB) de 91,3 e 96,1 % (m/m), respectivamente. A extração realizada com método controle apresentou recuperação de 81,7 % (m/m) com pureza de 98,5 % (m/m). Estes resultados indicam que com a aplicação da homogeneização sob alta pressão no processo de extração ocorre o rompimento e/ou desestabilização da parede celular, o que facilita a ação do solvente na solubilização do polímero e, conseqüentemente, maiores porcentagens de recuperação de P(3HB) extraído. Os resultados mostraram ainda que o número de passagens da suspensão celular pelo

homogeneizador não influenciou nos resultados de porcentagens de recuperação obtidos.

Com relação à aplicação de homogeneizador à alta pressão no processo de *downstream*, alguns autores desenvolveram tecnologias de extração de P(3HB), a partir de bactérias, com homogeneizador à alta pressão associado a tratamento químico. Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002) utilizaram homogeneizador à alta pressão e dodecil sulfato de sódio (5 % m/v) para extração de biopolímero produzido por *Methylobacterium* sp, e obtiveram recuperação polimérica de 98 % com 95 % de pureza (m/m). Ling *et al.* (1997) realizaram extração de P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante com homogeneizador à alta pressão e hipoclorito de sódio, e obtiveram 80 % (m/m) de recuperação polimérica com pureza de 96,5 % (m/m). Segundo esses autores, a utilização de homogeneizador à alta pressão na extração de P(3HB) pode acarretar na formação de resíduos celulares muito pequenos, que interferem na pureza do biopolímero extraído. Nos dois processos de extração citados, o material polimérico foi separado dos *debris* celulares por centrifugação, podendo resíduos celulares remanescentes ficarem aderidos ao P(3HB). No entanto, acredita-se que essa interferência de *debris* celulares não tenha influenciado na pureza do P(3HB) extraído no presente estudo, visto que no método de extração aplicado, a separação dessas impurezas da solução, composta por polímero e solvente, foi realizada por filtração e os resíduos celulares sólidos foram retentados nesta etapa. Essa diferença entre as purezas dos polímeros extraídos pode estar relacionada à possibilidade de um residual de solvente no material polimérico.

Tamer, Moo-Young e Chisti (1998a) estudaram o rompimento celular de *Alcaligenes latus* com homogeneizador à alta pressão (900 bar) para a recuperação de P(3HB). Estes autores avaliaram a eficiência do método com a variação da concentração celular do caldo cultivado e o número de passagens da suspensão pelo equipamento. Foi observado que o desempenho do homogeneizador depende da concentração da biomassa, ou seja, quanto mais concentrado o caldo cultivado (17 a 45 g L<sup>-1</sup>) maior a eficiência da alta pressão no

rompimento celular. Os autores também observaram que o número de passagens pelo homogeneizador também apresentou influência no processo de recuperação de P(3HB), pois a cada passagem da suspensão pelo equipamento foram obtidos resultados de recuperação cada vez maiores, até a sexta passagem. O mesmo comportamento não foi observado no presente estudo, uma vez que, com a variação do número de passagens (2 para 3) não foi observado incremento na porcentagem de recuperação de P(3HB). Isso pode ser atribuído à pressão de homogeneização utilizada neste trabalho ser superior à aplicada no trabalho citado, além do fato do processo de homogeneização sob alta pressão ser combinado com carbonato de propileno para a recuperação de P(3HB).

O número de passagens da suspensão celular pelo homogeneizador à alta pressão, influenciou diretamente na redução da massa molar do biopolímero, visto que com uma passagem a mais do caldo cultivado pelo homogeneizador a 1300 bar, a massa molar do polímero reduziu em 50 %, de  $3,34 \times 10^5$  para  $1,68 \times 10^5$  Da. A variação de pressão apresentou influência na massa molar menos evidente que a observada para a variabilidade do número de passagens, pois com um incremento na pressão do processo, 1200 para 1300 bar, e mesmo número de passagens pelo equipamento (três) obteve-se uma redução de 10 % da massa molar. As Figuras A.1, A.2 e A.3 do Anexo I ilustram os picos obtidos pela análise de GPC para quantificação da massa molar das amostras poliméricas apresentadas na Tabela 2.2.

Segundo Canevarolo (2007), um polímero quando é submetido a um processo de cisalhamento, tem suas cadeias principais mais longas rompidas durante o fluxo cisalhante, por serem mais tensionadas favorecendo a sua cisão e conseqüente redução de sua massa molar. No processo de homogeneização por alta pressão de biomassa bacteriana, para recuperação de produto acumulado de forma intracelular, o rompimento celular está baseado na passagem da suspensão, por uma válvula com orifício estreito, resultando em uma despressurização e grande aumento da velocidade de escoamento, com conseqüente cavitação e alta tensão de cisalhamento (TRIBST; FRANCHI;

CRISTIANINI, 2008). No presente estudo, foi observado que esse processo não só ocasionou o rompimento celular, como também a cisão das cadeias do polímero, visto que a cada ciclo de alta pressão da biomassa contendo o polímero obteve-se também uma maior redução da massa molar.

Kivelä *et al.* (2010) e Villay *et al.* (2012) estudaram o efeito de múltiplas passagens de polissacarídeos em homogeneizador à alta pressão e observaram que o processo causou uma despolimerização, quebra de cadeia e redução do tamanho molecular a cada passagem. De acordo com Lagoueyte e Paquin (1998), a cadeia polimérica pode se tornar mais susceptível às degradações induzidas pelo processo, uma vez que a homogeneização à alta pressão deixa exposto um grande número de agrupamentos que se tornam mais sensíveis a cada passagem pelo homogeneizador.

Os índices de polidispersão ficaram entre 1,81 e 2,07, valores esses inferiores aos obtidos por Fiorese *et al.* (2009), que obtiveram 3,1. A polidispersidade de um polímero caracteriza a homogeneidade da distribuição do tamanho médio das cadeias poliméricas, quanto mais próximo de 1 mais homogênea é a cadeia polimérica (CANEVAROLO, 2007).

O ensaio com pressão de 1300 bar e duas passagens da biomassa pelo homogeneizador (Ensaio 1) foi o que apresentou a menor redução da massa molar do polímero, com porcentagem de recuperação e pureza de 97,7 % e 97,8 % (m/m), respectivamente. Este resultado sugere a utilização da pressão de 1300 bar e 2 passagens da biomassa pelo equipamento no método combinado de extração com homogeneizador e carbonato de propileno, como melhor condição testada.

### 2.3.2 Influência das variáveis de processo na extração com ultrassom e carbonato de propileno

Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados da porcentagem de recuperação do P(3HB) obtido por extração com carbonato de propileno com a utilização do tratamento da biomassa com rompimento mecânico (ultrassom), variando-se a potência e o tempo do ciclo de aplicação.

**Tabela 2.3.** Recuperação e pureza de P(3HB) extraído com ultrassom e carbonato de propileno, variando-se a potência e o tempo de aplicação do ultrassom (tempo ultrassom), comparado ao método de extração controle. Em cada ensaio foram realizados três ciclos de aplicação do ultrassom na suspensão celular. A extração controle corresponde a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios.

Ensaio	Potência (W)	Tempo ultrassom (s)	Recuperação (%)	Pureza (%)
1	200	59	92,2	99,0
2	280	59	91,7	99,0
3	200	20	86,2	99,0
4	280	20	85,1	99,0
Controle	--	--	81,7 ± 0,78	98,5±0,5

As extrações realizadas nas suspensões que sofreram os tratamentos dos ensaios 1 e 2, com potências de 200 e 280 W, respectivamente, ciclo de aplicação de 59 s, foram as que apresentaram as maiores porcentagens de recuperação de P(3HB), de 92 %. De acordo com Lourenço (2012), a intensidade da cavitação e, conseqüentemente, de rompimento celular aumenta com o aumento da potência (ou amplitude) aplicada no sistema. O ensaio 1 ainda apresentou a vantagem de utilizar potência inferior ao ensaio 2, o que resultaria em economia de energia no processo. Com relação à porcentagem de pureza do biopolímero extraído, nota-se que esta grandeza não sofreu influência

nos ensaios realizados, uma vez que todos apresentaram pureza de 99 % de P(3HB). Estes resultados de alta pureza observados na Tabela 2.3 se devem à alta solubilidade do P(3HB) no carbonato de propileno e à facilidade de separação do polímero do solvente, pela precipitação e lavagem do polímero com água destilada de acordo com o método proposto por Quines *et al.* (2015).

Lafferty e Heinzle (1979) utilizaram este mesmo solvente para extração de P(3HB) e obtiveram recuperação, a partir de células secas de *Azotobacter chroococcum* DSM 377, de 87 %, na temperatura de 140 °C e tempo de contato de 30 min. Através dos resultados obtidos pelos autores citados, é evidente a importância do tratamento celular com ultrassom, antes da etapa de recuperação do biopolímero com carbonato de propileno, para a obtenção de porcentagens de recuperação de P(3HB) mais elevadas no processo de extração.

A extração realizada com o método controle apresentou recuperação de polímero de 81,7 % (m/m) com pureza de 98,5 % (m/m), logo a aplicação de ultrassom na suspensão celular mostrou-se eficaz nos resultados de recuperação de P(3HB), pois com a combinação de ultrassom e solvente de baixa toxicidade, carbonato de propileno, obteve-se uma elevada recuperação (92 % m/m) de biopolímero com 99 % (m/m) de pureza.

Segundo Bigelow *et al.* (2008), alguns fatores como frequência e amplitude (potência do ultrassom) do equipamento, assim como temperatura e viscosidade do líquido influenciam no grau de cavitação e, conseqüentemente, na eficiência do rompimento celular. Neves (2006) estudou o rompimento de células de levedura com ultrassom (potência máxima de 90 W) e observou que a eficiência do rompimento celular foi dependente do tempo de aplicação, quanto maior o tempo de aplicação, maior o rompimento celular.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que, nas condições avaliadas de aplicação do ultrassom, o tempo do pulso de aplicação do ultrassom influenciaram nos resultados de recuperação de P(3HB), pois com o maior tempo do pulso de aplicação (59 s) foram obtidos os maiores valores de recuperação (92,2 %).

Isto sugere a possibilidade da utilização da menor potência de aplicação do ultrassom para recuperação de P(3HB), evidenciando que a aplicação do ultrassom com potência de 200 W é eficiente no rompimento celular, facilitando assim a ação do solvente na solubilização do biopolímero e, conseqüentemente, na maior porcentagem de recuperação do mesmo a partir de biomassa bacteriana com carbonato de propileno.

Penloglou, Chatzidoukas e Kiparissides (2012) utilizaram ultrassom para etapa de rompimento celular de *Azohydromonas lata* DSM 1123 para extração de P(3HB) com clorofórmio. Foram aplicados 60 pulsos de 30 s de ultrassonificação (potência de 500 W) e 5 s de intervalo entre cada ciclo de aplicação. A solubilização do biopolímero foi realizada com clorofórmio a 30 °C durante 1,5 h sob agitação constante, e o polímero foi precipitado com a adição de metanol. A recuperação de P(3HB) obtida foi de 95 % (m/m). Embora com a utilização deste método elevada porcentagem de recuperação de biopolímero tenha sido obtida, a utilização de solvente clorado no processo de extração de P(3HB) é contraditória, tendo em vista que estes polímeros estão sendo estudados como alternativa viável para substituir os plásticos petroquímicos e, conseqüentemente, reduzir os impactos ambientais. O presente estudo apresenta vantagens em relação ao processo de extração citado, pois com a melhor condição de tratamento da biomassa com ultrassom (Ensaio 1), obtida neste trabalho (potência 200 W, três ciclos de aplicação de 59 s de pulso), e solvente de baixa toxicidade, carbonato de propileno, obteve-se um elevado rendimento de P(3HB) recuperado (92,2 %) com elevada pureza (99,0 %).

## **2.4 Considerações finais**

No método de extração que combina a aplicação de homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, a melhor condição de homogeneização da suspensão celular foi obtida com a pressão de 1300 bar e duas passagens pelo equipamento, pois foram obtidos os melhores resultados de recuperação de P(3HB) e menor

degradação da massa molar. O aumento do número de passagens da suspensão celular pelo homogeneizador influenciou diretamente na redução da massa molar do biopolímero.

O tratamento com ultrassom da biomassa mostrou-se eficaz nos resultados de extração de P(3HB), pois foi possível a obtenção de elevada recuperação polimérica. A melhor condição de tratamento da biomassa com ultrassom foi na potência de 200 W e três ciclos de aplicação de 59 s. A porcentagem de pureza do polímero extraído não sofreu influência das variáveis de ultrassonificação estudadas, uma vez que todos apresentaram pureza de 99 %. Com o maior tempo de aplicação do ultrassom, obteve-se maior porcentagem de recuperação de P(3HB).

Os métodos de extração, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno e ultrassom e solvente, estudados neste capítulo mostraram-se eficazes nos resultados de pureza e recuperação de P(3HB) no processo de extração, quando comparado com o método controle.

Ao final deste capítulo algumas questões foram levantadas, como:

- Possibilidade de aplicação de outros tratamentos da biomassa, como o térmico (Quines, 2010);
- Dependendo do tratamento da biomassa, seria necessária a aplicação de temperatura de 150 °C na extração com carbonato de propileno;
- Dependendo do tratamento da biomassa, seria possível reduzir o tempo de contato das células com o carbonato de propileno aquecido.

Frente ao exposto, o estudo do capítulo a seguir foi desenvolvido buscando responder esses questionamentos.

## **AVALIAÇÃO CINÉTICA DA INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS DE PROCESSO DE EXTRAÇÃO SOBRE A RECUPERAÇÃO, PUREZA E MASSA MOLAR DO POLÍMERO EXTRAÍDO**

Complementando os aspectos abordados no capítulo 2, com a definição das condições de aplicação do ultrassom e de Homogeneizador à alta pressão na biomassa definidas, este capítulo apresenta o estudo da influência da aplicação de diferentes tratamentos na biomassa (aplicação de ultrassom, passagem pelo homogeneizador à alta pressão e aplicação de tratamento térmico) associado à recuperação polimérica com carbonato de propileno, sobre a porcentagem de recuperação de P(3HB) e também sobre o tempo de processo. A partir destas respostas, pretende-se definir o melhor tratamento da biomassa a ser associado à recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno.

### 3.1 Introdução

Por se tratar de um produto intracelular, o P(3HB) deve ser extraído das células ao término do cultivo (MADISON; HUISMAN, 1999). O tratamento da biomassa após o cultivo, para a extração do P(3HB) acumulado, é uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar em alterações nas propriedades do produto final. Para simplificar a ruptura celular e aumentar a recuperação de P(3HB), uma etapa de tratamento da biomassa pode ser realizada, podendo empregar produtos químicos como ácidos e bases, tratamento térmico e tratamento mecânico, como a utilização de ultrassom e homogeneizador à alta pressão (FIORESE *et al.*, 2009; PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS; KIPARISSIDES, 2012; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002).

Métodos mecânicos de ruptura celular para recuperação de PHAs vêm sendo aplicados em conjunto com solventes, digestores químicos ou enzimáticos e representam uma das etapas de um processo de extração (rompimento celular), sendo necessárias etapas posteriores para a recuperação e purificação do biopolímero (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998b; GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002). Entretanto, após o rompimento mecânico, a escolha criteriosa do solvente e das condições operacionais do processo de extração é fundamental para manter ao máximo a integridade do biopolímero, levando em consideração que as características do mesmo dependem diretamente do tratamento da biomassa, do solvente utilizado, da temperatura de aquecimento utilizada e do tempo de contato do polímero com o solvente (GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2012; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2010). Dentre os solventes utilizados, destaca-se o carbonato de propileno, por possuir baixa toxicidade e alto ponto de ebulição (McCHALICHER; SRIENC, ROUSE, 2009).

Como apresentado no capítulo 2, o tratamento da biomassa associado à recuperação polimérica com carbonato de propileno é de fundamental importância para a obtenção de maiores porcentagens de recuperação de P(3HB) no processo de extração. Por este motivo, o tratamento da biomassa com métodos mecânicos, homogeneizador à alta

pressão e ultrassom, se mostra uma boa alternativa para romper e/ou desestabilizar as células e facilitar a ação do solvente na etapa de recuperação polimérica do processo de extração. As condições de tratamento da biomassa com os métodos mecânicos, ultrassom e homogeneizador à alta pressão, definidas no capítulo 2, foram obtidas a partir da recuperação polimérica com carbonato de propileno aquecido a 150° C durante 45 min.

Neste sentido, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a influência da temperatura de extração e do tempo de contato das células com o solvente carbonato de propileno, combinando a utilização de métodos mecânicos (ultrassom e homogeneizador à alta pressão), sobre os valores de pureza e recuperação de P(3HB) extraído de *Cupriavidus necator* DSM 545, propondo um método de extração alternativo ao estudado por Quines *et al.* (2015), que combinava a utilização de tratamento térmico da biomassa com carbonato de propileno. Assim, estabelecer o melhor tratamento da biomassa para ser aplicado em conjunto com carbonato de propileno no processo de extração de P(3HB), considerando resultados de recuperação de biopolímero, pureza e tempo de contato das células com o solvente. Por fim, no melhor método de extração selecionado, avaliar a influência deste na massa molar do polímero extraído em cada tempo de contato do ensaio cinético.

## **3.2 Material e Métodos**

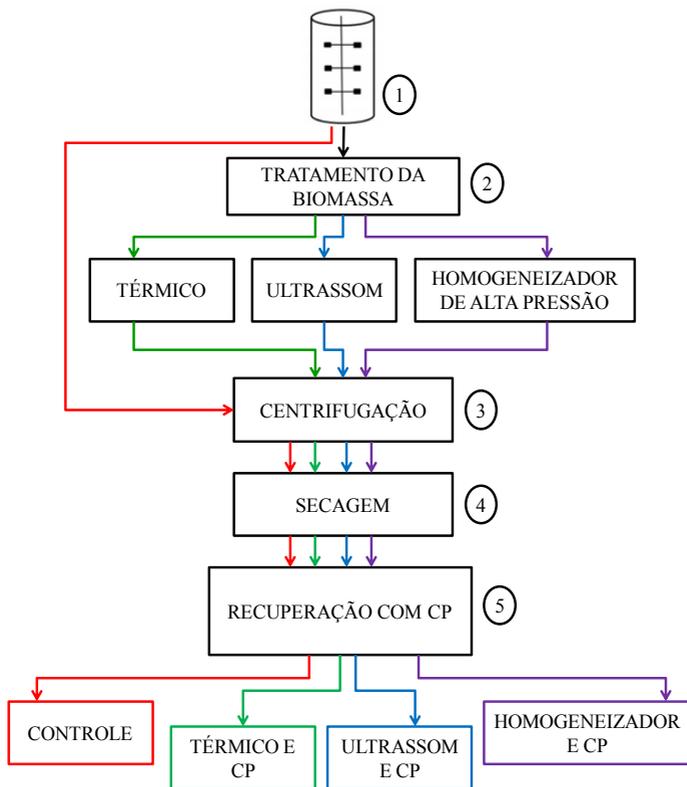
### **3.2.1 Biomassa**

As biomassas de *Cupriavidus necator* DSM 545 contendo P(3HB) foram produzidas utilizando-se glicose e frutose como substrato e nitrogênio como nutriente limitante. Neste capítulo as biomassas utilizadas foram provenientes de diferentes cultivos e, conseqüentemente, continham diferentes porcentagens de P(3HB) acumulado.

### 3.2.2 Extração de P(3HB) com diferentes tratamentos da biomassa

A Figura 3.1 apresenta o fluxograma das etapas de extração com a aplicação dos métodos abordados neste capítulo, que são os seguintes: térmico, ultrassom, homogeneizador à alta pressão e controle (com apenas o carbonato de propileno e sem tratamento da biomassa). As etapas envolvidas em cada processo de extração de P(3HB), a partir de *C. necator*, são descritas nos itens a seguir, sendo que cada etapa está identificada com a respectiva numeração da Figura 3.1.

**Figura 3.1.** Etapas envolvidas nos processos de extração de P(3HB) estudadas neste capítulo: térmico, ultrassom, homogeneizador à alta pressão todos seguidos pela extração com carbonato de propileno (CP), além do controle apenas com o CP.



1 – Biorreator com caldo cultivado (células com polímero acumulado e meio de cultivo); 2- Tratamento da biomassa (térmico, ultrassom e homogeneizador à alta pressão); 3 – Separação das células do caldo de cultivo por centrifugação a 2000 g por 15 min e lavagem com água destilada, esta é a primeira etapa do ensaio controle após a produção; 4 – Secagem das células a 65 °C durante 24 h; 5 – Recuperação de P(3HB), onde ocorre a solubilização do material polimérico no solvente, mistura das células com carbonato de propileno (CP) sob agitação e aquecimento (130 e 150 °C) durante 5, 15, 30 e 45 min.

### **3.2.2.1 Tratamento da biomassa**

#### **3.2.2.1.1 Tratamento térmico da biomassa**

Após o término do cultivo de *C. necator* (etapa 1 na Figura 3.1), elevou-se a temperatura da suspensão de biomassa para 95 °C durante 45 min (etapa 2 na Figura 3.1), para inativar a enzima PHA depolimerase, responsável pela degradação do biopolímero, e desnaturar as proteínas da membrana e, conseqüentemente, desestabilizar a parede celular e facilitar a ação do solvente na solubilização do P(3HB) intracelular (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2000). Posteriormente, a biomassa foi centrifugada e lavada com água destilada e o sobrenadante descartado (etapa 3 da Figura 3.1). O precipitado (células com P(3HB)) foi submetido à secagem (etapa 4 da Figura 3.1). A biomassa utilizada nestes ensaios apresentava 73,0 % (m/m) de P(3HB).

#### **3.2.2.1.2 Tratamento da biomassa com ultrassom**

No tratamento da biomassa com ultrassom, o equipamento utilizado foi o mesmo descrito no item 2.2.2.3.1 do capítulo 2. As variáveis do processo de ultrassonificação, tempo de aplicação do ultrassom e potência, foram definidas a partir dos resultados apresentados no capítulo 2. Após o cultivo (etapa 1 na Figura 3.1), três ciclos de aplicação do ultrassom na suspensão celular foram realizados (tempo de aplicação de 59 s) na potência de 200 W (etapa 2 da Figura 3.1) (condições de ultrassonificação definidas no capítulo 2). Após este tratamento, a suspensão celular foi centrifugada (etapa 3 da Figura 3.1), as células lavadas com água destilada e centrifugadas novamente, na

mesma condição. Finalmente, as células foram submetidas à secagem (etapa 4 da Figura 3.1). Nestes ensaios, foi utilizada biomassa que continha 69,0 % (m/m) de P(3HB) acumulado.

### **3.2.2.1.3 Tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão**

Para o tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão, foi utilizado o mesmo equipamento descrito no item 2.2.2.2.1 do capítulo 2. As variáveis do processo de homogeneização, pressão aplicada e número de passagens pelo equipamento, foram definidas no capítulo 2. Nestes ensaios, as suspensões celulares (etapa 1 da Figura 3.1), contendo as células com P(3HB) e meio de cultivo, foram submetidas à homogeneização sob alta pressão (etapa 2 da Figura 3.1), para rompimento celular, a 1300 bar e dois ciclos de aplicação. Posteriormente, as células foram separadas do caldo de cultivo por centrifugação (etapa 3 da Figura 3.1) e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e submetido à secagem (etapa 4 da Figura 3.1). As biomassas utilizadas nestes ensaios foram provenientes de diferentes cultivos e, conseqüentemente, continham diferentes porcentagens de polímero acumulado, sendo 35,0 e 69,0 % (m/m).

### **3.2.2.2 Estudo cinético da recuperação de P(3HB)**

Com o objetivo de avaliar a influência do tempo de contato (células com solvente) e a possibilidade de redução da temperatura de processo (de 150 para 130 °C) nos resultados de pureza e recuperação polimérica, ensaios cinéticos de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno (CP) foram realizados, em diferentes tempos de contato células/solvente e temperaturas de aquecimento, a partir de biomassas sem tratamento e tratadas com diferentes métodos (térmico, ultrassom e homogeneizador à alta pressão). Estes ensaios foram realizados de acordo com o método de recuperação de P(3HB) descrito no item 2.2.2.1 do capítulo 2, onde 4 g de células secas foram suspensas em 26 mL de CP nas diferentes temperaturas de aquecimento das células com o solvente, 130 e 150 °C, variando-se os tempos de contato das células com o solvente: 5, 15, 30 e 45 min.

A biomassa utilizada nos ensaios de extração controle, sem tratamento da biomassa, apresentava 73,0 % (m/m) de P(3HB).

### **3.2.3 Determinação de P(3HB)**

Conforme o método descrito no item 2.2.3 do capítulo 2.

### **3.2.4 Determinação da massa molar de P(3HB)**

Estudou-se a influência do tempo de contato células/solvente na degradação da massa molar do P(3HB), pela determinação da massa molar dos polímeros extraídos com os diferentes métodos, controle e com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, a 150 °C após cada tempo de contato das células com o solvente (5, 15, 30 e 45 min).

A determinação da massa molar das amostras de P(3HB) foi realizada conforme o método descrito no item 2.2.4 do capítulo 2.

## **3.3 Resultados e Discussão**

### **3.3.1 Ensaios cinéticos de extração de P(3HB) com diferentes tratamentos da biomassa**

Nos ensaios de extração realizados, para qualquer método de tratamento da biomassa até esta etapa do trabalho, utilizou-se 45 min de tempo de contato das células com o solvente, aquecido a 150 °C, na extração de P(3HB). Com o objetivo de verificar a possibilidade de redução deste tempo e temperatura realizaram-se ensaios cinéticos de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno, a partir de biomassas tratadas termicamente, com ultrassom e com homogeneização à alta pressão, e sem tratamento (controle), com variações na temperatura de aquecimento (130 e 150 °C) e no tempo de contato da biomassa com o solvente (5, 15, 30 e 45 min). O tratamento térmico da

biomassa foi aplicado neste estudo, pois Quines *et al.* (2015) estudaram a extração de P(3HB) de *C. necator* e os resultados de recuperação polimérica mais elevados foram obtidos com este tratamento da biomassa, combinado com a aplicação de carbonato de propileno.

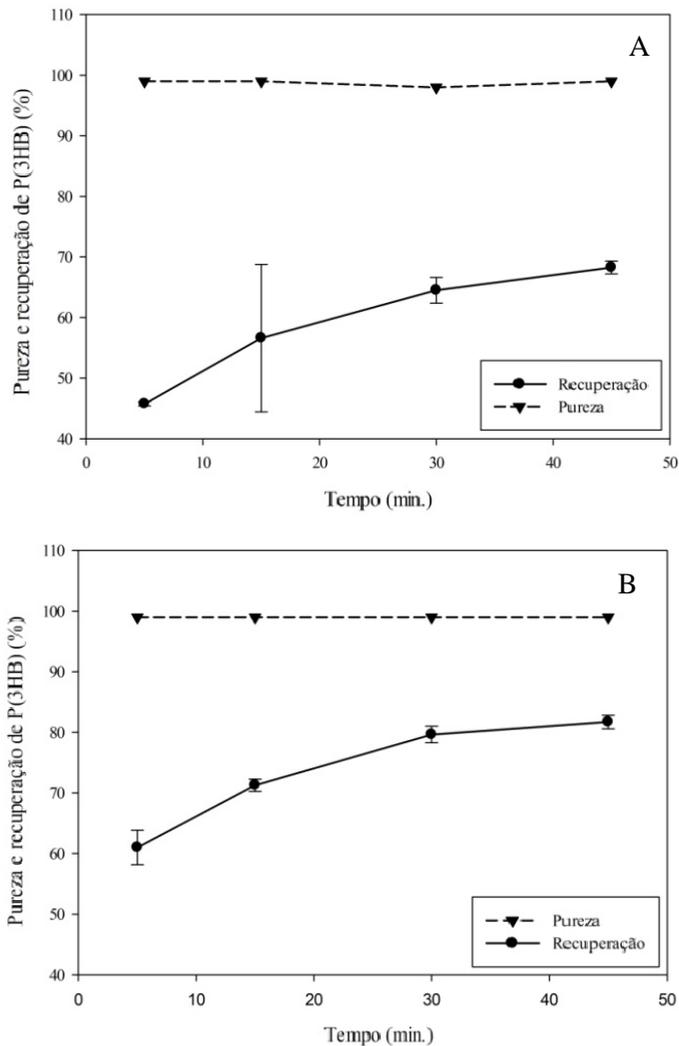
A Figura 3.2 mostra os resultados de porcentagem de pureza e recuperação de P(3HB) das cinéticas do ensaio controle, a partir de biomassa de *C. necator* (sem tratamento), obtidos por extração com carbonato de propileno a 130 e 150 °C (dados em duplicata).

Conforme se observa na Figura 3.2, o tempo de contato das células com o solvente influi na porcentagem de recuperação de P(3HB) extraído com no ensaio controle, visto que o maior rendimento obtido, 81,7 % (m/m), foi no tempo de 45 min e aquecimento a 150° C. O mesmo não foi observado para a resposta de pureza do P(3HB) extraído, pois esta grandeza não foi influenciada pelo tempo de contato, ficando em torno de 99,0 % (m/m).

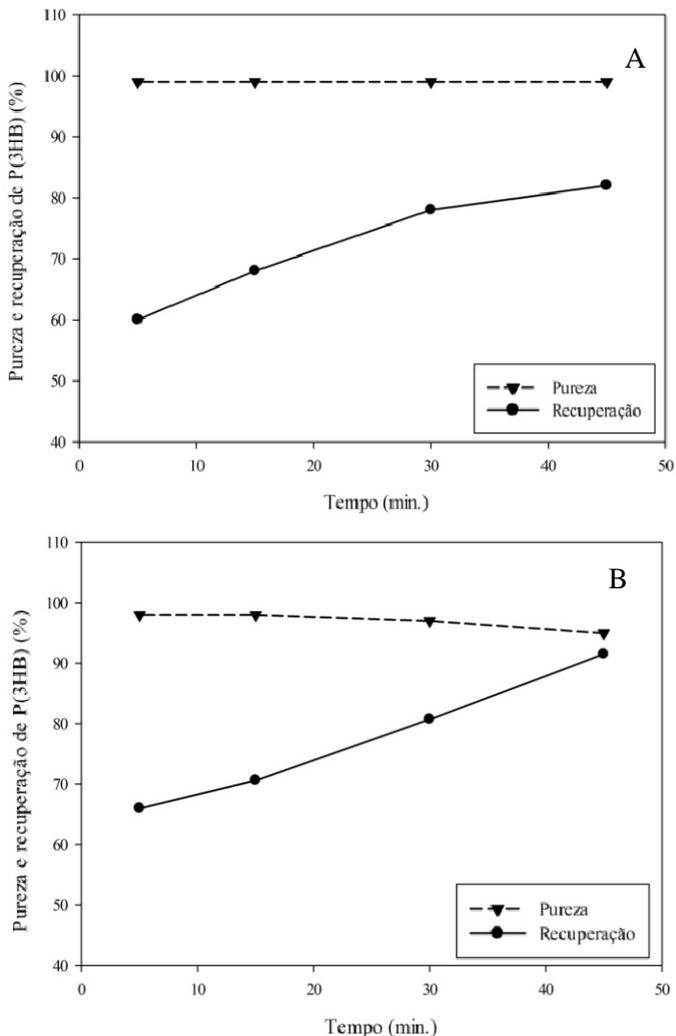
Os resultados de porcentagens de pureza e recuperação polimérica para todas as cinéticas de extração de P(3HB) de biomassas tratadas com ultrassom, termicamente e homogeneizador, estão apresentados nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5.

Vale ressaltar que com o método de recuperação polimérica com carbonato de propileno (solvente verde) usado no presente trabalho foi possível a obtenção de P(3HB) de elevada pureza. Estes resultados de alta pureza se devem à alta solubilidade do P(3HB) no carbonato de propileno e à facilidade de separação do polímero do solvente, pela precipitação e lavagem do polímero com água destilada, de acordo com o método proposto.

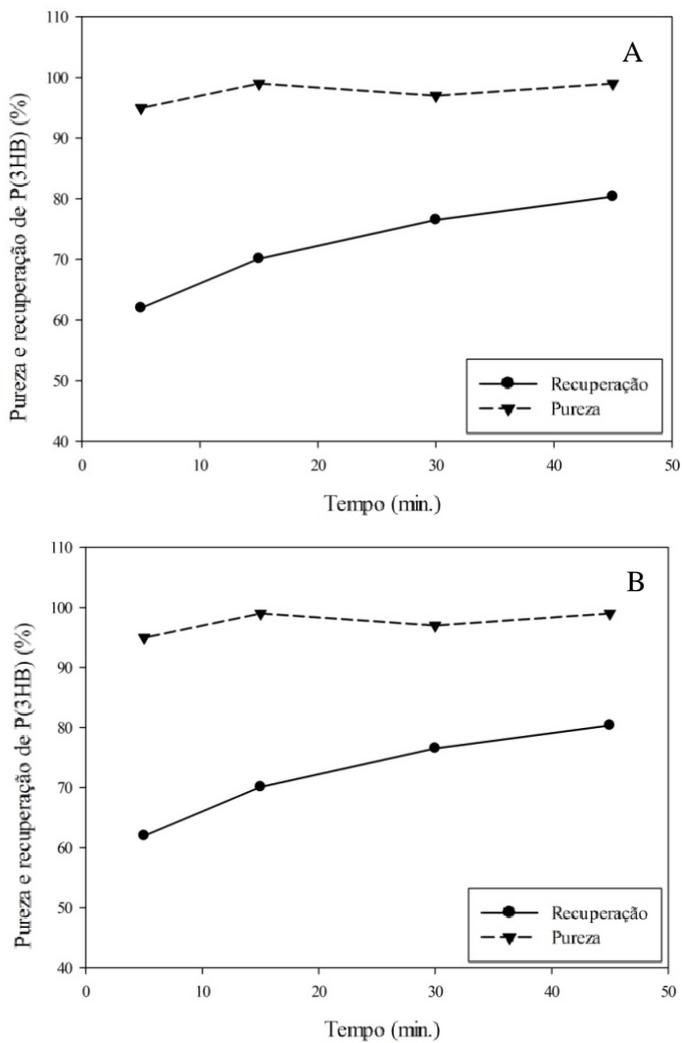
**Figura 3.2.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno (controle) a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 73,0 % de P(3HB), sem tratamento.



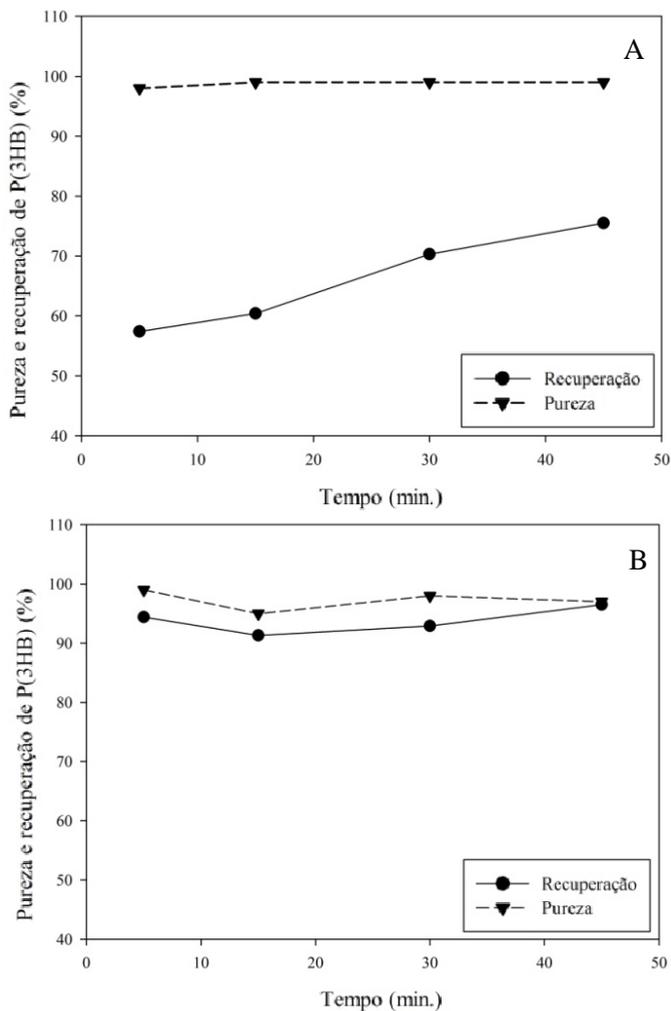
**Figura 3.3.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 69,0 % de P(3HB), tratada com ultrassom.

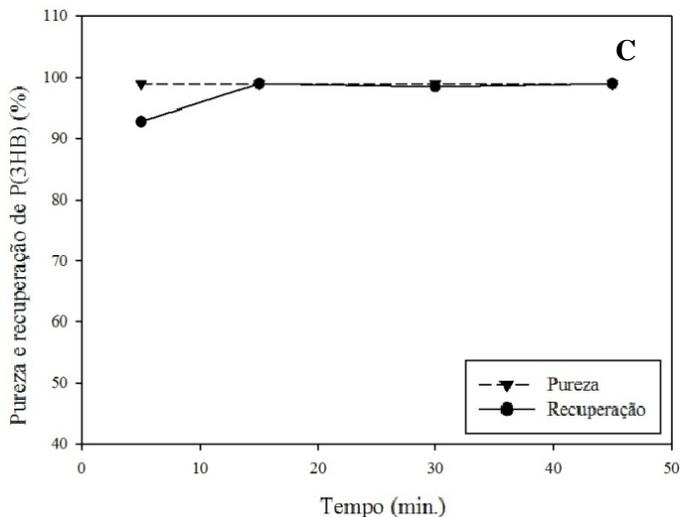


**Figura 3.4.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B), a partir de biomassa de *C. necator* com 73,0 %, tratada termicamente.



**Figura 3.5.** Recuperação e pureza de P(3HB) obtidas nas cinéticas de extração com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B e C), a partir de biomassas de *C. necator*, tratadas com homogeneizador. Extração de biomassa com 35 % de biopolímero (A e B); Extração de biomassa com 69,0 % de biopolímero (C).





As variáveis tempo de contato das células com solvente aquecido, temperatura de extração e tratamento da biomassa não influenciaram nos resultados de pureza do P(3HB) extraído de *C. necator*. As porcentagens de pureza permaneceram entre 95,0 e 99,0 % (m/m) em todas as condições de extração estudadas. Fiorese *et al.* (2009) obtiveram P(3HB) com pureza de 84 % na extração com o mesmo solvente a 130 °C durante 30 min. No método citado, foi aplicado o dobro do volume de solvente na etapa de recuperação polimérica (relação células/solvente de 0,075 g.mL<sup>-1</sup>), que o utilizado no presente estudo, 0,15 g.mL<sup>-1</sup>. Ainda, na recuperação polimérica com carbonato de propileno, nas etapas de precipitação e lavagem do P(3HB), estes autores utilizaram acetona como não solvente, enquanto que neste estudo água destilada foi utilizada, o que torna o processo menos poluente e sem geração de resíduos líquidos tóxicos. Hahn *et al.* (1997), ao utilizarem hipoclorito de sódio na extração de P(3HB) a partir de *C. necator*, obtiveram um polímero com pureza de 88 % (m/m).

Percebe-se que, nas extrações realizadas na temperatura de 130 °C, as porcentagens de recuperação de biopolímero obtidas foram

inferiores quando comparadas com as extrações a 150 °C. Isto pode ser atribuído à menor solubilidade do polímero em carbonato de propileno a 130 °C e também, à perda de polímero no processo de extração, devido à formação de uma solução polimérica viscosa, que dificultou a etapa de filtração durante a separação dos resíduos celulares da solução contendo P(3HB) e solvente.

O aumento do tempo de extração levou ao aumento das porcentagens de P(3HB) recuperado para as diferentes temperaturas de extração testadas. Cabe ressaltar, entretanto que, na Figura 3.5 B, que mostra as respostas do ensaio cinético com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno (150 °C), de biomassa com 35,0 % (m/m) de P(3HB), em apenas 5 min obteve-se 94,4 % (m/m) e com o aumento no tempo de extração, as porcentagens de recuperação de P(3HB) apresentaram valores muito próximos.

Ainda na Figura 3.5 (tratamento com homogeneizador à alta pressão), na extração realizada de biomassa com 69,0 % (m/m), a partir de 15 min de tempo de contato células/solvente, observa-se que as porcentagens de recuperação de P(3HB) permanecem semelhantes, entre 98,5 e 99,0 % (m/m). Porém, o tempo de contato das células com o solvente, nas extrações realizadas com este mesmo método a 130 °C, apresentou influência nos resultados de recuperação de P(3HB), pois com o aumento do tempo de contato obteve-se uma maior porcentagem de polímero recuperado, contudo estes não foram satisfatórios e ficaram entre 57,4 e 75,5 % (m/m).

Nota-se na Figura 3.3 B que, na cinética de recuperação de biomassa tratada com ultrassom, o maior valor de recuperação de P(3HB), 91,5 % (m/m), foi obtido na extração realizada a 150 °C por 45 min. Enquanto que, com a utilização da temperatura de extração de 130 °C a maior porcentagem de recuperação de P(3HB) (82,0 % (m/m)) obtida foi no tempo de 45 min.

Conforme se observa na Figura 3.4 B, o resultado de recuperação de biopolímero mais elevado (92,1 % (m/m)) obtido nas cinéticas de extração, a partir de biomassa tratada termicamente, foi com a temperatura e tempo de extração de 150 °C e 45 min, respectivamente.

Nas cinéticas realizadas com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, as porcentagens de pureza ficaram entre 97,0 e 99,0 % (m/m) e os valores de recuperação polimérica entre 92,8 e 99,0 % (m/m). Os resultados de recuperação de P(3HB) mais elevados, de 98,5 e 99,0% (m/m), foram obtidos na cinética de extração, a partir de biomassa com 69,0 % (m/m) de biopolímero, a 150°C e em tempos de contato das células com o solvente superiores a 15 min. Contudo, em apenas 5 min de extração, com este método, nos dois ensaios cinéticos de recuperação de P(3HB) realizados a 150 °C, foi possível a obtenção de porcentagens de recuperação em polímero de 94,4 e 92,8 % (m/m), enquanto que a extração controle no mesmo tempo de contato apresentou recuperação polimérica de 61,0 %. Observa-se ainda, que com o método de extração de P(3HB) com homogeneizador à alta pressão e solvente, a partir de biomassas com distintos teores de polímero (35 e 69 %), os dados obtidos de porcentagens de recuperação foram muito próximos. Estes resultados sugerem que o tratamento da biomassa à alta pressão, nas condições estudadas, foi eficiente para o rompimento celular de *C. necator*, o que facilitou a ação do carbonato de propileno na recuperação de P(3HB), na qual 5 min de contato das células com o solvente a 150 °C foi o suficiente para a obtenção de elevadas porcentagens de recuperação de polímero extraído.

A utilização de homogeneizador à alta pressão combinado com reagente químico (solvente/digestor) no processo de extração de P(3HB), a partir de bactéria, para promover a desestabilização e/ou rompimento celular e, assim, melhorar a recuperação do polímero é citada na literatura por diversos autores, com aplicação de pressões de homogeneização que variam entre 390 e 1600 bar (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; TAMER, MOO-YOUNG e CHISTI, 1998 a, VAN HEE *et al.*, 2004). No entanto, este estudo é o primeiro a utilizar este tratamento mecânico, para rompimento celular de *C. necator*, em conjunto com a recuperação polimérica com carbonato de propileno como processo de extração de P(3HB).

Com base nos ensaios cinéticos de extração de P(3HB) realizados, a partir de biomassas tratadas, nota-se que todos os

tratamentos da biomassa ensaiados associados à recuperação polimérica com carbonato de propileno apresentaram valores de recuperação de P(3HB) superiores aos obtidos com o método de extração controle. No entanto, salienta-se a eficiência do tratamento com homogeneizador à alta pressão, para rompimento e/ou desestabilização celular, nos resultados das extrações realizadas a 150 °C por 5 min, visto que o tempo de extração pode ser reduzido de 45 para 5 min com recuperação de P(3HB) elevada. Isso é de grande importância no processo de extração de P(3HB), a partir de *C. necator*, pois proporciona consequente economia de energia no processo.

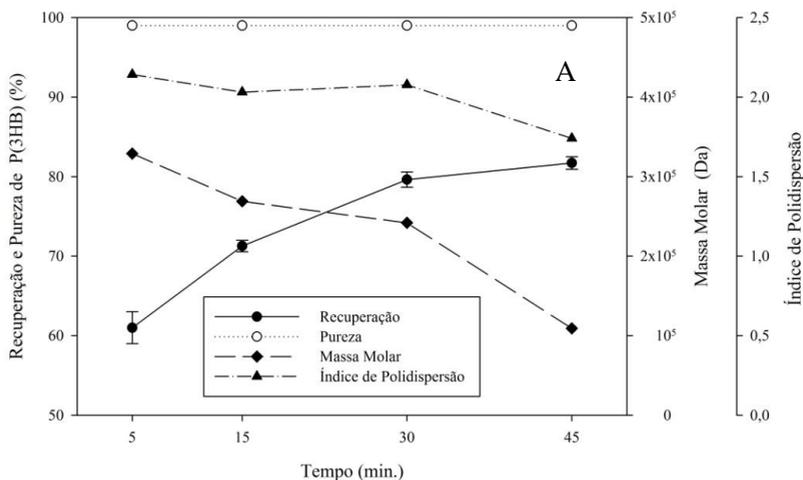
### **3.3.2 Influência do método de extração de P(3HB) com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno na massa molar polimérica**

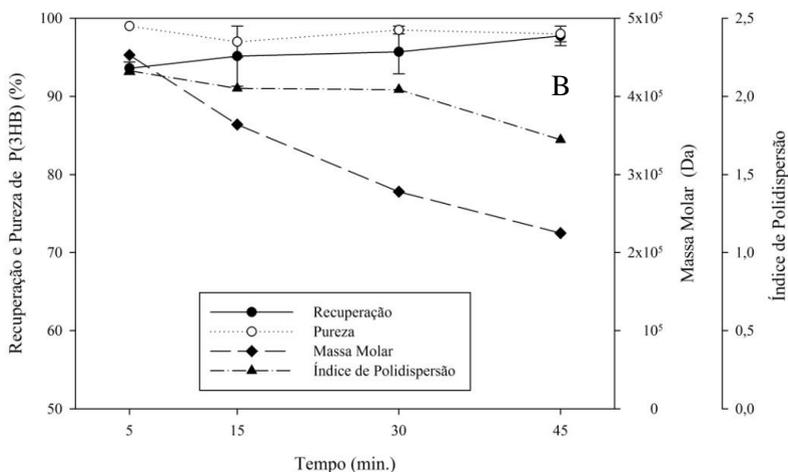
Posterior à definição do método de extração de P(3HB) mais eficiente, ou seja, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, conforme apresentado no item anterior, buscou-se avaliar a influência do tempo de contato das células com o solvente, sob aquecimento (150 °C), na redução da massa molar do P(3HB) extraído. Para isso, foram determinadas as massas molares dos polímeros extraídos, a 150 °C, em cada tempo de contato das células com o solvente (5, 15, 30 e 45 min). Além disso, para fins comparativos, determinaram-se também as massas molares dos biopolímeros extraídos com o método controle, nas mesmas condições (temperatura de aquecimento e tempo de extração).

Os resultados de recuperação e pureza mostrados na Figura 3.6 B são referentes à média dos resultados apresentados nas Figuras 3.5 B e 3.5 C (extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno). Estes resultados foram incluídos nesta figura para facilitar a visualização do efeito do método de extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno sobre os resultados de recuperação, pureza, massa molar e índice de polidispersão do polímero extraído.

Na Figura 3.6 estão apresentados os dados de recuperação, pureza, massa molar e índice de polidispersão das extrações de P(3HB), realizadas a 150 °C nos tempos de contato de 5, 15, 30 e 45 min, para o método de extração controle (A) e para o método de extração que combina alta pressão e carbonato de propileno (B). No Anexo II apresenta-se os cromatogramas obtidos pela análise de GPC, para a quantificação dos valores de massa molar apresentados na Figura 3.6.

**Figura 3.6.** Recuperação de P(3HB), pureza, massa molar e índice de polidispersão em função do tempo de extração a 150 °C com: (A) método controle; (B) com o método sob alta pressão (1300 bar, 2 passagens) e carbonato de propileno. Os dados de porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza correspondem à média de dois ensaios de extração e os respectivos desvios médios estão representados pelas barras de erro.





Através dos resultados de recuperação obtidos, é evidente a importância do método de extração com alta pressão e solvente, no que se refere à extração de P(3HB) para a obtenção de porcentagens de recuperação mais elevadas e redução do tempo de contato das células com o solvente.

Ao se analisar a Figura 3.6 (A e B), percebe-se uma redução da massa molar do P(3HB) com o aumento do tempo de contato da biomassa com o solvente a 150 °C. No intervalo entre 5 e 45 min de extração, a massa molar do polímero foi reduzida em torno de 50 % nos ensaios de extração com homogeneizador e carbonato de propileno ( $4,53 \times 10^5$  para  $2,25 \times 10^5$  Da) e 67 % (m/m) nas extrações realizadas somente com carbonato de propileno ( $3,29 \times 10^5$  para  $1,09 \times 10^5$  Da).

McChalicher, Srienc e Rouse (2009) investigaram a degradação da cadeia polimérica de P(3HB) Biopol<sup>®</sup> em carbonato de propileno, em função do tempo e temperatura de aquecimento (150 °C) e a redução da massa molar de  $2,1 \times 10^5$  para  $9 \times 10^4$  Da foi observada, para os tempos de contato polímero/solvente de 0 e 20 min, respectivamente. Em ambos os estudos, à medida que ocorre aumento do tempo de contato do polímero com o solvente, sob aquecimento a 150 °C, a redução da massa molar foi mais acentuada. Este fato está relacionado à degradação

térmica do P(3HB), pois os ensaios cinéticos de extração foram realizados a 150 °C e a exposição de um polímero ao calor, dependendo da intensidade e tempo de contato, pode acarretar em um processo de degradação térmica com cisão aleatória da cadeia (CANEVAROLO, 2007; MODI; KOELLING; VODOVOTZ, 2011). Essa degradação ocorre quando a energia térmica imposta no sistema é superior às energias de ligação da cadeia polimérica, ocasionando a quebra (cisão) da cadeia principal polimérica, através da reação de cisão de cadeia aleatória que envolve, principalmente, reação de eliminação cis de  $\beta$ -CH e uma transição de anel de seis membros, resultando em redução da massa molar do biopolímero devido à possibilidade de formação de produtos como ácido crotônico e vários oligômeros (polímeros de cadeias menores, de baixa massa molar) (GRASSIE; MURRAY; HOLMES, 1984; ARIFFIN *et al.*, 2008; HABLOT *et al.*, 2008).

Estudos descrevem que a degradação térmica de P(3HB) tem início em temperaturas entre 180 e 200 °C (GRASSIE; MURRAY; HOLMES, 1984; DOAN; NGUYEN, 2012). Entretanto, de acordo com McChalicher, Srienc e Rouse (2009) quando este polímero está solubilizado em um solvente sob aquecimento, a temperatura de degradação pode ser alterada, devido à possibilidade de interação do polímero com o solvente, diminuindo a energia de ativação entre as ligações da cadeia polimérica resultando na redução da massa molar polimérica sob temperaturas de degradação inferiores às reportadas na literatura. Segundo os autores, quando o P(3HB) é dissolvido em carbonato de propileno, a energia de ativação das ligações da cadeia polimérica é reduzida devido à participação do solvente neste mecanismo químico, reduzindo conseqüentemente a temperatura de degradação do polímero.

Lafferty e Heinzle (1979) também observaram redução da massa molar do polímero com o aumento do tempo de contato das células de *Azotobacter chroococcum* DSM 377 com carbonato de propileno a 140 °C na extração de P(3HB). A massa molar do P(3HB), após 14 min de extração, foi de  $6,6 \times 10^5$  Da e, com 30 min de extração, a massa molar reduziu em 83 %, para  $1,1 \times 10^5$  Da. Esta redução foi

mais acentuada do que a observada no presente estudo. Estes autores obtiveram recuperação de P(3HB) de 87 %, na temperatura de 140 °C e tempo de contato de 30 min. Porém, a pureza do polímero não foi avaliada.

A redução da massa molar de P(3HB) extraído de *C. necator* com carbonato de propileno foi avaliada por Fiorese *et al.* (2009). No estudo desses autores, extrações, a 145 °C com tempo de contato de 15 e 45 min foram realizadas, observando-se uma redução da massa molar do polímero extraído superior a 50 %, neste intervalo de tempo. Os melhores resultados obtidos por estes autores, para porcentagem de pureza (84 %) e de recuperação (95 %) de P(3HB) com carbonato de propileno, foram a 130 °C por 30 min. Lafferty e Heinzle (1979) obtiveram recuperação de 87 %, a partir de células secas de *Azotobacter chroococcum* DSM 377, na temperatura de 140 °C e tempo de contato de 30 min, porém a pureza do polímero não foi avaliada. Através dos resultados obtidos pelos autores citados é evidente a importância do tratamento da biomassa, com homogeneizador à alta pressão, e recuperação com carbonato de propileno nos resultados de extração de P(3HB) para a obtenção de porcentagens de recuperação poliméricas mais elevadas.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho, com os métodos propostos por Fiorese *et al.* (2009) e Lafferty e Heinzle (1979), o presente estudo apresentou vantagens em relação ao processo, pois foi possível obter 93,6 % (m/m) de recuperação do polímero com 99 % (m/m) de pureza em menor tempo de contato das células com o solvente, sob aquecimento, e menor degradação da massa molar polimérica, devido a redução do tempo de contato de 45 para 5 min. Desse modo, a extração realizada a 150 °C durante 5 min representou a melhor condição para uma menor redução da massa molar do P(3HB), com porcentagens de recuperação (93,6 % (m/m)) e pureza (99 % (m/m)) elevadas. Os índices de polidispersão foram de 1,72 e 2,16.

### **3.4 Considerações finais**

O tempo e a temperatura de extração não influenciaram nos resultados de porcentagem de pureza dos polímeros obtidos nos ensaios cinéticos realizados.

Verificou-se que a temperatura de extração influenciou nos resultados de porcentagem de recuperação de P(3HB) em todos os ensaios cinéticos de extração. O tempo de extração apresentou influência nos resultados de recuperação de P(3HB) obtidos a partir de biomassas tratadas termicamente e tratadas com ultrassom, pois quanto maior o tempo de extração, maior a porcentagem de P(3HB) obtido (dentro da faixa estudada).

O método de extração de P(3HB), que associa o tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão e recuperação polimérica com carbonato de propileno, foi definido como o mais eficiente para a obtenção de elevadas porcentagens de recuperação de P(3HB) em um menor tempo de contato das células com o solvente.

Nas cinéticas de extração, com os métodos controle e de homogeneização de alta pressão e solvente, foi possível observar uma redução da massa molar do polímero com o aumento do tempo de contato célula/solvente, sob aquecimento.

Com o tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão associado à recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno a 150 °C e tempo de contato célula/solvente de 5 min, foram obtidas porcentagens de recuperação polimérica e pureza elevadas, além da menor redução da massa molar do polímero extraído. Assim, salienta-se a eficiência do método de extração proposto, visto que foi possível a obtenção de elevada recuperação de P(3HB) e o tempo de extração pode ser reduzido de 45 para 5 min. Essa redução é de grande importância no processo, pois proporciona economia de energia e a obtenção de um polímero com massa molar mais preservada.

No final dessa etapa do estudo (capítulo 3) alguns questionamentos surgiram, como:

- Seria possível a aplicação de pressões de homogeneização inferiores às estudadas;
- O tratamento da biomassa com apenas uma passagem no homogeneizador à alta pressão seria eficiente na recuperação de P(3HB);
- O tempo de contato das células com o solvente aquecido influenciaria nos resultados de recuperação polimérica com a variação da pressão de homogeneização e do número de passagens;
- Os tempos de repouso e agitação do processo de extração com carbonato de propileno são realmente necessários? Qual a influência destes tempos na pureza, recuperação e massa molar do polímero extraído.

De acordo com as questões citadas acima, o capítulo seguinte foi desenvolvido buscando responde-las.

## **ESTUDO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE HOMOGENEIZAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO E CARBONATO DE PROPILENO NA RECUPERAÇÃO, PUREZA E CARACTERÍSTICAS DO POLÍMERO EXTRAÍDO**

A partir dos estudos realizados e das conclusões delineadas até esta etapa, neste capítulo optou-se por aprimorar o método de extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, visando elevadas porcentagens de recuperação polimérica, com o estudo do efeito da pressão e do número de passagens, além da verificação da influência deste método nas características do polímero extraído. Conforme apresentado e discutido no capítulo 3, o tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão eleva a recuperação do polímero com carbonato de propileno, o que permite a obtenção de elevados rendimentos de P(3HB) recuperado em um reduzido tempo de contato das células com solvente aquecido. Por este motivo, um estudo mais amplo da extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato se torna relevante.

## **4.1 Introdução**

Na extração de P(3HB), após a etapa de produção, para facilitar a ruptura celular e aumentar a recuperação polimérica, uma etapa de tratamento da biomassa pode ser realizada como primeiro passo do processo de extração, podendo esta empregar produtos químicos como ácidos e bases, tratamento térmico e tratamento mecânico, como a utilização de homogeneizador à alta pressão, por exemplo (FIORESE *et al.*, 2009; VAN HEE *et al.*, 2004; PENLOGLOU; CHATZIDOUKAS; KIPARISSIDE, 2012).

A utilização de homogeneizador à alta pressão combinado com reagente químico (solvente/digestor) no processo de extração de P(3HB) bacteriano, para promover a desestabilização e/ou rompimento celular e melhorar a recuperação do polímero, é reportada em poucos estudos na literatura, com pressões de homogeneização que variam de 392 a 1600 bar (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002; TAMER; CHISTI; MOO-YOUNG, 1998a; LING *et al.*, 1997; VAN HEE *et al.*, 2004). No entanto, os autores citados não investigaram a influência da aplicação da homogeneização à alta pressão, em conjunto com produtos químicos, nas características do polímero extraído, não havendo na literatura estudos que utilizem este método de rompimento celular em conjunto com carbonato de propileno, um solvente de baixa toxicidade e de fácil recuperação.

O método de extração de P(3HB) com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, apresentado nos capítulos 2 e 3, mostrou-se o mais eficiente para obtenção de elevadas porcentagens de P(3HB) em menor tempo de contato das células com solvente sob aquecimento. No entanto, até esta etapa do estudo, apenas duas pressões de operação, 1200 e 1300 bar, e apenas 2 e 3 passagens haviam sido avaliados. Trabalhos consultados na literatura relatam a utilização deste método mecânico de rompimento celular para a recuperação de P(3HB), com pressões de 550, 900 e 1600 bar (LING *et al.*, 1997; TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998a; VAN HEE *et al.*, 2004).

Neste contexto, o presente capítulo tem como objetivo estudar a influência das variáveis do processo de homogeneização à alta pressão com carbonato de propileno, pressão de operação, número de passagens da biomassa pelo equipamento e o tempo de contato das células com solvente, sobre a recuperação de biopolímero e, definir as melhores condições de extração. Ainda, avaliar a influência deste método na qualidade do P(3HB) extraído (na melhor condição), através de sua caracterização térmica, determinação da massa molar e composição da estrutura química e comparar com as características de polímeros comerciais e de P(3HB) extraído com clorofórmio. Por fim, verificar a influência dos tempos de repouso e agitação no processo de extração com carbonato de propileno nos resultados de recuperação de P(3HB), pureza e massa molar do polímero extraído.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Biomassa**

A biomassa de *Cupriavidus necator* DSM 545, utilizada para os ensaios de extração com clorofórmio, carbonato de propileno e homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno continha 72,5 % (m/m) de P(3HB) acumulado. Nos ensaios de extração para avaliar a influência dos tempos de repouso e agitação das etapas de extração com carbonato de propileno foi utilizada biomassa com 69,0 % (m/m) de P(3HB).

### **4.2.2 Extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno**

#### ***4.2.2.1 Tratamento da biomassa com homogeneizador à alta pressão***

Para os ensaios apresentados neste capítulo, o equipamento utilizado foi um homogeneizador à alta pressão Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália) (Figura 4.1), com vazão de fluxo de 9 L.h<sup>-1</sup>.

As variáveis do processo de homogeneização sob alta pressão foram pressão de operação e número de passagens da suspensão celular pelo equipamento. Foram realizadas combinações de pressões de operação de 500, 900, 1300 e 1500 bar e número de passagens de 1, 2 e 3 vezes, onde para cada pressão ensaiada foram testados todos os números de passagens. Estes ensaios foram realizados na Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA no laboratório de Tecnologias Emergentes (Professor Dr. Marcelo Cristianini).

**Figura 4.1.** Homogeneizador à alta pressão Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália) utilizado neste estudo.



Após o tratamento à alta pressão, a suspensão celular foi centrifugada a 2.000 g durante 15 min e o precipitado foi seco em estufa a 65 °C por 24 h.

#### **4.2.2.2 Recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno**

O procedimento foi realizado conforme o método de recuperação de P(3HB) descrito no item 2.2.2.1, variando os tempos de contato das células com o solvente (aquecido a 150 °C) de 5 e 15 min.

### 4.2.3 Extração com carbonato de propileno (controle)

O procedimento foi realizado de acordo com o método descrito no item 2.2.2.1, variando os tempos de contato das células com o solvente (aquecido a 150 °C) de 5 e 15 min.

### 4.2.4 Extração com clorofórmio

A extração de P(3HB) da biomassa de *C. necator*, sem tratamento, com clorofórmio, foi realizada de acordo com o método descrito por Dalcanton (2006). Primeiramente, 2 g de biomassa seca foram ressuspensa em 100 mL de clorofórmio, sendo a suspensão mantida a 60 °C sob agitação durante 2 h. Em seguida, esta suspensão (*debris* celulares, clorofórmio e P(3HB)) foi centrifugada a 2000 g por 15 min para a separação dos *debris* celulares da solução formada por clorofórmio e P(3HB). Na sequência, obteve-se uma suspensão com duas fases distintas: fase superior composta por *debris* celulares e fase inferior formada pela solução de P(3HB) e clorofórmio. Por fim, a solução de P(3HB) em clorofórmio foi disposta em placa de vidro e submetida à evaporação do solvente, em cuba de vidro saturada em clorofórmio, para a formação de um filme de P(3HB).

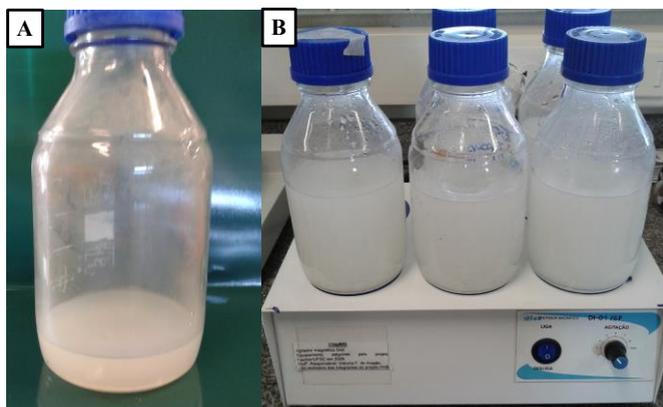
### 4.2.5 Avaliação dos tempos de repouso e agitação na porcentagem de recuperação e na massa molar de P(3HB) extraído com carbonato de propileno

As extrações de P(3HB) com carbonato de propileno (controle), sem tratamento da biomassa, foram realizadas de acordo com o método descrito no item 2.2.2.1, com temperatura de aquecimento de 150 °C, tempo de contato das células com solvente de 45 min e variação dos tempos de repouso e de agitação do método, conforme Tabela 4.1.

O tempo de repouso refere-se ao tempo em que a solução formada por P(3HB) e carbonato de propileno, obtida após a primeira

filtração do processo de extração de P(3HB), permanece em repouso (Figura 4.2 A). O tempo de agitação corresponde ao intervalo (após a precipitação polimérica) que a suspensão, formada por P(3HB) e carbonato de propileno e água, permanece sob agitação em agitador magnético (Figura 4.2 B). Ambas as etapas ocorrem em temperatura ambiente.

**Figura 4.2.** Solução de P(3HB) e solvente após a primeira filtração (A) (tempo de repouso), e suspensão de P(3HB), água e solvente sob agitação (B) (tempo de agitação).



**Tabela 4.1.** Tempos de repouso e agitação das etapas do processo de extração de P(3HB) com carbonato de propileno.

Ensaio	Tempo de repouso (h)	Tempo de agitação (h)
1	12	12
2	0	12
3	0,5	0,5
4	0	0,5

#### 4.2.6 Determinação de P(3HB)

A concentração de P(3HB) nas amostras de polímeros extraídos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme o método descrito por Karr, Waters e Emerich (1983). Esta análise foi realizada em um HPLC Perkin Elmer Series 200. A concentração polimérica foi detectada a 210 nm em detector ultravioleta (fluxo de solvente ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM) de  $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

Quantidades conhecidas das amostras de P(3HB) a serem analisadas (em torno de 10 mg), pesadas em tubo de ensaio com tampa de rosca (balança analítica BEL Engineering), foram ressuspensas em 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (99,0 %). Os tubos contendo a suspensão foram inseridos em banho Maria a  $98 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 30 min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, diluídas 10 vezes em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 mM) e filtradas em membrana de acetato de celulose ( $0,45 \mu\text{m}$ ). Um volume de  $500 \mu\text{L}$  de cada amostra (filtrada) foi armazenado em tubo de vidro com tampas, para posterior análise.

Para a elaboração da curva padrão de P(3HB), 20 mg de polímero puro (P(3HB) da Sigma-Aldrich) foi ressuspense em 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e submetido ao método descrito acima (KARR; WATERS; EMERICH, 1983). Por fim, a solução de P(3HB) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foi diluída, a fim de se obter concentrações de 0,2, 1, 2, 5, 10 e  $20 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

#### 4.2.7 Caracterização de P(3HB)

As amostras dos polímeros extraídos de *Cupriavidus necator* DSM 545 com os diferentes métodos de extração: com carbonato de propileno, homogeneizador e carbonato de propileno e com clorofórmio, e dos polímeros comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich, foram submetidas às seguintes análises: espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A determinação da massa molar de P(3HB) foi realizada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), porém esta análise foi

realizada apenas na amostra de polímero extraído com a melhor condição indicada.

#### ***4.2.7.1 Identificação do polímero por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)***

A identificação do P(3HB) foi realizada pela caracterização dos grupamentos funcionais dos biopolímeros comerciais e extraídos, por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em equipamento Perkin Elmer Spectrum 100 IR (Central analítica de Química – UFSC), no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , pela técnica de refletância difusa.

#### ***4.2.7.2 Análise Termogravimétrica (TGA)***

Análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a degradação térmica do biopolímero extraído, com os diferentes métodos avaliados e dos polímeros comerciais, sendo possível obter a temperatura de início de degradação ( $T_i$ ), a temperatura máxima de degradação ( $T_p$ ) e a porcentagem de perda de massa do P(3HB) extraído. A análise foi realizada em uma termobalança TGA-Q50/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE). As amostras foram aquecidas de 25 a 600  $^{\circ}\text{C}$  a uma velocidade de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , sob atmosfera de nitrogênio.

#### ***4.2.7.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)***

As medidas de DSC foram realizadas utilizando-se o equipamento DSC Perkin-Elmer, Jade (Massachusetts, USA) (Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI)/UFSC) para caracterizar os biopolímeros quanto à temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e grau de cristalinidade ( $X_c$ ). Amostras de 5  $\text{mg} \pm 1 \text{ mg}$  foram fechadas em cápsulas de alumínio e analisadas. O equipamento foi previamente calibrado com Índio e Zinco, utilizando-se gás de arraste  $\text{N}_2$  com vazão de 50  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . As amostras foram aquecidas sob atmosfera inerte (vazão de nitrogênio de 50  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) de -40  $^{\circ}\text{C}$  a 200  $^{\circ}\text{C}$  em velocidade de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}$

$\text{min}^{-1}$ , durante 2 min e, em seguida, resfriadas até  $-40^\circ\text{C}$ , sendo novamente aquecida a  $200^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ .

A  $T_m$  e o  $X_c$  foram determinados a partir do 1º aquecimento, pois refletem os valores reais das amostras. O 2º aquecimento foi realizado para visualizar a  $T_g$ , difícil de determinar no primeiro aquecimento devido à alta cristalinidade do P(3HB) (GARCIA, 2006).

A cristalinidade ( $X_c$ ) do polímero foi determinada a partir da relação entre a entalpia de fusão da amostra ( $\Delta H_m$ ) e a entalpia de fusão de P(3HB) 100 % cristalino,  $142 \text{ J g}^{-1}$  (TSUJI; IKADA, 1996).

O grau de cristalinidade foi calculado a partir da Equação 4.1.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \quad (4.1)$$

Sendo:  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão da amostra ( $\text{J.g}^{-1}$ ),  $\Delta H_c$  é a entalpia de cristalização da amostra ( $\text{J.g}^{-1}$ ),  $\Delta H_m^0$  é a entalpia de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $\text{J.g}^{-1}$ ). Para P(3HB)  $\Delta H_m^0 = 142 \text{ J.g}^{-1}$  (TSUJI e IKADA, 1996).

#### **4.2.7.4 Determinação da massa molar de P(3HB)**

A determinação da massa molar do polímero extraído foi realizada conforme análise descrita no item (2.2.4) do capítulo 2.

### **4.3 Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 Influência das variáveis de homogeneização na extração com alta pressão e carbonato de propileno**

Após o tratamento da biomassa em homogeneizador à alta pressão, as células foram secas e o P(3HB) foi recuperado com carbonato de propileno, sob temperatura de  $150^\circ\text{C}$ , nos tempos de contato das células com solvente de 5 e 15 min. Em paralelo, para verificar a influência da alta pressão na massa molar do P(3HB), foram

realizados ensaios de extração com carbonato de propileno a partir de biomassa sem tratamento (controle), nas mesmas condições citadas.

Na Tabela 4.2 estão apresentados os resultados de recuperação e pureza obtidos a partir das extrações controle e com homogeneizador à alta pressão, com variação na pressão de operação e número de passagens, e carbonato de propileno aquecido a 150 °C nos tempos de contato célula/solvente de 5 e 15 min.

**Tabela 4.2.** Recuperação e pureza para polímeros extraídos com o método controle e com homogeneizador à alta pressão, em diferentes pressões e número de passagens, e carbonato de propileno a 150 °C e tempo de contato das células com solvente de 5 e 15 min. Ensaios realizados em duplicata, onde os dados de recuperação e pureza correspondem à média dos ensaios com os respectivos desvios médios.

Pressão (bar)	N° passagens	Recuperação (%) (m/m)	
		5 min	15 min
500	1	71,6±0,84	75,2±0,83
	2	67,6±3,49	73,5±0,01
	3	88,0±0,03	97,5±1,99
900	1	97,8±0,05	98,2±1,31
	2	95,6±3,27	97,3±3,05
	3	96,7±0,57	98,3±1,49
1300	1	98,0±0,45	95,1±0,92
	2	94,1±1,29	99,25±0,25
	3	95,4±1,42	98,8±0,64
1500	1	96,6±1,39	96,0±0,74
	2	94,3±1,78	96,9±3,45
	3	96,6±2,93	96,9±2,16
Controle		53,9±1,28	65,0±3,03

**Nota:** Pressões de operação de 500, 900, 1300 e 1500 bar; Número de passagens de 1, 2 e 3.

Nos ensaios de extração realizados com pressão de homogeneização de 500 bar, o número de passagens e o tempo de contato das células com o solvente influenciaram nos resultados de recuperação de P(3HB) obtidos, pois com 3 passagens da suspensão celular e com 15 min de contato das células com solvente, obtiveram-se os resultados mais elevados de recuperação polimérica para esta pressão (97,5 % (m/m)). Este fato evidencia que, com o tratamento da biomassa a 500 bar e 3 passagens, um maior tempo de contato das células com o solvente se fez necessário, para desestabilização das células que não foram rompidas e solubilização do polímero pelo solvente, para a obtenção de valores de recuperação de P(3HB) elevados. Ling *et al.* (1997) realizaram extração de P(3HB), a partir de *E. coli*, com homogeneizador à alta pressão, a 550 bar e 4 passagens, e obtiveram, após centrifugação, 72 % (m/m) de recuperação de P(3HB). Vale ressaltar que neste estudo os resultados de recuperação polimérica foram superiores ao obtido no trabalho citado, pois o tratamento da biomassa à alta pressão foi aplicado em conjunto com carbonato de propileno, onde com apenas 1 passagem da suspensão pelo equipamento a 500 bar e tempo de contato células/solvente de 15 min, foi possível a obtenção de 75,2 % (m/m) de P(3HB).

Ainda na Tabela 4.2 observa-se que, com o tratamento da biomassa a 900 bar e 1 passagem e tempo de contato das células com solvente de 5 min, já foi possível obter resultados de recuperação de P(3HB) elevados, 97,8 % (m/m). Tamer, Moo-Young e Chisti (1998a) estudaram o rompimento celular de *Alcaligenes latus* para recuperação de P(3HB) com homogeneizador à alta pressão a 900 bar e obtiveram os seguintes resultados de porcentagem de rompimento celular: 1 passagem: 50 %, 2 passagens: 78 % e 6 passagens: 90 %. No presente estudo, com apenas 1 passagem da suspensão celular de *C. necator*, os resultados de recuperação de P(3HB) foram elevados, o que indica que com esta pressão de operação ocorreu uma desestabilização e/ou rompimento celular que facilitou a ação do solvente na solubilização do biopolímero. Este fato fica evidente quando se analisam os resultados em comparação à extração controle, sem tratamento da biomassa, de

53,9 % e 65,0 % (m/m), para os tempos de contato de 5 e 15 min, respectivamente. Com isso, é possível concluir que estes tempos de contato das células (sem tratamento) com solvente, não são suficientes para que o carbonato de propileno desestabilize a parede celular da bactéria e solubilize o polímero para a obtenção de elevadas porcentagens de recuperação polimérica.

A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno encontrada por Lafferty e Heinzle (1979) foi de 87 % (m/m), com aquecimento a 140 °C e tempo de extração de 30 min. Fiorese *et al.* (2009), utilizando carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB) produzido por *C. necator* na temperatura e tempo de extração de 130 °C e 30 min, obtiveram recuperação de 95 % (m/m) e pureza de 84 % (m/m). Vale ressaltar que os resultados de pureza e recuperação são inferiores aos obtidos no presente estudo. Outro fator que merece destaque é que, além de se obter uma maior recuperação de P(3HB), o método aqui proposto ainda apresenta vantagens em relação ao tempo de contato das células com o solvente, ou seja aquecimento durante 5 min.

Quines *et al.* (2015) realizaram extração de P(3HB), a partir da combinação do processo de biomassa tratada termicamente (95 °C durante 45 min), com extração por carbonato de propileno a 150 °C por 45 min e obtiveram elevadas porcentagens de recuperação polimérica (98 % (m/m)) e de pureza (99 % (m/m)). No entanto é importante destacar, que com base nos resultados de massa molar apresentados no capítulo 3, que na extração realizada com carbonato de propileno a 150 °C/45 min, a degradação térmica da massa molar polimérica foi superior a 50 %, quando comparada à massa molar do polímero extraído com 5 min estes resultados não se mostram interessantes.

O presente estudo sugere a utilização da pressão de 900 bar, 1 passagem da biomassa pelo equipamento e tempo de contato das células com solvente de 5 min, na extração com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, como a melhor condição testada. Com pressão de 500 bar e 3 passagens, também foram obtidas elevadas porcentagens de recuperação de P(3HB), porém ao se considerar o

tempo de processo e gasto de energia, é mais interessante a aplicação de pressão mais elevada e apenas uma passagem da biomassa pelo equipamento.

Os resultados obtidos para a melhor condição de extração definida neste capítulo, quando comparados com os do capítulo 3, apresentam a vantagem de utilizar pressões de operação mais brandas e com apenas um ciclo de aplicação, o que representa economia do processo com equipamento (valor proporcional à pressão de operação), com o tempo de processo e, conseqüentemente, com energia. Neste sentido, ressalta-se que o método de extração aqui proposto, homogeneizador à alta pressão (900 bar e 1 passagem) e carbonato de propileno, atingiu elevados resultados de recuperação de P(3HB), em apenas 5 min de tempo de contato das células com solvente.

#### **4.3.2 Caracterização do P(3HB) extraído com carbonato de propileno**

Com objetivo de estudar a influência do processo de extração na qualidade do biopolímero extraído, nas condições de processo em que as maiores porcentagens de pureza e recuperação foram obtidas, ou seja, homogeneização a 900 bar e 1 passagem e recuperação com solvente a 150 °C por 5 min, a amostra de P(3HB) extraída nesta condição foi caracterizada por FTIR, DSC, TGA e GPC. A fim de avaliar a possibilidade de influência da etapa de homogeneização à alta pressão nas características do polímero extraído, realizou-se a caracterização do polímero obtido com o método de extração controle (sem tratamento da biomassa) (150 °C durante 5 min).

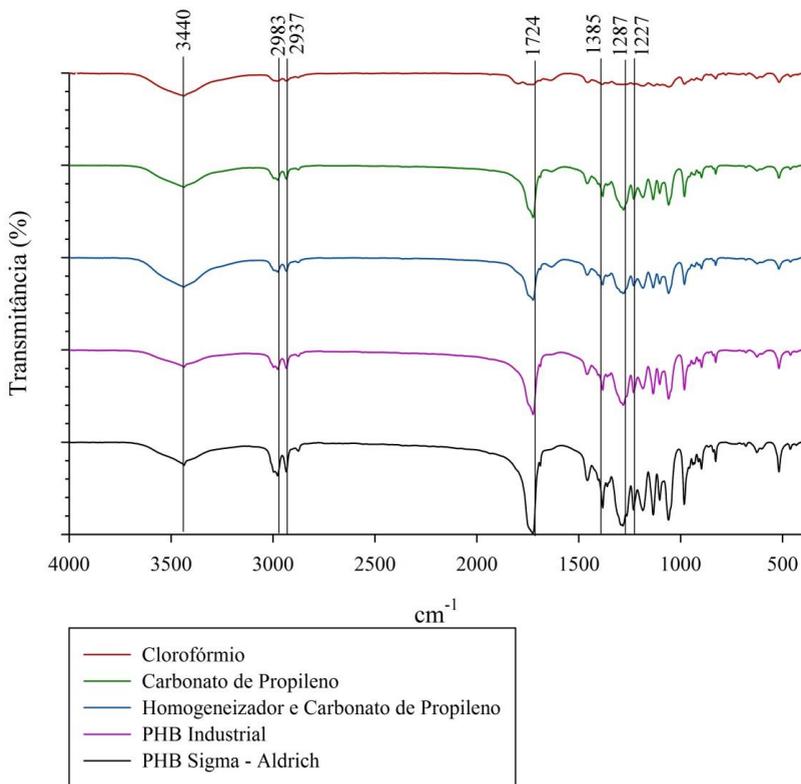
Para efeito comparativo, amostras de P(3HB) extraído com clorofórmio e amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich, também foram caracterizadas. Vale destacar que a biomassa utilizada para os ensaios de extração deste estudo foi proveniente de um mesmo cultivo com 72,5 % (m/m) de P(3HB).

### 4.3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para identificação pela caracterização dos grupamentos funcionais do polímero produzido por *C. necator* e extraído com os diferentes métodos de extração, assim como avaliar a influência do processo de extração proposto neste trabalho na estrutura do polímero. A Figura 4.3 apresenta os espectros de FTIR para os biopolímeros extraídos pelos diferentes métodos, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, controle, clorofórmio e das amostras de P(3HB) comerciais, onde picos característicos do P(3HB) podem ser observados para as amostras extraídas com os diferentes métodos e confirmados a partir dos picos dos espectros das amostras de P(3HB) comerciais.

Segundo Xu *et al.* (2002), Garcia (2006), Paula, Campos e Mano (2014), Bhuwal *et al.* (2013) e Pachekoski, Dalmolin e Agnelli (2013), bandas em torno de 2928 e 2988  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H na cadeia de P(3HB). Nas amostras analisadas, estes valores foram de 2937 e 2983  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas em 1724  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas e são atribuídas a deformações axiais da carbonila C=O e o alongamento simétrico e assimétrico do grupo C-O-C pode ser representado em bandas de absorção entre 1227-1287  $\text{cm}^{-1}$  (HONG *et al.*, 1999; BAGHERIASL, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2014). De acordo com Pachekoski, Dalmolin e Agnelli (2013), a técnica FTIR pode ser utilizada para determinar o grau de cristalização do P(3HB), pelo monitoramento da deformação da carbonila C = O, região vibracional entre 1700 e 1780  $\text{cm}^{-1}$ . Liao, Noda e Frank (2009) afirmam que as alterações espectrais durante a cristalização do P(3HB) representam a banda da carbonila em 1740-1720  $\text{cm}^{-1}$ , onde a fase amorfa está próxima a 1,738  $\text{cm}^{-1}$  enquanto que a banda da fase cristalina está em torno de 1722  $\text{cm}^{-1}$ . No presente estudo, um pico em 1724  $\text{cm}^{-1}$  foi observado, evidenciando a cristalinidade das amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes métodos.

**Figura 4.3.** Espectro de FTIR para as amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio, carbonato de propileno (controle), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich.



O pico de deformação angular simétrica dos grupos  $\text{CH}_3$  em  $1385 \text{ cm}^{-1}$  foi observado e está de acordo com os picos descritos por Vogelsanger *et al.* (2002), Xu *et al.* (2002) e Garcia (2006) para o P(3HB). Bandas em  $3440 \text{ cm}^{-1}$  também foram observadas, para todas as amostras analisadas e podem ser devido à presença de umidade nas amostras (TORRES; ALMEIDA; HABAS, 2011; APATI, 2012). Camargo *et al.* (2012) analisando biopolímero da PHB industrial

(Serrana, SP) observaram um pico em  $3443\text{ cm}^{-1}$ , o qual foi atribuído ao estiramento OH, indicando presença de umidade no material.

Nota-se que o espectro no infravermelho obtido para amostra de P(3HB) extraída com clorofórmio apresenta bandas de menor intensidade que os espectros das outras amostras poliméricas analisadas. Este fato pode estar relacionado com a forma desta amostra, pois esta foi extraída com o método desenvolvido por Dalcanton (2006), no final o polímero é obtido por *casting*. De acordo com Canevarolo (2007), a intensidade das bandas (% transmitância) é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. Assim, não se recomenda a utilização de amostra na forma de filme para a análise de FTIR, devido à dificuldade de trituração da amostra e da obtenção de partículas com tamanhos homogêneos e uniformes, o que pode interferir na incidência e transmitância de energia na amostra e, conseqüentemente, resultar em espectro com bandas de menor intensidade.

Na Tabela 4.3 podem ser observadas as bandas características para o P(3HB), no espectro de Infravermelho, reportadas da literatura e para as amostras poliméricas analisadas no presente estudo.

**Tabela 4.3.** Bandas características no espectro de FTIR para os P(3HB) extraídos pelos diferentes métodos, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, controle, clorofórmio e das amostras de P(3HB) comerciais, comparadas com a literatura.

Atribuição do grupo funcional	$\lambda$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) para P(3HB) (literatura)	$\lambda$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) para amostras de P(3HB) analisadas ( $\text{cm}^{-1}$ )
C-H	2928 - 2988	2937 - 2983
C=O	1700 - 1780	1724
C-O-C	1178 - 1282	1227-1287
CH <sub>3</sub>	1380 - 1382	1385

Com a análise de FTIR, foi possível confirmar as amostras de polímero extraídas, com os diferentes métodos de extração, como sendo o P(3HB) e concluir que o processo de extração deste a partir de cultivo de *C. necator*, com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, não causou alterações químicas drásticas em sua cadeia polimérica, pois os picos de absorção observados nos espectros estão de acordo com os reportados na literatura para o espectro de P(3HB) puro e também com os obtidos neste capítulo para as amostras de P(3HB) da Sigma-Aldrich e da PHB industrial.

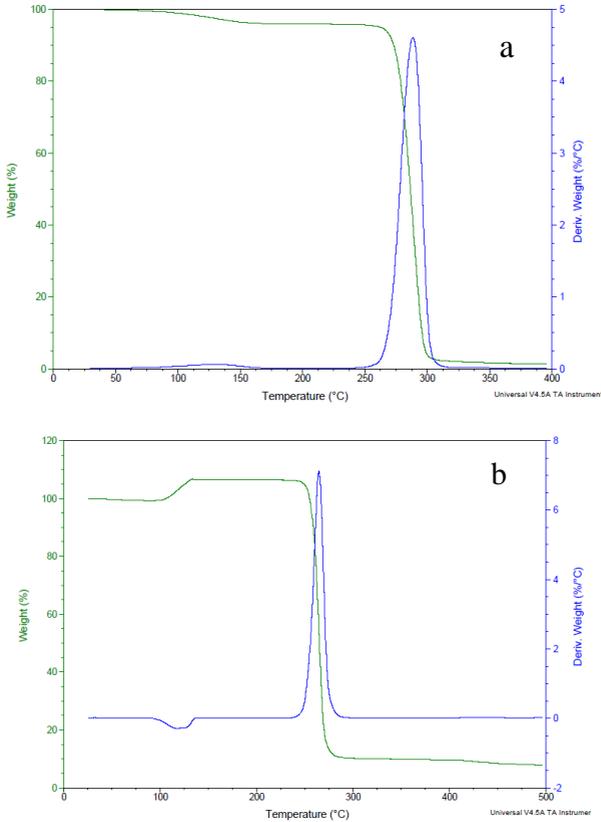
#### 4.3.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

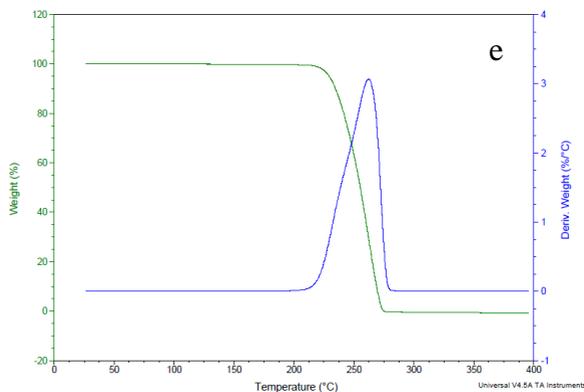
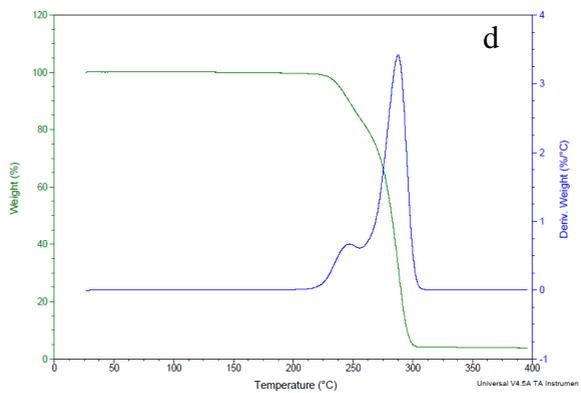
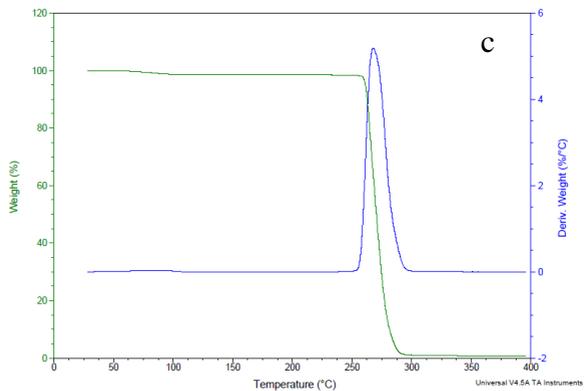
A Tabela 4.4 apresenta os dados de caracterização, obtidos a partir da análise termogravimétrica (TGA). Na Figura 4.4 são apresentadas as curvas de TGA das amostras de P(3HB) extraído com carbonato de propileno (controle), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, clorofórmio, e para as amostras de P(3HB) comerciais.

**Tabela 4.4.** Dados de temperatura de início de degradação (Ti), temperatura máxima de degradação (Tp) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA das amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes métodos, clorofórmio, carbonato de propileno, homogeneizador e carbonato de propileno e dos polímeros comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich.

Amostra de P(3HB)	Ti (°C)	Tp (°C)	Perda de massa (%)
Clorofórmio	258,4	288,3	93,5
Carbonato de propileno	244,5	264,4	96,7
Homogeneizador e carbonato de propileno	257,6	268,2	98,3
PHB industrial	229,3	287,5	94,3
PHB Sigma-Aldrich	216,4	261,8	98,9

**Figura 4.4.** Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, das amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio (a), carbonato de propileno (controle) (b), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno (c), e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial (d) e Sigma-Aldrich (e).





A análise de TGA, além de determinar a temperatura de degradação polimérica, também é importante para caracterizar o grau de pureza de um polímero, pois a porcentagem de perda de massa representa a degradação total do material polimérico, sendo que a parte não degradada é referente às impurezas não voláteis (CANEVAROLO, 2007).

Todas as amostras de P(3HB) analisadas apresentaram perfis de degradação semelhantes (Figura 4.4), com apenas 1 estágio de perda de massa, atribuído à decomposição do P(3HB). O mecanismo de degradação térmica do P(3HB) ocorre em duas etapas, onde entre 170 a 200 °C são formadas espécies voláteis por um mecanismo de cisão de cadeia aleatória, por reação de  $\beta$ -eliminação, de 200 a 300 °C os oligômeros de P(3HB) são quebrados em unidades monoméricas de ácido crotônico (CHOI *et al.*, 2003; MOUSAVIOUN; GEORGE; DOHERTY, 2012; PAULA; CAMPOS; MANO, 2014).

Nota-se na Tabela 4.4 que as amostras de P(3HB) analisadas apresentaram estabilidade térmica, com  $T_i$  entre 216,4 e 258,4 °C e temperatura máxima de degradação em cerca de 261,8 e 288,3 °C. As amostras de P(3HB) extraídas com carbonato de propileno (controle) e com homogeneizador à alta pressão e solvente, apresentaram estabilidade térmica semelhante, com temperaturas de início de degradação ( $T_i$ ) de 244,5 e 257,6 °C e temperaturas máximas de degradação ( $T_p$ ) de 264,4 e 268,2 °C, respectivamente.

Machado *et al.* (2010) obtiveram P(3HB) com  $T_i$  de 225 °C, valor inferior aos obtidos para os biopolímeros extraídos com carbonato de propileno e com homogeneizador e solvente neste estudo. Temperaturas de início de degradação inferiores às extraídas com os diferentes métodos foram obtidas para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich, de 229,3 e 216,4 °C, respectivamente, o que indica que os biopolímeros extraídos, com os diferentes métodos, iniciaram sua degradação em temperaturas superiores às dos polímeros comerciais. É interessante ressaltar que a obtenção de polímeros com temperaturas de início de degradação mais elevadas é um fator comercialmente positivo, uma vez que esta

característica favorece a sua aplicação nos processos de transformação com menor risco de degradação térmica.

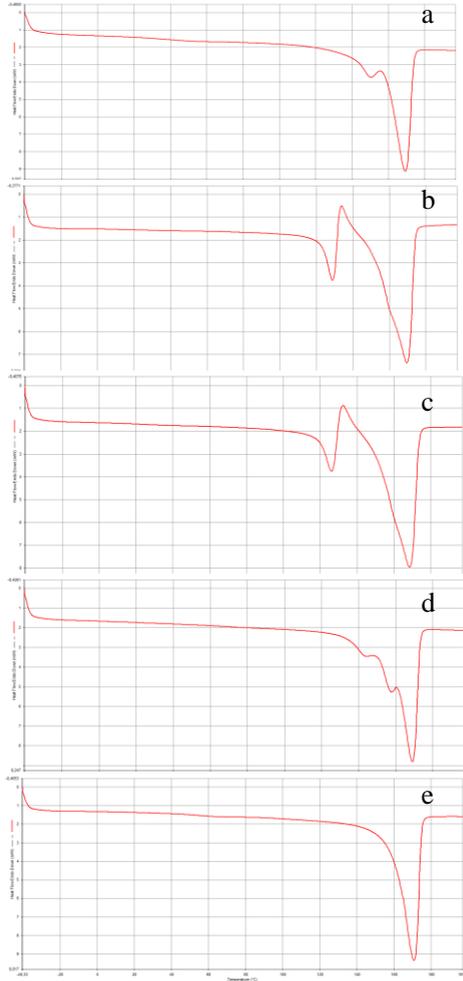
A análise de TGA também é uma ferramenta importante para avaliar a pureza de polímeros, a partir da perda de massa, pois a parte não degradada é referente às impurezas inorgânicas da amostra. Observa-se que os dados de pureza (Tabela 4.4), representados pelas perdas de massa para as amostras extraídas com os diferentes métodos e para os polímeros comerciais, variaram entre 93,5 e 98,9 % (m/m), sendo o polímero da Sigma-Aldrich o de pureza mais elevada. Nota-se que o polímero extraído com o método proposto neste trabalho, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, apresentou pureza (98,3 % (m/m)) muito próxima à obtida para o P(3HB) Sigma-Aldrich, comercializado como biopolímero de elevada pureza para aplicação como padrão de P(3HB), e superior ao polímero da PHB industrial. Este resultado mostra que com o método de extração aqui proposto obteve-se um polímero com pureza elevada e comparável a de um P(3HB) comercial considerado altamente puro.

A pureza obtida para o polímero extraído com clorofórmio foi de 93,5 % (m/m). Este valor sugere a presença de impurezas no filme polimérico que podem ser atribuídas a resíduos celulares que foram solubilizados pelo clorofórmio na etapa de extração, pois no método de extração desenvolvido por Dalcanton (2006) o polímero é obtido a partir da evaporação do clorofórmio e formação de um filme, sendo que qualquer impureza solubilizada permanece no polímero ao final do processo.

#### ***4.3.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)***

Os resultados da análise térmica por DSC (curvas de DSC apresentadas na Figura 4.5) dos polímeros obtidos com os diferentes métodos de extração, clorofórmio, carbonato de propileno, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, juntamente com as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich, estão apresentados na Tabela 4.5.

**Figura 4.5.** Curvas de DSC para as amostras de P(3HB) extraídas de *Cupriavidus necator* com os diferentes métodos de extração, clorofórmio (a), carbonato de propileno (controle) (b), homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno (c), e para as amostras de P(3HB) comerciais, PHB industrial (d) e Sigma-Aldrich (e).



**Tabela 4.5.** Dados de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e porcentagem de cristalinidade ( $X_c$ ) obtidos para as amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes métodos e para os polímeros (P(3HB)) comerciais.

Amostra de P(3HB)	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$X_c$ (%)
Clorofórmio	-4,0	169,3	63,7
Carbonato de propileno	-0,8	169,7	68,1
Homogeneizador e carbonato de propileno	-1,2	168,7	65,5
PHB industrial	-6,7	169,0	73,7
PHB Sigma-Aldrich	-2,8	170,8	70,5

A temperatura de fusão dos polímeros comerciais, PHB industrial e Sigma-Aldrich, e dos polímeros extraídos neste estudo foram similares, entre 168,7 e 170,8°C. Todos os valores obtidos para as temperaturas de fusão de P(3HB) estão entre o intervalo de dados reportados da literatura, de 160 – 180 °C (BHUWAL *et al.*, 2013; TANAMOOOL *et al.*, 2011; KANJIRATHUMUTIL, 2012; FIORESE *et al.* 2009; DALCANTON, 2006; MARJADI; DHARAIYA, 2014; MATKO; TONKA; IVKA, 2005; CROCHEMORE *et al.*, 2013).

A temperatura de fusão é uma característica de extrema importância devido às limitações de aplicação de polímeros que apresentam temperatura de degradação térmica próxima à temperatura de fusão em processos de moldagem e que exigem manipulação dos polímeros em elevadas temperaturas (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Com base nos resultados de  $T_i$  (257,6 °C), apresentado no item anterior, e de  $T_m$  (168,7 °C), para o polímero extraído com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, observa-se que o P(3HB) extraído com este método pode ser processado a uma temperatura inferior à

temperatura de degradação, o que reduz as possibilidades de degradação polimérica durante processos de extrusão, injeção e termoformagem.

Ambos os polímeros extraídos com os métodos que utilizam carbonato de propileno mostraram o mesmo comportamento, apresentando dois picos endotérmicos (curvas de DSC no Anexo III), um pico principal e outro pico menor denominado de temperatura de fusão secundária a uma temperatura mais baixa (126,4 e 128,9° C). O aparecimento desse pico secundário de fusão pode estar relacionado à presença de cristais poliméricos de tamanhos menores que fundem a uma temperatura inferior que os outros cristais.

Os valores de Tg encontrados para os polímeros analisados foram entre -6,7 e -0,8 °C. De acordo com Anderson e Dawes (1990), valores de Tg entre -5 e 5 °C caracterizam P(3HB), com exceção da amostra de polímero da PHB Industrial, todos os polímeros analisados apresentaram Tg dentro da faixa citada.

As temperaturas de transição vítrea (Tg), para as amostras extraídas com carbonato de propileno (Tg = -0,8), homogeneizador e solvente (Tg = -1,2), também foram inferiores aos valores reportados na literatura para P(3HB) extraído de *C. necator* com carbonato de propileno, ou seja, de 4,9 °C (FIORESE *et al.*, 2009). Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001) quanto menor a temperatura de transição vítrea, mais flexível é o material.

O grau de cristalinidade dos biopolímeros extraídos de *C. necator* neste estudo variaram entre 63,7 % e 68,1 %, que estão dentro do intervalo reportado na literatura para P(3HB), 55-80 % (HOLMES; LIM, 1990; GRIGULL *et al.*, 2008; SUDESH; ABE; DOI, 2000). As amostras de polímero comercial apresentaram valores de cristalinidade superiores (70,5 % e 73,7 %) aos polímeros extraídos de *C. necator* com os diferentes métodos. O grau de cristalinidade tem influência significativa sobre as propriedades mecânicas do biopolímero, pois este afeta a extensão das ligações secundárias intermoleculares, existentes nas regiões cristalinas, e quanto maior a cristalinidade de um polímero mais quebradiço e rígido é o material (MACHADO *et al.*, 2010).

O polímero extraído com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno apresentou cristalinidade de 65,5 %. Essa característica é importante para a aplicação do biopolímero, pois com menor cristalinidade obtém-se um polímero com maior flexibilidade e menor fragilidade, podendo ser aplicado em diversas áreas, como em embalagens para alimentos e cosméticos e na área médica na confecção de próteses.

#### 4.3.2.4 Determinação da massa molar de P(3HB)

A determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, nas condições de operação de 900 bar e 1 passagem, foi realizada por cromatografia de permeação em gel (GPC).

A Tabela 4.6 apresenta a massa molar ponderal média ( $M_w$ ) e índice de polidispersão (IP) do P(3HB) extraído com método proposto, homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno e dos polímeros da PHB industrial e Sigma-aldrich (dados reportados de Dalcanton, 2006 e Chochemore *et al.* 2013).

**Tabela 4.6.** Dados de massa molar ponderal média ( $M_w$ ) e de índice de polidispersão ( $I_p$ ) para o polímero extraído com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno, juntamente com as amostras de P(3HB) comerciais (dados reportados da literatura).

P(3HB)	$M_w$ (Da)	IP
Homogeneizador e carbonato de propileno	$3,3 \times 10^5$	2,1
*PHB industrial	$2,1 \times 10^5$	1,41
*Sigma-Aldrich	$2,5 \times 10^5$	2,2

\*Dados reportados de Dalcanton (2006) para o polímero da PHB industrial e de Crochemore *et al.* (2013) para o P(3HB) Sigma-Aldrich.

A massa molar do P(3HB) é definida durante a sua produção e depende das variáveis de cultivo empregadas, isto é, das estratégias de

adição de nutrientes, modo de operação, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, do nutriente limitante, da fonte de carbono e do microrganismo (TAIDI; MANSFIELD; ANDERSON, 1995; XIN *et al.*, 2011; PEÑA *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014). O processo de extração também exprime elevado impacto na massa molar do P(3HB), devido à possibilidade de redução da mesma (KHANNA; SRIVASTAVA, 2004). Desta forma, esta propriedade molecular está diretamente associada aos processos de produção e de extração deste biopolímero. A importância da caracterização da massa molar de P(3HB), como fator de avaliação da adequação deste para determinada aplicação, está relacionada com o fato desta característica influenciar diretamente a processabilidade e as propriedades físicas e mecânicas deste polímero (PEÑA *et al.*, 2014).

O biopolímero extraído de *C. necator* com homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno apresentou massa molar de  $3,3 \times 10^5$  Da, valor ligeiramente superior aos reportados da literatura para os polímeros comerciais, de  $2,1 \times 10^5$  Da (PHB industrial) e  $2,5 \times 10^5$  Da (Sigma-Aldrich). Do ponto de vista biotecnológico, a obtenção de P(3HB) de elevada massa molar, entre  $2 \times 10^5$  Da e  $6 \times 10^5$  Da, pode ampliar o potencial de aplicação deste polímero, especialmente na área médica (KANJIRATHUMUTIL, 2012; PAULA; CAMPOS; MANO, 2014; PEÑA *et al.*, 2014). Embora o P(3HB) apresente elevado custo quando comparado aos plásticos de origem petroquímica, o seu elevado custo de produção não implica na limitação da sua aplicação no campo da medicina, por ser aplicação de ponta, de alto valor agregado. Assim, o resultado de massa molar obtido para o polímero extraído de *Cupriavidus necator* com o método proposto neste estudo, evidencia a eficiência deste método, pois possibilitou a obtenção de um polímero com massa molar adequada para uma ampla faixa de aplicação.

O índice de polidispersão foi de 2,1 para a extração com homogeneizador e solvente, valor este inferior ao obtido por Fiorese *et al.* (2009), que obtiveram 3,1 para o P(3HB) extraído com carbonato de propileno, sob outras condições de extração. A polidispersividade de um

polímero caracteriza a homogeneidade da distribuição do tamanho médio das cadeias poliméricas, quanto mais próximo de 1, mais homogênea é a cadeia. Polímeros lineares como o P(3HB) geralmente apresentam uma polidispersão estreita, e se o valor for próximo a dois é chamado de distribuição “mais provável” (CANEVAROLO, 2013).

### **4.3.3 Avaliação do tempo de repouso na recuperação e na massa molar de P(3HB) extraído com carbonato de propileno**

Com o objetivo de investigar a influência dos tempos de repouso e tempo de agitação no processo de extração com carbonato de propileno sobre os resultados de recuperação polimérica, pureza e massa molar do polímero obtido, foram realizados ensaios de extração de P(3HB), com a variação destes tempos. Como o objetivo desta etapa não foi a obtenção de elevadas porcentagens de recuperação polimérica, estes ensaios de extração foram realizados a partir de biomassa de *C. necator* sem tratamento (contendo 69,0 % (m/m) de P(3HB)) apenas com carbonato de propileno.

Na Tabela 4.7 estão apresentados os resultados de recuperação de P(3HB), pureza e massa molar para os polímeros extraídos com a variação dos tempos de repouso (Tr) e agitação (Ta) do método de extração com carbonato de propileno.

**Tabela 4.7.** Resultados obtidos para recuperação polimérica, pureza e massa molar ponderal média (Mw) do P(3HB) extraído com carbonato de propileno com variação nos tempos de repouso (Tr) e agitação (Ta). Os dados de recuperação e pureza correspondem a uma média de dois ensaios com os respectivos desvios médios.

Ensaio	Tr	Ta	Recuperação (%) (m/m)	Pureza (%) (m/m)	Mw (Da)
1	12	12	81,2±1,09	96,7±1,58	8x10 <sup>4</sup>
2	0	12	80,1±1,16	95,0±0,26	8,2x10 <sup>4</sup>
3	0,5	0,5	83,7±0,37	97,5±1,56	8,8x10 <sup>4</sup>
4	0	0,5	81,7±0,53	98,4±0,6	8,8x10 <sup>4</sup>

Neste estudo, para os quatro ensaios realizados, as condições de extração com carbonato de propileno foram as mesmas, variando apenas os tempos de repouso e agitação. Conclui-se que estas variáveis não influenciaram nas respostas porcentagem de recuperação, porcentagem de pureza e massa molar na extração de P(3HB) de *C. necator*. Estes resultados sugerem a definição do tempo de agitação de 0,5 h e a dispensa do tempo de repouso. Vale ressaltar que o tempo de agitação da suspensão de P(3HB), água e carbonato de propileno deve existir, pois nesta etapa ocorre a purificação (limpeza) do polímero, o que pode interferir na sua pureza final.

De acordo com Fiorese *et al.* (2009), os tempos de repouso e agitação presentes no processo de extração com carbonato de propileno influenciam na pureza, recuperação e na massa molar do polímero obtido, pois com o aumento do tempo de repouso, da solução formada por P(3HB) e solvente, ocorre maior precipitação das cadeias poliméricas e obtém-se maiores percentuais de recuperação e pureza e um polímero com maior massa molar, porém no presente estudo o mesmo comportamento não foi observado.

Nota-se na Tabela 4.7 que os tempos de repouso não influenciaram nos resultados de recuperação, pureza e massa molar do

polímero extraído. O que confirma o fato de que a massa molar do P(3HB) é definida durante a fase de produção do mesmo.

A massa molar ( $M_w$ ) obtida neste estudo foi inferior a outras citadas na literatura, de  $6,3 \times 10^5$  Da (FIGUEIREDO *et al.*, 2014),  $2 \times 10^5$  Da (VERLINDEN *et al.*, 2011) e  $1,47 \times 10^5$  Da (MOHAMMAD *et al.*, 2012), para P(3HB) produzido por *C. necator*. De acordo com Khanna e Srivastava (2004), a  $M_w$  de P(3HB) produzido por bactérias é normalmente na faixa de  $1,0 \times 10^4$  e  $3,0 \times 10^6$  Da.

De acordo com Canevarolo (2013), as cadeias de um polímero podem ser rompidas, com aquecimento a altas temperaturas, formando outras de tamanho menor, com consequente mudança na estrutura química e redução da massa molar. Como no presente trabalho a biomassa de *C. necator* com P(3HB) foi submetida à extração polimérica com solvente sob aquecimento a  $150^\circ\text{C}$  durante 45 min, ocorreu degradação térmica das cadeias poliméricas do P(3HB), fato que foi confirmado no capítulo 3.

#### **4.4 Considerações finais**

Com o estudo realizado neste capítulo, é possível concluir que, para o método de extração com homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno, a melhor condição foi obtida com a pressão de 900 bar e 5 min de contato das células com carbonato de propileno aquecido a  $150^\circ\text{C}$ , pois foram obtidos elevados percentuais de recuperação de P(3HB) com apenas uma passagem da biomassa pelo homogeneizador. O aumento do número das passagens da suspensão celular pelo equipamento e das pressões de operação (superiores a 900 bar, dentro da faixa estudada) não influenciou os resultados de recuperação polimérica.

Sob a melhor condição de extração obteve-se 97,8 % (m/m) de recuperação polimérica com pureza de 98,3 % (m/m) e o P(3HB) extraído apresentou massa molar de  $3,3 \times 10^5$  Da, com índice de polidispersão de 2,1. A caracterização térmica do P(3HB) extraído com

homogeneizador à alta pressão e carbonato de propileno mostrou que este biopolímero apresenta propriedades muito similares às amostras de P(3HB) comerciais.

A caracterização mostrou que os polímeros extraídos de *C. necator*, com clorofórmio, carbonato de propileno e homogeneizador à alta pressão e solvente, apresentam propriedades similares entre si e aos P(3HB) comerciais. Nas condições avaliadas neste trabalho, o processo de homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno não afeta as propriedades térmicas e a estrutura química do P(3HB) extraído.

Os tempos de repouso e agitação da etapa de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno foram reduzidos de 12 h cada para 0 h e 0,5 h, respectivamente, sem influenciarem na recuperação polimérica, na pureza e na massa molar do polímero extraído.

Com o método de extração aqui proposto foi possível obter uma elevada recuperação de P(3HB), a partir de *C. necator*, com elevada pureza e propriedades físicas semelhantes às dos P(3HB) comerciais, confirmando a qualidade do polímero extraído com um solvente menos agressivo ao meio ambiente.

## **RECUPERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DO CARBONATO DE PROPILENO EMPREGADO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE P(3HB)**

Este capítulo aborda o estudo do efeito da reutilização do carbonato de propileno, recuperado do processo de extração de P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator* na recuperação e pureza do biopolímero extraído. Conforme já foi apresentado nos capítulos anteriores, o carbonato de propileno destaca-se entre os solventes utilizados para extração de P(3HB) por possuir baixa toxicidade e alto ponto de ebulição, o que garante baixo risco de perda por evaporação e alto rendimento de recuperação, com possibilidade de ser reutilizado no processo de extração de P(3HB). Por este motivo, a recuperação e reutilização do solvente no processo de extração de biopolímero se mostra uma alternativa promissora para a possibilidade de redução de custos com solvente no processo de extração.

## **5.1 Introdução**

Estima-se que o impacto do custo de extração de P(3HB), no custo total do processo de produção, possa representar mais de 50 % do valor final do produto (SILVA *et al.*, 2007). Os métodos utilizados no processo de extração de P(3HB) são: extração por solventes orgânicos como clorofórmio (KSHIRSAGAR *et al.*, 2013), carbonato de propileno (FIORESE *et al.*, 2009); e dicloroetano (VANLAUTEM; GILAIN, 1982); digestão enzimática (SUZUKI *et al.*, 2008); métodos mecânicos (TAMER; MOO-YOUNG; CHIST, 1998a) e o uso de soluções aquosas de surfactantes e quelantes (CHEN *et al.*, 2001). Dentre estes, os que fazem uso de solventes são extensivamente utilizados. No entanto, o uso de solventes tóxicos e altamente voláteis para a extração de P(3HB) (por exemplo, clorofórmio) é contraditório ao fato de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009).

Segundo McChalicher, Srienc e Rouse (2009), o solvente ideal para a extração de biopolímeros de microrganismos a pressões atmosféricas, deve ser capaz de dissolver os PHAs abaixo da temperatura de degradação do polímero, minimizando a degradação da cadeia polimérica, ser reutilizável e apresentar baixos riscos ambientais. Neste contexto, a extração de P(3HB) com carbonato de propileno, solvente de baixa toxicidade, foi primeiramente proposta por Lafferty e Heinzle (1979), como alternativa aos solventes clorados. O carbonato de propileno (CP) é um éster de ácido carbônico cíclico e apresenta propriedades interessantes como não persistir no meio ambiente porque é degradado e não é genotóxico, ou seja, não causa danos aos genes de uma célula ou de um organismo (CIR, 1987; EPA, 1998).

Embora haja preocupação sobre a presença de residuais provenientes dos solventes nos biopolímeros, o carbonato de propileno já foi aprovado para uso em aplicações sensíveis, tais como cosméticos e medicamentos (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009). Estudos têm demonstrado que o carbonato de propileno não é facilmente

absorvido através da pele, podendo ser utilizado em uma variedade de cosméticos em concentrações de até 5 % (CIR, 1987).

Na Tabela 5.1 estão apresentados os valores de dose letal 50 ( $DL_{50}$ ), definido como a quantidade de uma substância química que, quando administrada em uma única dose via oral expressa em massa de substância por massa de animal (rato), produz a morte de 50 % dos mesmos, dentro de um período de observação. Esta tabela evidencia o grau de toxicidade de alguns dos solventes reportados na literatura para a extração de PHAs.

**Tabela 5.1.**  $DL_{50}$  aguda (ratos) para alguns solventes empregados no processo de extração de PHAs a partir de microrganismos.

Solvente	$DL_{50}$ (rato – via oral) $mg.kg^{-1}$
<b>Carbonato de propileno</b>	<b>20700</b>
Clorofórmio	908
Hipoclorito de sódio	8200
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	1427
Acetona	5800
Hidróxido de sódio	1350
Metil isobutil cetona	2080
Álcool isoamílico	1300
Cloreto de metileno	1500
Metil isobutil cetona	2080
Dicloroetano	670

Como pode ser observado, dentre os solventes apresentados na Tabela 5.1, o carbonato de propileno é o que apresenta maior valor de DL<sub>50</sub> em ratos, evidenciando sua baixa toxicidade frente aos outros solventes utilizados para extração de PHAs. O carbonato de propileno apresenta a desvantagem de alto custo, no entanto, possui elevado ponto de ebulição, próximo a 240 °C, permitindo que o risco de perda por evaporação seja baixo, podendo ainda ser reutilizado diversas vezes, minimizando os custos de produção de PHAs (McCHALICHER; SRIENC; ROUSE, 2009).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência da reutilização do carbonato de propileno recuperado do processo de extração de P(3HB), a partir de *Cupriavidus necator*, na recuperação e pureza do biopolímero extraído, além de avaliar as perdas do solvente nas etapas do processo.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Extração de P(3HB) com carbonato de propileno**

A biomassa de *Cupriavidus necator* DSM 545 com 69,0 % P(3HB), produzida a partir de glicose, foi utilizada no presente estudo sem tratamento. Ao término do cultivo, as células foram separadas por centrifugação a 2.000 g, durante 15 min. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e submetido à secagem em estufa a 65 °C por 24 h, a fim de evitar a interferência da umidade da biomassa na recuperação do biopolímero com carbonato de propileno.

Para a recuperação do biopolímero com carbonato de propileno foi utilizado o método descrito no item 2.2.2.1, sob aquecimento a 150 °C por 45 min.

## **5.2.2 Determinação de P(3HB)**

Conforme o método descrito no item 4.2.6.

## **5.2.3 Recuperação do carbonato de propileno**

### ***5.2.3.1 Recuperação do carbonato de propileno após extração polimérica***

Visando estudar a eficiência na extração de P(3HB) do solvente carbonato de propileno recuperado, onze extrações sequenciais (em duplicata) foram realizadas a partir de biomassa de *C. necator*, sendo que, ao término de cada extração, o solvente foi recuperado e reutilizado na extração seguinte. Foram efetuados onze ensaios sequenciais de extração de P(3HB) com carbonato de propileno e, conseqüentemente, onze testes de recuperação de solvente. Cumpre destacar que, para a obtenção do mesmo volume de solvente utilizado na primeira extração, adicionou-se solvente não utilizado a fim de completar o volume de 86 mL.

Ao final do processo de extração de P(3HB), após a segunda filtração, obteve-se uma mistura de carbonato de propileno, água e outros componentes celulares solúveis (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos). Para que houvesse a separação da água do solvente, a mistura obtida foi aquecida em banho maria a 90 °C, acoplado a um evaporador rotativo (IKA RV 10 basic) a vácuo, utilizando-se uma bomba a vácuo (J. B. Industries – DV 200N 250) durante 60 min. Este tratamento provocou a evaporação da água, permanecendo no balão somente carbonato de propileno e impurezas solúveis residuais das células (como lipídios).

Para a determinação do rendimento da recuperação do carbonato de propileno, após a extração polimérica, foi utilizada a Equação 5.1.

$$R_s = \left( \frac{V_r}{V_i} \right) \times 100 \quad (5.1)$$

Onde:

$R_s$  = Rendimento de recuperação de solvente após extração (%);

$V_i$  = Volume de carbonato de propileno utilizado na extração (mL);

$V_r$  = Volume de carbonato de propileno recuperado (mL).

A porcentagem de perda de solvente no processo de extração de P(3HB) ( $P_{pex}$  (%)) pode ser obtida a partir da Equação 5.2.

$$P_{pex} = 100 - R_s \quad (5.2)$$

Onde:

$P_{pex}$  = Perda de solvente no processo de extração de P(3HB) (%)

A eficiência da reutilização do solvente no processo de extração de P(3HB) foi definida com a comparação dos resultados de pureza e recuperação das extrações realizadas com solvente recuperado, com os resultados obtidos a partir da extração com solvente puro (utilizado pela primeira vez).

Para a obtenção do mesmo volume de solvente utilizado na primeira extração, foi calculado o *make-up* do processo, que é o volume equivalente ao volume de solvente perdido no processo de extração (Equação 5.3).

$$V_A = V_i - V_r \quad (5.3)$$

Onde:

$V_A$  = Volume de carbonato de propileno puro a ser adicionado a cada nova extração com solvente recuperado (*make-up*) (mL);

$V_i$  = Volume de carbonato de propileno utilizado na extração (mL);

$V_r$  = Volume de carbonato de propileno recuperado (mL).

### **5.2.3.2 Recuperação do carbonato de propileno puro (controle)**

Para quantificar possíveis perdas de carbonato de propileno, apenas durante o processo de recuperação do solvente, foram realizados testes de recuperação (controle) com volumes conhecidos de carbonato de propileno puro e de água destilada, no qual o mesmo volume de solvente utilizado na extração foi misturado ao mesmo volume de água (utilizada para precipitação e lavagem do P(3HB)). Assim, para separar a água do solvente, a mistura foi aquecida em evaporador rotativo conforme descrito no item 5.2.3.1. O rendimento de recuperação de solvente ( $R_{sp}$  (%)) foi calculado a partir da Equação 5.1.

Para a obtenção da porcentagem de perda de solvente apenas na etapa de recuperação do mesmo ( $P_{sp}$  (%)) (separação da água do solvente por evaporação), foi utilizada a Equação 5.4.

$$P_{sp} = 100 - R_{sp} \quad (5.4)$$

Onde:

$P_{sp}$  = Perda de solvente apenas na etapa de recuperação do mesmo (%);

$R_{sp}$  = Rendimento de recuperação de solvente (controle) (%).

### **5.2.3.3 Recuperação do carbonato de propileno após etapas de filtração na extração de P(3HB)**

Visando quantificar possíveis perdas de carbonato de propileno durante as etapas de filtração do processo de extração de P(3HB) com carbonato de propileno, e perdas de solvente retido nas células após a 1<sup>o</sup> filtração, foram realizados testes nos quais uma massa de P(3HB) comercial, PHB industrial, de 2,76 g (massa baseada nos ensaios de extração, pois foram utilizadas 4 g de biomassa com 69,0 % de P(3HB)), foi misturada ao mesmo volume de solvente utilizado na etapa de extração (26 mL) aquecido a 150 °C durante 45 min. Posteriormente, foi realizada a primeira filtração, empregando-se o mesmo volume de solvente utilizado para lavagem dos resíduos celulares retidos (60 mL),

em seguida realizou-se a adição de água destilada (mesmo volume utilizado na extração) para precipitação polimérica e, por fim, a segunda filtração para a separação do polímero da solução formada por água e solvente. Para separar a água do solvente, a mistura foi aquecida em evaporador rotativo conforme descrito no item 5.2.3.1. O rendimento de recuperação de solvente ( $Rf$  (%)) foi calculado a partir da Equação 5.1.

A perda de solvente nas etapas de filtração do processo de extração de P(3HB) ( $Pf$  (%)) foi determinada a partir da Equação 5.5.

$$Pf = 100 - Psp - Rf \quad (5.5)$$

Onde:

$Pf$  = Perda de solvente nas etapas de filtração do processo (%);

$Psp$  = Perda de solvente apenas na etapa de recuperação do mesmo (%);

$Rf$  = Rendimento de recuperação de solvente após as etapas de filtração (%).

Com os valores de perdas de solvente nas etapas de filtração do processo, de recuperação de solvente (evaporação da água) e no processo de extração de P(3HB) de *Cupriavidus necator*, se pode obter a perda de solvente que fica aderida nas células após a primeira filtração ( $Pcel$  (%)) (Equação 5.6).

$$Pcel = Ppex - Psp - Pf \quad (5.6)$$

#### 5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

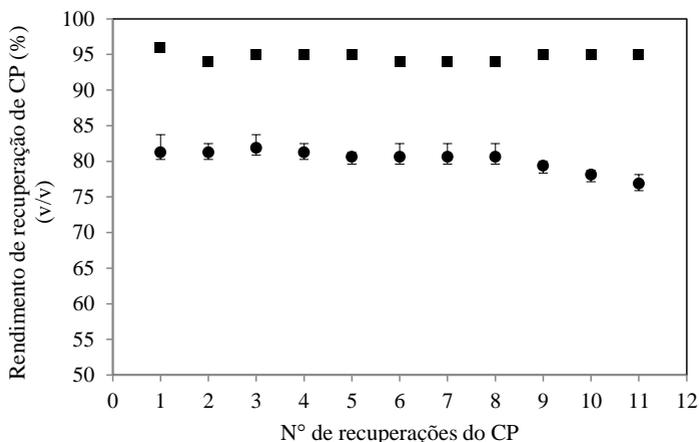
O procedimento foi realizado conforme o método de análise termogravimétrica descrito no item 4.2.7.2. Esta análise foi realizada para se obter as porcentagens de pureza dos polímeros extraídos com carbonato de propileno puro, não recuperado, e com solvente recuperado 11 vezes, a partir da porcentagem da perda de massa, a fim de confirmar a pureza obtida a partir da análise em HPLC descrita no item 4.2.6.

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Recuperação do carbonato de propileno após extração polimérica

Na Figura 5.1 estão apresentados os resultados de rendimentos de recuperação do carbonato de propileno nos ensaios realizados com solvente puro e com solvente reutilizado na extração de P(3HB) de *C. necator* (ensaios realizados em duplicata).

**Figura 5.1.** Resultados de rendimento de recuperação de carbonato de propileno (CP) em % (v/v), obtidos nos ensaios realizados com solvente puro (■) e com CP recuperado no processo de extração (●). Os dados de rendimento de recuperação de CP após extração do polímero correspondem a uma média de dois ensaios e os respectivos desvios médios estão representados pelas barras.



Nota-se na Figura 5.1 que nos ensaios realizados com carbonato de propileno não utilizado, a porcentagem de recuperação ficou entre 94 e 96 % (valor médio de 95 %), indicando que pode ter ocorrido em média 5 % de perdas de carbonato de propileno no processo de recuperação. Estas perdas podem ter ocorrido devido ao arraste

(evaporação) do solvente juntamente com a água durante a etapa de evaporação da água do processo de recuperação do solvente (confirmado nos ensaios com CP puro).

Os valores obtidos de rendimentos de recuperação de carbonato de propileno após a extração ficaram em torno de 80 %, com variação entre 76,9 e 82,0 %. É importante destacar que estes valores (Figura 5.1) se referem ao volume de solvente recuperado, após a extração de P(3HB) de biomassa, constituído de componentes celulares solúveis remanescentes deste processo. De acordo com Aragão *et al.* (1996), a biomassa de *C. necator* é composta por 40 % de proteínas, 14 % de fosfolipídios, 25,6 % de polissacarídeos, 5,5 % de peptidoglicano, 11 % de lipídios, entre outros constituintes em menores concentrações. Alguns destes constituintes celulares, como os lipídios, por exemplo, durante o processo de extração do P(3HB) das células, permanecem solubilizados no carbonato de propileno.

Na Figura 5.1 observa-se um decréscimo no rendimento de recuperação do carbonato de propileno, a partir da oitava recuperação. A diminuição desses valores após oito recuperações de solvente pode ter ocorrido em função das impurezas remanescentes no solvente (resíduos celulares solúveis no solvente a cada extração) e formação de uma solução (carbonato de propileno e impurezas) mais viscosa e, consequentemente, com maior perda de solvente na etapa de extração polimérica.

Não há na literatura estudos sobre o rendimento da recuperação de carbonato de propileno após o processo de extração e nem da sua eficiência após ser reciclado. Mcchalicher, Srienc e Rouse (2009) recuperaram carbonato de propileno, após a extração de P(3HB), a 90 °C sob vácuo, porém não apresentaram os resultados de rendimento de recuperação de solvente e nem se este foi reutilizado no processo de extração. Lafferty e Heinzle (1979) também relataram a recuperação de carbonato de propileno, após extração de P(3HB), e sua eficiente reutilização por três vezes. No entanto, não apresentaram resultados para esta etapa do estudo.

Os resultados dos experimentos de recuperação do solvente, considerando-se todo o processo de extração de P(3HB) realizados, mostraram que ocorreram perdas de cerca de 20 % de solvente durante o processo, sendo necessário um *make-up* desta porcentagem de solvente a cada extração (reposição de 17,2 mL de solvente), e a partir dos resultados de recuperação de solvente puro observa-se que 5 % destas perdas são referentes à etapa de evaporação. Para quantificar as perdas de solvente durante o processo de extração de P(3HB), foram determinadas as porcentagens de perdas de solvente nas seguintes etapas: filtrações do processo de extração de P(3HB) (Pf (%) Eq. 5.5) e perda de solvente que fica aderido nas células após a 1ª filtração (Pcel (%) Eq. 5.6), conforme apresentado na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2.** Resultados de perdas de solvente nas etapas de filtração do processo de extração de P(3HB) (Pf (%) Eq. 5.5) e perdas de solvente que permanece nas células após a primeira filtração (Pcel (%) Eq. 5.6).

Etapas do processo	Perda de solvente (v/v) (%)
Pf	11 ± 0,75
Pcel	4 ± 0,75

De acordo com a Tabela 5.2 observa-se que as maiores porcentagens de perdas de solvente (11 %) ocorrem durante as etapas de filtração do processo de extração de P(3HB) e cerca de 4 % de solvente é perdido nos resíduos celulares na primeira filtração deste processo.

### 5.3.2 Recuperação e pureza de P(3HB) extraído com carbonato de propileno reutilizado

Sabe-se que a cada recuperação do solvente, após o processo de extração com carbonato de propileno, tem-se um solvente com maior concentração de componentes celulares solúveis remanescentes. Dessa

maneira, essas impurezas contidas no solvente recuperado poderiam influenciar na pureza do P(3HB) extraído com o solvente reutilizado, reduzindo a qualidade do produto final. A investigação do reuso de carbonato de propileno, após a extração de P(3HB) nos resultados de recuperação e pureza, é de grande importância para a avaliação da eficiência deste solvente depois de repetidas reutilizações. Os resultados das duplicatas da análise de recuperação de P(3HB), após cada extração com carbonato de propileno recuperado, estão apresentadas na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3.** Resultados de recuperação e pureza de P(3HB) nas extrações realizadas a cada recuperação do carbonato de propileno (11 vezes). Os dados correspondem a uma média de dois ensaios e os respectivos desvios médios.

Número de recuperações do CP	Recuperação de P(3HB) (%)	Pureza do P(3HB) (%)
0	74,3 ± 0,8	97,9 ± 1,0
1	75,8 ± 0,2	92,6 ± 3,0
2	77,1 ± 0,2	92,0 ± 0,4
3	76,5 ± 0,7	98,8 ± 0,2
4	74,9 ± 0,9	91,3 ± 1,4
5	75,1 ± 1,3	94,8 ± 2,1
6	74,2 ± 0,9	95,1 ± 2,9
7	75,0 ± 1,6	99,0 ± 0
8	73,0 ± 1,5	92,1 ± 0,3
9	73,7 ± 1,2	91,3 ± 0,1
10	73,6 ± 1,0	91,2 ± 0,1
11	77,0 ± 1,3	99,0 ± 0
Valor médio	75,0 ± 1,0	94,6 ± 2,8

Pode-se observar que o carbonato de propileno se mostrou eficiente para o processo de extração de P(3HB), mesmo após onze recuperações sucessivas. Os percentuais de recuperação de P(3HB), com carbonato de propileno recuperado a cada extração, mantiveram-se praticamente constantes e ficaram entre 73,0 e 77,0 % (valor médio de 75,0 %).

Os valores de pureza para os polímeros extraídos com carbonato de propileno, reciclado até 11 vezes, mantiveram-se entre 91,2 e 99,0 % (valor médio de 94,6 %). As diferenças observadas nas porcentagens de pureza dos polímeros extraídos com solvente reciclado se devem, provavelmente, a erros experimentais e não apresentam relação direta com o número de vezes que o solvente utilizado para a extração foi recuperado.

Com o objetivo de confirmar a pureza do polímero extraído (determinada em HPLC) com carbonato de propileno recuperado onze vezes foi realizada análise termogravimétrica das amostras de polímero extraídas com este solvente recuperado e com carbonato de propileno puro (curvas termogravimétricas apresentadas no Anexo IV). Os resultados de pureza obtidos para o polímero extraído com solvente puro e para o polímero extraído com solvente recuperado onze vezes foram de 97,4 e 97,2 %, respectivamente.

Esses resultados mostram a importância da utilização de carbonato de propileno na extração de P(3HB), pois, além de ser um solvente de baixa toxicidade, pode ser reutilizado no processo em até, pelo menos, onze vezes sem perder a eficiência na recuperação polimérica e sem influenciar na pureza dos polímeros extraídos. Os resultados obtidos nesse estudo são importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que foi explorada a reutilização de um solvente de baixa toxicidade para extração de um biopolímero a partir de fonte renovável de carbono, e ao final do processo foi possível a obtenção de um produto com elevada pureza. Essa última característica é importante, pois a pureza do bioproduto extraído é de grande relevância para o direcionamento e adequação deste polímero em futuras aplicações.

## 5.4 Considerações finais

Quando o carbonato de propileno, após a extração do P(3HB), foi submetido à recuperação obteve-se rendimento de 80 % de solvente, evidenciando que ocorrem perdas de solvente nas etapas do processo de extração com a necessidade de *make-up* de 20 % de solvente a cada nova extração. Sendo que dos 20 % de carbonato de propileno não recuperado, 5 % é referente à perda de solvente na evaporação da água, 11 % proveniente de perdas nas etapas de filtração e 4 % de perdas por aderência do solvente nos resíduos celulares.

A reutilização do carbonato de propileno no processo de extração de P(3HB) de *Cupriavidus necator* mostrou-se eficiente, após onze recuperações, confirmando a possibilidade de reciclo do carbonato de propileno na extração de P(3HB), sem redução na sua eficiência como solvente para recuperação de biopolímero com elevada pureza. Nesse sentido, os resultados obtidos nesse trabalho têm relevância tecnológica e podem contribuir para o avanço da utilização de carbonato de propileno na extração de P(3HB), visto que este solvente, mesmo apresentando elevado custo, pode facilmente ser recuperado após o processo de extração polimérica e reutilizado, neste mesmo processo, várias vezes sem influenciar nos resultados de pureza e recuperação do polímero extraído.

## CONCLUSÕES

O desenvolvimento de processos de extração de P(3HB) eficientes, em que os objetivos principais sejam reduzir as perdas de produto no processo, obter um produto de elevada pureza e com características físicas e térmicas preservadas, obter um produto que se enquadre no termo sustentável utilizando produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente, é muito importante para que o P(3HB) possa competir comercialmente com os plásticos de origem petroquímica. Baseado nas considerações de cada capítulo, as conclusões finais que podem ser destacadas desse trabalho são:

- Os resultados obtidos nesse estudo se mostram interessantes para o processo de extração de P(3HB), pois o tratamento mecânico de homogeneização à alta pressão da biomassa pode ser aplicado em escala industrial, o produto químico aplicado no processo é um solvente de baixa toxicidade e que pode ser reutilizado várias vezes. Ao final do processo de extração aqui proposto, é possível obter elevada porcentagem de produto recuperado com elevada pureza, em um tempo de processo reduzido, e com características térmicas e de massa molar próximas às dos polímeros comerciais, confirmando assim a qualidade do P(3HB) extraído de *C. necator*. Essas características são de grande importância, pois definem o direcionamento e adequação deste polímero para futuras aplicações.
- O carbonato de propileno é um solvente bastante viável para a extração de P(3HB) a partir de bactérias, principalmente quando é associado a métodos mecânicos, para rompimento celular, que facilitem a solubilização do polímero pelo solvente.
- O método de extração de P(3HB), de *Cupriavidus necator*, que combina homogeneização à alta pressão e carbonato de propileno se mostra eficaz nos resultados de pureza e

recuperação polimérica, sendo definido como o melhor método para a extração de P(3HB), quando comparado aos outros métodos testados neste trabalho. A aplicação em conjunto do tratamento sob alta pressão e carbonato de propileno nos resultados da extração proporcionou a redução do tempo de contato das células com solvente de 45 para 5 min. Essa redução é de grande importância no processo, pois proporciona economia de energia e de tempo de extração.

- Com as condições de homogeneização à alta pressão da biomassa, de 900 bar e 1 passagem, e recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno, a 150 °C durante 5 min, sem tempo de repouso e com tempo de agitação de 30 min, obteve-se as melhores condições de extração. Esta condição proporciona valores de porcentagem de recuperação de P(3HB) e pureza elevados em um menor tempo de contato células/solvente, frente às demais condições estudadas.
- A caracterização mostrou que o polímero extraído de *C. necator* com homogeneizador à alta pressão e solvente apresenta propriedades similares aos P(3HB) comerciais e aos reportados na literatura.
- A reutilização do carbonato de propileno no processo de extração de P(3HB) de *Cupriavidus necator* se mostrou eficiente. Os resultados confirmam a possibilidade de reciclo do carbonato de propileno na extração de P(3HB), sem redução na sua eficiência como solvente para recuperação de biopolímero com elevada pureza.

## REFERÊNCIAS

ABE, H., DOI, Y. Structural effect on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185-192, 1999.

AGUIAR, A. C. **Extração de lipídios de resíduos de filetagem de pescada-olhada (*Cynoscion striatus*) utilizando tecnologia supercrítica**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ALMEIDA, L. L. **Síntese e propriedade do copolímero anfílico poli(3-hidroxibutirato)-bloco-poli (óxido de etileno) e preparação de nanopartículas**. Dissertação de mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ALTHURI, A., MATHEW, J., SINDHU, R., BANERJEE, R., PANDEY, A., BINOD, P. Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 290–296, 2013.

ANDERSON, A. J., DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.

ANIS, S. N. S., NURHEZREEN, M. I., SUDESH, K., AMIRUL, A. A. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. **Separation and Purification Technology**, v. 102, p. 111–117, 2013.

APATI, G. P. **Síntese, caracterização e degradação de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, utilizando glicerol como substrato**. Tese de doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ARAGÃO, G. M. F., LINDLEY, N. D., URIBELLAREA, J. L., PAREILLEUX, A., Maintaining a controlled residual capacity increases the production of polyhydroxyalkanoates copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942, 1996.

ARIFFIN, H., NISHIDA, H., SHIRAI, Y., HASSAN, M. A. Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1433–1439, 2008.

ASENJO, J. A., SCHMIDT, A. S., ANDERSON, P. R., ANDREWS, B. A. Effect of single nutrient limitation on Poly- $\gamma$ -Hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 497-502, 1995.

BABU, R. P., CONNOR, K. O., SEERAM, R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Progress in Biomaterials**, v. 2, p. 1-16, 2013.

BAGHERIASL, S. **Development and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Selected Bacterial Species**. Tese de doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, UNIVERSITY OF BIRMINGHAM, Birmingham, Reino Unido, 2012.

BALAJI, S., GOPI, K., MUTHUVELAN, B. A review on production of poly  $\beta$  hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278–285, 2013.

BALDYGA, J., JASIŃSKA, M., DZIEGIELEWSKA, M., ŻOCHOWSKA, M. Disruption of yeast cells with ultrasound. **14th European Conference on MixingWarszawa**, 10-13 September, p. 25-30, 2012.

BALLARD, D. G. H., HOLMES, P. A., SENIOR, P. J. Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. In: Fontanille, M. and Guyot. A., (Eds), **Recent Advances in**

**Mechanistic and Synthetic Aspects of Polymerization**, v. 215, p. 293-314, 1987.

BASSAS, M., RODRÍGUEZ, E., LLORENS, J., MANRESA, A. Poly(3-hydroxyalkanoate) produced from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCBIM 40045): Effect of fatty acid nature as nutrient. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 225-226, 2006.

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Shawbury: Rapra Technology Limited, 2005.

BECERRA, M., BELMONTE, E. R., CERDAN, M. E., SISO, M. I. G. Extraction of intra cell proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 135-139, 2001.

BELTRAMI, L. V. R., SCIENZA, L. C.; ZATTERA, A. D. Efeito do Tratamento Alcalino de Fibras de Curauá sobre as Propriedades de Compósitos de Matriz Biodegradável. **Polímeros**, v. 24, p. 388-394, 2014.

BENGTSSON, S., PISCO, A. R., JOHANSSON, P., LEMOS, P. C., REIS, M. A. M. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 147, p. 172-179, 2010.

BHATTACHARYYA, A., PRAMANIK, A., MAJI S. K., HALDAR, S., MUKHOPADHYAY, U. K., MUKHERJEE, J. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **Applied and Industrial Microbiology Express**, v. 2, p. 34, 2012.

BHUBALAN, K., CHUAH, J. A., SHOZUI, F., BRIGHAM, C. J., TAGUCHI, S., SINSKEY, A. J., RHA, C., SUDESH, K. Characterization of the Highly Active Polyhydroxyalkanoate Synthase of *Chromobacterium* sp. Strain USM2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2926–2933, 2011.

BHUWAL, A. K., SINGH, G., AGGARWAL, N. K., GOYAL, V., YADAV, A. Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes. **International Journal of Biomaterials**, v. 2013, p. 10, 2013.

BIGELOW, T. A., NORTHAGEN, T., HILL, T. M., SAILER, F. C. The destruction of *Escherichia coli* biofilms using High-intensity focused ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 35, p.1026-1031, 2008.

BIOCYCLE, P(3HB) Industrial S/A. Disponível em <http://www.biocycle.com.br/site.htm>, acessado em junho de 2013.

BLAZEC, G. R. **Estudo da blenda poli(3-hidroxibutirato)/poli(etileno glicol)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Materiais, Universidade de São Paulo, 2012.

BORDES, P., POLLET, E., AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, 2009.

BOSSIO, J. P., HARRY, J., KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, p. 858-864, 2008.

BRADEL, R., REICHCRT, K.H. Modeling of molar mass distribution of poly(D(-)-3-hydroxybutyrate) during bacterial synthesis. **Makromolckulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics**, v. 194, p. 1983-1990, 1993.

BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of PHAs for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources:

physiological and engineering aspects, **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

BRITO, G.F., AGRAWAL, P., ARAÚJO, E. M., MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6.2, p. 127-139, 2011.

BUCCI, D. Z., TAVARES, L. B. B., SELL, I. Armazenamento de alimentos em embalagem de PHB. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 21, p. 19-22, 2004.

BUDDE, C. F., RIEDEL, S. L., WILLIS, L. B., RHA, C., SINSKEY, A. J. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) from Plant Oil by Engineered *Ralstonia eutropha* Strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, p. 2847–2854, 2011.

BYRON, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CAMARGO, F. A., INNOCENTINI-MEI, L. H., LEMES, A. P., MORAES, S. G., DURÁN, N. Processing and characterization of composites of poly(3-hydroxybutyrateco hydroxyvalerate) and lignin from sugar cane bagasse. **Journal of Composite Materials**, v. 46(4), p. 417-425, 2012. DOI: 10.1177/0021998311418389.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros**. 3. ed. São Paulo: ARTLIBER, p. 280, 2013.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: ARTLIBER, p. 444. 2007.

CARBAJAL, G. M. O. A., GARCÍA, A. B. Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. **ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar**, v. 48, p. 7 – 15, 2014.

CARLO, E. C.; BORGES, A. P. B.; POMPERMAYER, L. G.; MARTINEZ, M. M. M; ELEOTÉRIO, R. B.; NEHME, R. C.; MORATO, G. O. Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis

para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 135-140, 2009.

CARRILHO, E., TAVARES, M. C. H., LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica e cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, p. 509-515, 2001.

CASARIN, S. A., AGNELLI, J. A. M., MALMONGE, S. M., ROSÁRIO, F. Blendas PHB/Copoliésteres Biodegradáveis – Biodegradação em Solo. **Polímeros**, v. 23, p. 115-122, 2013.

CHAVES-LÓPEZ, C., LANCIOTTI, R., SERIO, A., PAPARELLA, A., GUERZONI, E., SUZZ, G. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. **Food Control**, v. 20, p. 691–695, 2009.

CHEMAT, F., ZILL-E-HUMA., KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2010.

CHEN, G. G. Q. Polyhydroxyalkanoates. In: Smith, R. **Biodegradable Polymers for Industrial Application**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005.

CHEN, G. Q., ZHANG, G., PARK, S. J., LEE, S. Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 50, 2001.

CHEN, Y., YANG, H., ZHOU, Q., CHEN, J., GU, G. Cleaner recovery of poly(3-hydroxy-butyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. **Process Biochem**, v. 36, p. 501–506, 2001.

CHIN, W. H.; TSUEY, K. C.; TAU, C. L. Efficient mechanical cell disruption of *Escherichia coli* by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen. **Department of Chemical and**

**Environmental Engineering, Faculty of Engineering**, Universiti Putra Malaysia, 2006.

CHISTI, Y., MOO-YOUNG, M. Disruption of Microbial Cells for Intracellular Products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 194-204, 1986.

CHOI, J. Y., LEE, J. K., YOU, Y., PARK, W. H. Epoxidized polybutadiene as a thermal stabilizer for poly(3-hydroxybutyrate). II. thermal Stabilization of poly(3-hydroxybutyrate) by epoxidized polybutadiene. **Fibers and Polymers**, v. 4, p. 195-198, 2003.

CHOI, J., LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 13 – 21, 1999.

CHUAN, C. W., NICHOLLS, S. J., TUZCU, E. M., CROWE, T., SIPAHI, I., SCHOENHAGEN, P., KAPADIA, S., HAZEN, S. L., WUN, C. C., NORTON, M., NTANIOS, F., NISSEN, S. E. Relationship Between Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerotic Disease Burden Measured by Intravascular Ultrasound. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, p. 1967-1975, 2005.

CIR. Final report on the assessment of propylene carbonate. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 6, p. 23-51, 1987.

CORNIBET, J., MARCHESSAULT, R. H. Physical properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: IV. Conformational analysis and crystalline structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 71, p. 735-56, 1972.

COSTA, C. M. **Avaliação da osteointegração do copolímero PHBV obtido de *Chromobacterium violaceum*, em falha óssea produzida no fêmur de ratos wistar**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

COSTA, M. M., QUEIROZ, P. R. M. Bioengenharia de tecido epitelial e cartilaginoso. **Ciências da Saúde**, v. 11, p. 107-119, 2013.

CROCHEMORE, A. G., VENDRUSCOLO, C. T., MATTOS, M. L. T., MOREIRA, A. S., PERALBA, M. C. R. Poli(3-hidroxibutirato) acumulado por *Pseudomonas* sp. CMM43 em fase de inoculo alterando condições de agitação e temperatura. **12° Congresso Brasileiro de Polímeros**, Florianópolis, 2013.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DIELS, A. M. J., TAEYE, J. D., MICHIELS, C. W. Sensitization of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 165-175, 2005.

DIVYA, G., ARCHANA, T., MANZANO, R. A. Polyhydroxy Alkanoates - A Sustainable Alternative to Petro-Based Plastics. **Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 1-8, 2013.

DIVYASHREE, M. S., SHAMALA, T. R., RASTOGI, N. K. Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 482–489, 2009. DOI: 10.1007/s12257-008-0119-z

DOAN, T. V., NGUYEN, B. T. Polyhydroxyalkanoates production by a bacterium isolated from mangrove soil samples collected from Quang Ninh province. **Journal of Vietnamese Environment**, v. 3, p. 76-79, 2012.

DOMINGOS, L. F., **Desenvolvimento de sistemas microestruturados a base de polihidroxialcanoatos para a liberação periodontal do naproxeno**. Dissertação de Mestrado em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DUARTE, M. A. T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxiobutirato) e de suas blendas com poli( $\beta$ -caprolactona)**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2004.

EL-HADI, A., SCHNABEL, R., STRAUBE, E., MÜLLER, G., HENNING, S. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) phas and their blends. **Polymer Testing**, v. 21, p. 665–674, 2002. DOI: 10.1016/S0142-9418(01)00142-8

EPA. Environmental profile for propylene carbonate, Cincinnati, OH: National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. **Environmental Protection Agency**, 1998.

FIGUEIREDO, T. V. B., CAMPOS, M. I., SOUSA, L. S., SILVA, J. R., DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de polihidroxiálcanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Química Nova**, v. XY, p.1-7, 2014.

FIGURESE, M. L., FREITAS, F., PAIS, J., RAMOS, A. M., ARAGÃO, G. M. F., REIS, M. A. M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 454–461, 2009.

FLOURY, J., LEGRAND, J., DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recalescence phenomena. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 1285-1294, 2004.

FORMOLO, M. C., VOGELSANGER J. R. N., SCHNEIDER, A. L., FURLAN, S. A., ARAGÃO, G. M. F., PEZZIN, S. H., PEZZIN, A. P. T. **Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica**. Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros. Anais. Belo Horizonte. Associação Brasileira de Polímeros, 2003.

FRUET, G. **Dissipação de energia em estruturas com utilização de polímeros termoplásticos**. Dissertação de mestrado em Engenharia Civil, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GALEGO, N., ROZSA C., SANCHEZ, R., FUNG, J., ANALA, V., SANTO, T. J. Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer testing**, v. 19, p. 485 – 492, 2000.

GARCIA, I. L., PEREZ, M. P. D., LÓPEZ, J. A., VILLAR, M. A., YANNIOTIS, S., KOUTINAS, A. Design and techno-economic evaluation of microbial biopolymer production from food industry wastes and agricultural crops. **International Congress on Engineering and Food**, Athens, Greece, 2011.

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

GARRIDO, F., BANERJEE, U. C., CHISTI, Y., MOO-YOUNG, M. Disruption of a Recombinant Yeast for the Release of  $\hat{\alpha}$ -Galactosidase. **Bioseparation**, v. 4, p. 319-328, 1994.

GECIOVA, J., BURY, D., JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541–553, 2002.

GERNGROSS, T. U., MARTIN, D. P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 6279-6283, 1995.

GHATNEKAR, M. S., PAI, J. S., GANESH, M., Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from sp V49. **Journal of Chemical**

**Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 444-448, 2002. DOI: 10.1002/jctb.570.

GOGATE, P. R., KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60–72, 2009.

GOMES, C. M. F. **Biodegradação de embalagem de PHB para armazenamento de agrotóxico**, Monografia de Ciências Biológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2008.

GOMES, J. G. C., BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por

bactérias. **Revista Brasileira de Eng. Química**, v.17, p. 24-29, 1997.

GORENFLO, V., SCHMACK, G., VOGEL, R., STEINBUCHER, A. Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 45–57, 2001.

GÖZKE, G., PRECHTL, C., KIRSCHHÖFER, F., MOTHE, G., ONDRUSCHKA, J., BRENNER-WEISS, G., OBST, U., POSTEN, C. Electrofiltration as a purification strategy for microbial poly-(3-hydroxybutyrate). **Bioresource Technology**, p. 272–278, 2012.

GRASSIE, N., MURRAY, E. J., HOLMES, P. a. The thermal degradation of poly(-(d)- $\beta$ -hydroxybutyric acid): part 2-changes in molecular weight. **Polymer Degradation and Stability**, v. 6, p. 95-103, 1984.

GRIGULL, V. H., SILVA, D. D., GARCIA, M. C. F., FURLAN, S. A., PEZZIN, A. P. T., SCHNEIDER, A. L. S., ARAGÃO, G. M. F. Production and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 223, 2008.

GRILLO, R., PEREIRA, A. S. P., MELO, N. F. S., PORTO, R. M., FEITOS, A. L. O., TONELLO, P. S., FILHO, N. L. D., ROSA, A. H., LIMA, L., FRACETO, L. F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1645–1651, 2011.

GUMEL, A. M., ANNUAR, M. S. M., CHISTI, Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, p. 580-605, 2012. DOI 10.1007/s10924-012-0527-1

HABLOT, E., BORDES, P., POLLET, E., AVEROUS, L. Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 413-421, 2008.

HAINES, P.J. **Thermal methods of analysis: principles, applications and problems**. London: Blackie Academic & Professional, p. 286, 1995.

HAHN, S. K., CHANG, Y. K., KIM, B. S., CHANG, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256–261, 1994. DOI: 10.1002/bit.260440215

HAHN, S. K., RYU, H. W., CHANG, Y. K. Comparison and optimization of P(3HB) recovery from *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. 51-55, 1997.

HAMPSON, J. W., ASHBY, R. D. Extraction of lipid-grown bacterial cells by supercritical fluid and organic solvent to obtain pure medium chain-length polyhydroxyalkanoates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 1371, 1999.

HARRISON S. T. L. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 217–240, 1991. DOI: 10.1016/0734-9750(91)90005-G

HARRISON, S. T. L., DENNIS, J. S., CHASE, H. A. Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria. **Bioseparation**, v. 2, p. 95–105, 1991.

HEINRICH, D., MADKOUR, M. H., AL-GHAMDI, M. A., SHABBAJ, I. I., STEINBÜCHEL, A. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium Hypochlorite. **Applied and Industrial Microbiology Express**, v. 2, p. 59, 2012.

HEJAZI, P., VASHEGHANI-FARAHANI, E., YAMINI, Y. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) Recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1519–1523, 2003.

HOLMES, P. A., LIM, G. B. Separation process. **U.S. Patent, n° 4.910.145**, 1990.

HONG, K., SUN, S., TIAN, W., CHEN, G. Q., HUANG, W. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkonates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 523–526, 1999.

HOROWITZ, D. M., BRENNAN, E. M. Methods for the separation and purification of biopolymers. **European Patents, n° 1(070):135**, 2010.

IBRAHIM, M. H. A., STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6222-6231, 2009.

IENCZAK, J. L., ARAGÃO, G. M. F. Biotechnologically Produced Biodegradable Polyesters. In **Handbook of Biodegradable Polymers:**

**Isolation, Synthesis, Characterization and Applications**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2011.

JACQUEL, N., LO, C. W., WEI, Y. H., WU, H. S., WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 15-37, 2008.

JAVERS, J. E., GIBBONS, W. R., HALAWEISH, F., RAYNIE, D. E. Isolation of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas resinovorans* by Ethanol-Modified Supercritical Fluid Extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 2, p. 241-251, 2012.

JAYAKAR, S. S., SINGHAL, R. S. Development of an Efficient Cell Disruption Method for Release of Lipoic Acid From *Saccharomyces cerevisiae*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 7, p. 90-99, 2012.

JIANG, X., RAMSAY, J. A., RAMSAY, B. A. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 212-219, 2006.

KABE, T., TSUGE, T., KASUYA, K., TAKEMURA, A., HIKIMA, T., TAKATA, M., IWATA, T. Physical and structural effects of adding ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] to wild type poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. **Macromolecules**, v. 45, p. 1858–1865, 2012.

KANJIRATHUMUTIL, C. T. **Novel Polyhydroxyalkanoate blends: their characterisation and possible applications**. Thesis submitted to the University of Westminster in candidature for the award of the degree of Master of Philosophy, University of Westminster, UK, 2012.

KAPRITCHKOFF, F. M., BONOMI, A., MIRANDA, E. A., PRADELLA, J. G. C., MAIORANO, A. E., ZUCCOLO, M., SCHMIDELL, W. Seleção de enzimas visando a lise da parede celular

de *Ralstonia eutropha*. In: XIII- SINAFERM - **Simpósio Nacional de Fermentações**, 2000.

KAPRITCHKOFF, F. M., VIOTTI, A. P., ALLI, R. C. P., ZUCCOLO, M., PRADELLA, J. G. C., MAIORANO, A. E., MIRANDA, E. A., BONOMI, A. Recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 453–462, 2006. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.009

KARR, D. B., WATERS, J. K., EMERICH, D. W. Analysis of Poly-,3-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1339-1344, 1983.

KAWAGUCHI, Y., DOI, Y. Kinetic and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. **Macromolecules**, v. 25, p. 2324-2329, 1992.

KELLY, W. J., MUSKE, K. R. Optimal operation of high pressure homogenization for intracellular product recovery. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 25–37, 2004. DOI: 10.1007/s00449-004-0378-9

KESHAVARZ-MOORE, E., HOARE, M., DUNNILL, P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 764–770, 1990.

KESSLER, F. **Fotofuncionalização superficial de polímeros: indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade**. Tese doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

KHANNA, S., SRIVASTA, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: a comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p.197-203, 2005.

KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2004.

KHOSRAVI, D. K., VASHEGHANI, F. E., SHOJAOSADATI, S. A., YAMINI, Y. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology Progress**, v. 20, p.1757-1765, 2004.

KIM, B. S., LEE, S. C., CHANG, H. N., CHANG, Y. K., WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 892–898, 1994.

KING, A. T., DAVEY, M. R., MELLOR, I. R., MULLIGAN, B. J., LOWE, K. C. Surfactant effects on yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 48–153, 1991.

KIVELÄ, R., PITKÄNEN, L., LAINE, P., ASEYEV, V., SONTAG-STROHM, T. Influence of homogenisation on the solution properties of oat glucan. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 611-618, 2010.

KLIMEK-OCHAB, M., BRZEZIŃSKA-RODAK, M., ŻYMAŃCZYK-DUDA, E., LEJCZAK, B., KAFARSKI, P. Comparative study of fungal cell disruption—scope and limitations of the methods. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 469–475, 2011.

KOLLER, M. Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation. **Applied Food Biotechnology**, v. 1, p. 3-15, 2014

KRANZ, R. G., GABBERT, K. K., LOCKE, T. A., MADIGAN, M. T. Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, mutants, expression, and physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3003-3009, 1997.

KSHIRSAGAR, P. R., KULKARNI, S. O., NILEGAONKAR, S. S., NIVEDITHA, M., KANEKAR, P. P. Kinetics and model building for

recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Halomonas campisalis*. **Separation and Purification Technology**, v. 103, p. 151, 2013.

KUBOI, R., UMAKOSHI, H., TAKAGI, N., KOMASAWA, I. Optimal disruption methods for the selective recovery of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 79, p. 335–341, 1995.

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

LAFFERTY, R. M., HEINSLE, E. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-( $\beta$ -hydroxybutyric acid). **U.S Patent n° 4,140,741**, 1979.

LAGOUEYTE, N., PAQUIN, P. Effects of microfluidization on the functional properties of xantan gum. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 365-371, 1998.

LANCIOTTI, R., PATRIGNANI, F., IUCCI, L., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., BELLETTI, N., GARDINI, F. Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. **Food Chemistry**, v. 104, p. 693-701, 2007.

LANHAM, A. B., RICARDO, A. R., ALBUQUERQUEA, M. G. E., PARDELHA, F., CARVALHEIRA, M., COMA, M., FRADINHO, J., CARVALHO, G., OEHMEN, A., REIS, M. A. M. Determination of the extraction kinetics for the quantification of polyhydroxyalkanoate monomers in mixed microbial systems. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1626-1634, 2013.

LATHA, D., SANDYA, SHAHINA, REKHA. Biopolymer Production Using *Pseudomonas Sp.* (MTCC) and its Application in Agriculture. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, p. 293-303, 2013.

LEE, J., JUNG, S. G., PARK, C. S., KIM, H. Y., BATT, C. A., KIM, Y. R. "Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer," **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2941–2944, 2011.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996.

LEE, S. Y., CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 52, p. 28-57. 1995.

LEE, S.Y., CHOI, J. I., HAN, K., SONG, J.Y. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2762, 1999.

LEMES, A. C., ÁLVARES, G. T., KALIL, S. J. Extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 7-13, 2012. DOI 10.5433/2316-5200.2012v1n2p7

LEMOIGNE M. Products of dehydration and polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. **Bulletin of the Canadian Biochemical Society**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LIAO, Q., NODA, I., FRANK, C. W. Melt viscoelasticity of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers. **Polymer**, v. 50, p. 6139, 2009.

LING, Y., WONG, H. H., THOMAS, C. J., WILLIAMS, D. R. G., MIDDELBERG, A. P. J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, p. 9–15, 1997.

LO, C. W., WU, H. S., WEI, Y. H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1

blue. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 240–246, 2011. DOI:10.1016/j.jtice.2010.08.001

LÓPEZ-CUELLAR, M., ALBA-FLORES, J., RODRÍGUEZ, J., PÉREZ-GUEVARA, F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 74–80, 2011. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016).

LOURENÇO, A. T. C. **Efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina**. Dissertação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**, E-papers: Rio de Janeiro, 2001.

MACHADO, M. L. C., PEREIRA, N. C., MIRANDA, L. F., TERENCE, M. C., PRADELLA, J. G. C. Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 65-71. 2010.

MADISON, L. L., HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MADKOUR, M. H., HEINRICH, D., ALGHAMDI, M. A., SHABBAJ, I. I., STEINBÜCHEL, A. PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**, p. 1-35, 2013 DOI: 10.1021/bm4010244

MAITI, P., BATT, C. A., GIANNELIS, E. P. New Biodegradable Polyhydroxybutyrate /Layered Silicate Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3393-3400, 2007.

MANANGAN, T., SHAWAPHUN, S. Quantitative extraction and determination of polyhydroxyalkanoate accumulated in *Alcaligenes*

*latus* dry cells. **Science Asia**. v. 36, p.199–203, 2010. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.199.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Polímeros**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

MANTELLATO, P. E. **Desenvolvimento de tecnologia para extração e recuperação de polihidroxicanoatos obtidos a partir de sacarose de cana de açúcar**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

MANTELLATO, P. E., DURÃO, N. A. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass. **US Patent n° 8357508 B2**, 2013.

MANTELLATO, P. E., DURÃO, N. A. S. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass. **U.S Patent n° 20080193987 A1**, 2008.

MARESCA, P., DONS, F., FERRARI, G. Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 364-372, 2011.

MARJADI, D., DHARAIYA, N. Recovery and characterization of poly(3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, p 319-329, 2014.

MARTÍNEZ, V., GARCÍA, P., GARCÍA, J. L., PRIETO, M. A. Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbial Biotechnology**, v. 4, p.533–547, 2011.

MARTINO, L. L., CRUZ, M. V., SCOMAC, A., FREITAS, F., BERTINC, L., SCANDOLA, M., REIS, M. A. M. Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 117-123, 2014.

MASAEI, E., MORSHED, M., RASEKHIAN, P., KARBASI, S., KARBALAIE, K., KARAMALI, F., ABEDI, D., RAZAVI, S., JAFARIAN-DEHKORDI, A., NASR-ESFAHANI, M. H., BAHARVAND, H. Does the tissue engineering architecture of poly(3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell–material interactions. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 100, p. 1907-1918, 2012.

MASSON, L. M. P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada submetida ao processamento térmico e/ou à homogeneização à ultra-alta pressão**. Tese de doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

MATKO, E., TONKA, K., IVKA, K. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 313-318, 2005.

McCHALICHER, C. W. J., SRIENC, F., ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p. 1616-1625, 2009.

MEDEIROS, F. O., ALVES, F. G., LISBOA, C. R., MARTINS, D. S., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. Ultrasonic waves and glass pearls: a new method of extraction of -galactosidase for use in laboratory. **Quimica Nova**, v. 31, p. 336-339, 2008.

MICHELON, M., BORBA, T. M., RAFAEL, R. S., BURKERT, C. A. V., BURKERT, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. **Food Science Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of micro-organismos. **Biotechnology Advances**, v.13, p. 491– 551, 1995.

MODI, S., KOELLING, K., VODOVOTZ, Y. Assessment of PHB with varying hydroxyvalerate content for potential packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 179-186, 2011.

MOHAMMAD, M., HASSAN, M. A., PHANG, L. Y., SHIRAI, Y., MAN, H. C., ARIFFIN, H., AMIRUL, A. A., SYAIRAH, S. N. Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH. **Environmental Engineering Science**, v. 29, 2012.

MOHAMMAD. H. A., STEINBÜCHEL, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6222-6231, 2009.

MONTORO, S. R., SHIGUE, C. Y., SORDI, M. L. T., SANTOS, A. M., RÉ, M. L. Estudo cinético de redução de massa molar do Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV). **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 19 – 24, 2010.

MOUSAVIOUN, P., GEORGE G. A., DOHERTY, W. O. S. Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 1114-1122, 2012.

NARASIMHAN, K., CEARLEY, A. C., GIBSON, M. S., WELLING, S. J. Process for the solvent-based extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass. **U.S. Patent n° 7378266**, USA, 2008.

NAVARRO, R. F., D'ALMEIDA, J. R. M., RABELLO, M. S. Elastic properties of degraded polypropylene. **American Journal of Materials Science and Technology**. v. 42, p. 2167, 2007.

NEVES, A., MÜLLER, J. Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*. **Biotechnology Progress**, v. 28, p. 1575, 2012.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181.** Dissertação de mestrado em Tecnologia de Fermentações, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2006.

NODA, I. Solvent extraction of polyhydroxy-alkanoates from biomass facilitated by the use of marginal nonsolvent. **US patent 5,821,299**, 1998.

PACHEKOSKI, W. V., DALMOLIN, C., AGNELLI, J. A. M. The Influence of the Industrial Processing on the Degradation of Poly(hidroxybutyrate) – PHB. **Materials Research**. v. 16, p. 327-332, 2013.

PARLANE, N. A., GRAGE, K., MIFUNE, J., RANDALL, J., BASARABA, D., WEDLOCK, D. N. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 37–44, 2012.

PAULA, E. L., CAMPOS, T. F., MANO, V. Glicólise do poli(3-hidroxi-butirato) por via enzimática. **Química Nova**, v. 37, p. 487-491, 2014.

PEÑA, C., CASTILLO, T., GARCÍA, A., MILLÁN, M., SEGURA, D. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 278–293, 2014.

PENG, Y. U., LO, C. C. W., WU, H. S. The isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1-BLUE using the digestion method. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, p. 77-83, 2013.

PENLOGLOU, G., CHATZIDOUKAS, C., KIPARISSIDES, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made

properties: An integrated modelling approach and experimental validation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.329-337, 2012.

PENLOGLOU, G., KRETZA, E., CHATZIDOUKAS, C., PAROUTI, S., KIPARISSIDES, C. On the control of molecular weight distribution of polyhydroxybutyrate in *Azohydromonas lata* cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 39-47, 2012.

PENLOGLOU, G., ROUSSOS, A., CHATZIDOUKAS, C., KIPARISSIDES, C. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). **New Biotechnology**, v. 27, p. 358-367, 2010.

PHILIP, S., KESHAVARZ, T., ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 233-247, 2007.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, março de 2006. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/pdf/\\_2/tr06\\_biopolimeros.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/_2/tr06_biopolimeros.pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2013.

PRASANNA, T., BABU, P. A., LAKSHMI, P. D., CHAKRAPANI, R., RAO, R. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) by *Bacillus species* isolated from Soil. **Journal of Pharma Research & Reviews**, v. 1, p. 15-18, 2011.

PRIYADARSHI, A. S., BORSE, B. B. Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. **International Journal of Biomedical And Advance Research**, p. 68-76, 2014.

QUENTAL, A. C., CARVALHO, F. P., TADA, E. S., FELISBERTI, M. I. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v XY, p. 1-9, 2010.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno.**

Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

QUINES, L. K. M., IENCZAK, J. L., SCHMIDT, M., ZANFONATO, K., RODRIGUES, M. I., SCHMIDELL, W., ARAGÃO, G. M. F. Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. **Química Nova**, v. 38, p. 214-220, 2015.

RAMIER, J., BOUDERLIQUE, T., STOILOVA, O., MANOLOVA, N., RASHKOV, I., LANGLOIS, V., RENARD, E., ALBANESE, P., GRANDE, D. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 38, p. 161-169, 2014.

RAMSAY, B. A.; **Proceedings of The Symposium on Physiology, Kinetics, Production and Use of Biopolymers**, Seggau, Austria, 1994.

RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVARIE, C., RAMSAY, B. A. Extraction of poli-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 589-594, 1994.

REDDY, C. S. K., GHAI, R., KALIA, V. C. “Polyhydroxyalkanoates: an overview”, **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REIS, E. C. C., BORGES, A. P. B., OLIVEIRA, P. M., BICALHO, S. M. C. M., REIS, A. M., SILVA, C. L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxapatita para regeneração periodontal. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, p. 73-79, 2012.

RIEDEL, S. L., BRIGHAM, C. J., BUDDE, C. F., BADER, J., RHA, C., STAHL, U., SINSKEY, A. J. Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, p. 461-470, 2012.

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxiubutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

RODRIGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M., DIAS, M. M. S., CALAFELL, M., BRAUNEGG, G., MARQUÉS-CALVO, M. S. Novel Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate]-Producing Bacterium Isolated from a Bolivian Hypersaline Lake. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, p. 123–130, 2013.

ROH, K.S., YEOM, S. H., YOO, Y. J. The effects of sodium bisulfite in extraction of PHB by hypochlorite. **Biotechnology Techniques**, v. 9, p. 709–712, 1995.

ROSSEL, C. E. V., MANTELATTO, P. E., BUENO NETTO, C. L., RIBEIRO, A. M. M., MATSUBARA, R. M. S. Processo de extração de biopolímeros. **Patente PI 9302312**, 2002.

SALMIATI, Z.U., SALIM, M. R. Characterization of Agricultural Wastewater and Biomass in a Sequencing Batch Reactor (SBR) Using Respirometric Analysis. **8<sup>th</sup> International IWA Symposium Waste Management Problems in Agro-Industries**. Çeşme, Izmir, Turkey, p. 22-24, 2011.

SAMROT, A., AVINESH, R., SUKEETHA, S., SENTHILKUMAR, P. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 195–203, 2011. Doi:10.1007/s12010-010-9028-7

SÁNCHEZ, R. J., SCHRIPSEMA, J., SILVA, L. F., , M. K., PRADELLA, G. C., GOMEZ, G. C. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **European Polymer Journal**, v. 39, p.1385-1394, 2003.

SARANYA, S., RADHA, K. V. Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Bacillus Subtilis* MTCC 9763. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers: Biomedical Applications**. V. 29, p 152-164, 2014.

SAWER, T., ROBINSON, C. W., GLICK, B. R. F. Disruption of native and recombinant *E. coli* in high pressure homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1330–1342, 1989.

SCHNEIDER, A. L. S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxitirato – P(3HB) de *Ralstonia eutropha* e blendas de P(3HB)/PCL (poli-caprolactona)**. Florianópolis. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SHRIVASTAV, A., KIM, H. Y., KIM, Y. R.; Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2013.

SILVA, L. F., GOMEZ, J. G .C., ROCHA, R. C. S., TACIRO, M. K., PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SILVA-VALENZUELA, M. G., WANG, S. H., WIEBECK, H., VALENZUELA-DÍAZ, F. R. Nanocomposite Microcapsules from Powders of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Smectite Clays. **Materials Science Forum**, v. 660, p. 794-798, 2010.

SIM, S. J., SNELL, K. D., HOGAN, S. A., STUBBE, J., RHA, C., SINSKEY, A. J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.

SIMIONI, S., RUFFIEUX, C., KLEEBERG, J., BRUGGIMANN, L., ANNONI, J. M. Preserved decision making ability in early multiple

sclerosis. **Journal Neurology**, v. 255, p. 1762–1769. 2008. Doi:[10.1007/s00415-008-0025-5](https://doi.org/10.1007/s00415-008-0025-5).

SOUZA, D. **Estudo da estabilidade térmica de acetato propionato de celulose modificado com polihidroxialcanoatos de cadeia curta**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

SQUIO, C. R., ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butilato) e poli(3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615, 2004.

SPIER, V. C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolímeros biodegradáveis**. Joinville. Dissertação de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2005.

STEINBUCHER, A.; HUSTEDEL, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular-basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 217-230. 1992.

STRUIK, L. C. E. Mechanical behaviour and physical ageing of semi-crystalline polymers: 3. Prediction of long term creep from short time tests. **Polymer**, v. 30, p. 815, 1989.

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

SUDESH, K., FUKUI, T., TAGUCHI, K., IWATA, T., DOI, Y. Improved production of poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 79-85, 1999.

SUZUKI, D. V., CARTER, J. M., RODRIGUES, M. F. A., SILVA, E. S., MAIORANO, A. E. Purification of polyhydroxybutyrate produced

by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 771-775, 2008.

TAIDI, B., MANSFIELD, D. A., ANDERSON, A. J. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) ( PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, p. 201-206, 1995.

TAMER, I. M., MOO-YOUNG, M., CHIST, Y. Optimization of poly(beta-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments. **Bioprocess Engineering**, v .19, p. 459-468, 1998b.

TAMER, I. M., MOO-YOUNG, M., CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly("-hydroxybutyricacid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 37, p. 1807–1814, 1998a. DOI: 10.1021/ie9707432

TAN, G. Y. A., CHEN, C. L., LI, L., GE, L., WANG, L., RAZAAD, I. M. N., LI, Y., ZHAO, L., MO, Y., WANG, J. Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. **Polymers**, v. 6, p. 706-754; 2014.

TANAMOOL, V., IMAI, V. T., DANVIRUTAI, P., KAEWKANNETRA, P. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga sp.* Isolated from soil environment during batch fermentation. **Journal of Life Sciences**, vol. 5, p. 1003–1012, 2011.

TEKIN, E., ATEŞ, M., KAHRAMAN, O. Poly-3-hydroxybutyrate-producing extreme halophilic archaeon: *Haloferax sp.* MA10 isolated from Çamaltı Saltern, İzmir. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 303-312, 2012.

TELLES, M. R., SARAN, L. M., UNÊDA-TREVISOLLI, S. H. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da

cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 2, p. 52-63, 2011.

THEODOROU, E. C., THEODOROU, M. C., KYRIAKIDIS, D. A. AtoSC two-component system is involved in cPHB biosynthesis through fatty acid metabolism in *E. coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, p. 561-568, 2011.

TIAN, J., SINSKEY, A. J., STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Bacteriology**, p. 3814-3824, 2005.

TORRES, A. U., ALMEIDA, J. R., HABAS, J. P. Avaliação do Efeito de um Óleo Parafínico sobre o Comportamento Físico-Químico de Tubulações de Polietileno de Alta Densidade. **Polímeros**, v. 20, p. 331, 2011.

TOSTA, L. M. **Comportamento eletrocromático de filmes de azul da Prússia em carbonato de propileno**. Dissertação de mestrado em físico-química, instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TRIBST, A. A. L., FRANCHI, M. A., CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 265-271, 2008.

TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94. n.6, p. 579-584, 2002.

TSUJI, H., IKADA, Y. Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies os solution-cast blens from poly(DL-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). **Journal of Applied Polymer Science**. 60: 2367-2375, 1996.

VALAPPIL, S.P., MISRA, S.K., BOCCACCINI, A. R., KESHAVARZ, T., BUCKE, C., ROYA, I. J. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 251-258, 2007.

VAN HEE, P., MIDDELBERG, A. P. J., VAN DER, L. R. G. J. M., VAN DER, W. L. A. M. Relation Between Cell Disruption Conditions, Cell Debris Particle Size, and Inclusion Body Release. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, p. 100, 2004.

VANDAMME, P., COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285-2289, 2004.

VANLAUTEM, N., GILAIN, J. Poly-beta-hydroxy-butyrate extraction from a biomass using chloroethane(s) and/or chloropropane(s) as solvent, giving higher yield without depolymerisation. **Patente U.S 4310684-A**, 1982.

VASCONCELOS, Y. **Plástico de açúcar**. Pesquisa FAPESP, 2002.

VERLINDEN, A. R. J., HILL, D. J., KENWARD, M. A., WILLIAMS, C. D., PIOTROWSKA-SEGET, Z., RADECKA, I. K. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. **AMB Express**, v. 1, p. 1-8, 2011.

VILLAY, A., DE FILIPPIS, F. L., PICTON, L., LE CERF, D., VIAL, C., MICHAUD, P. Comparison of polysaccharide degradations by dynamic high-pressure homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 278-286, 2012.

VOGELSANGER, N., FORMOLO, M. C., PEZZIN, A. P. T., SCHNEIDER, A. L. S., FURLAN, S. A., BERNARDO, H. P., PEZZIN, S. H., PIRES, A. T. N., DUEK, E. A. R., Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato)/poli( $\epsilon$ -caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, p. 359, 2002.

WAMPFLER, B., RAMSAUER, T., REZZONICO, S., HISCHIER, R., KÖHLING, R., THÖNY-MEYER, L., ZINN, M. Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 2716–2723, 2010. DOI: 10.1021/bm1007663

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 1985.

WRÓBEL, M., ZEBROWSKI, J., SZOPA, J. Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 41–54, 2004.

XIN, J., ZHANG, Y., DONG, J., SONG, H., XIA, C. An experimental study on molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) accumulated in *Methylosinustrichosporium* IMV 3011. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 7078-7087, 2011.

XU, J., GUO, B. H., YANG, R., WU, Q., CHEN, G. Q., ZHANG, Z. M. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. **Polymer**, v. 43, p. 6893, 2002.

YANG, Y. H., BRIGHAM, C., WILLIS, L., RHA, C. K., SINSKEY, A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). **Biotechnology Letters**, p. 1–6, 2011.

YASOTHA, K., AROUA, M. K., RAMACHANDRAN, K. B., TAN, I. K. P. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 260-268, 2006. Doi:10.1016/j.bej.2006.05.008

YEZZA, A., FOURNIER D., HALASZ A., HAWARI J. Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 73, p. 211-218, 2006.

YU, J. Recovery and purification of polyhydroxyalkanoates, **U.S Patent n°0220505 A1**, 2008.

YU, J., PORTER, M., JAREMKO, M. Generation and Utilization of Microbial Biomass Hydrolysates in Recovery and Production of Poly(3-hydroxybutyrate). **Intech**, p. 33-48, 2013.

ZAHARI, M. A. K. M., ARIFFIN, H., MOKHTAR, M. N., SALIHON, J., SHIRAI, Y., HASSAN, M. A. Factors Affecting Poly(3-hydroxybutyrate) Production from Oil Palm Frond Juice by *Cupriavidus necator* (CCUG52238T). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

ZHOU, J., PENG, S. W., WANG, Y. Y., ZHENG, S. B., WANG, Y., CHEN, G. Q. The use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tarsal repair in eyelid reconstruction in the rat. **Biomaterials**, v. 31(29), p. 7512–7518, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.044

ZINN, M., WEILENMANN, H. U., HANY, R., SCHMID, M., EGLI, T. Tailored synthesis of poly([R]-3-hydroxybutyrateco- 3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428. **Acta Biotechnologica**, v. 23, p. 309–316, 2003. DOI: 10.1002/abio.200390039

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

ZURICH, E. **Medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoates): from biosynthesis towards medical applications**. A dissertation submitted to ETH ZURICH for the degree of Doctor of Sciences, 2008.



**ANEXOS**

**ANEXO I:** CROMATOGRAMAS DAS DETERMINAÇÕES DE MASSA MOLAR DO CAPÍTULO 2.

**ANEXO II:** CROMATOGRAMAS DAS DETERMINAÇÕES DE MASSA MOLAR DO CAPÍTULO 3.

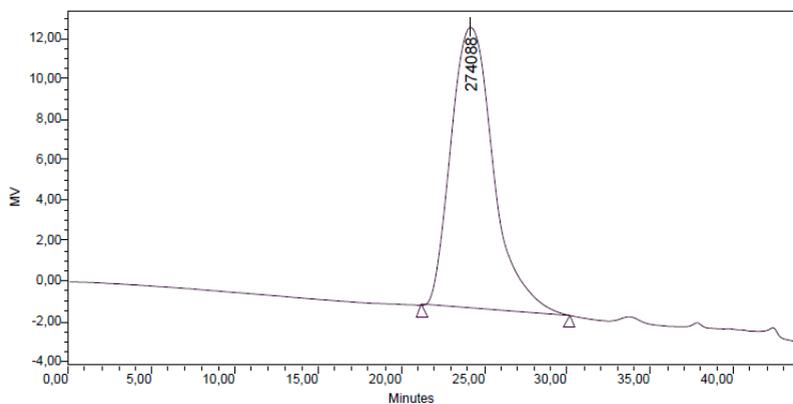
**ANEXO III:** CROMATOGRAMAS DAS DETERMINAÇÕES DE MASSA MOLAR POR GPC DO CAPÍTULO 4.

**ANEXO IV:** CURVAS OBTIDAS NA ANÁLISE DE TGA DO CAPÍTULO 5.



## ANEXO I

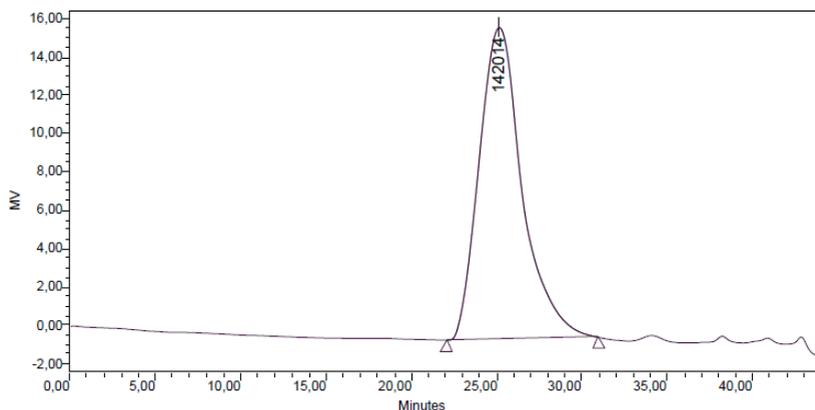
**Figura A.1.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					161843	334652	274088	588614	891844	2,067754

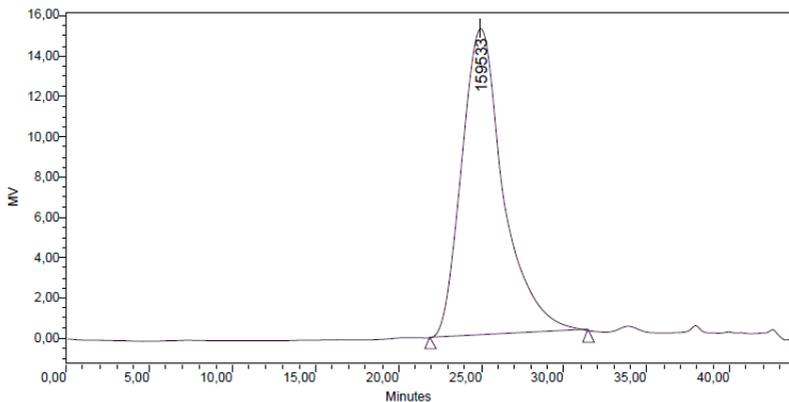
**Figura A.2.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 3 passagens, e carbonato de propileno.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					92856	168364	142014	273082	395904	1,813174

**Figura A.3.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1200 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno.

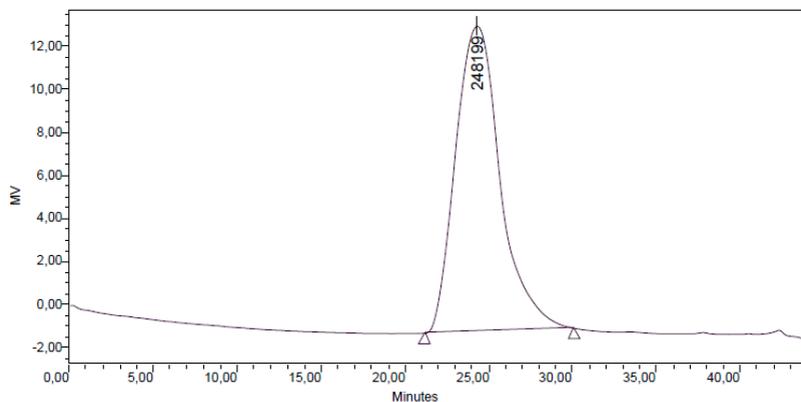


**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					94345	185188	159533	311183	465425	1,962882

## ANEXO II

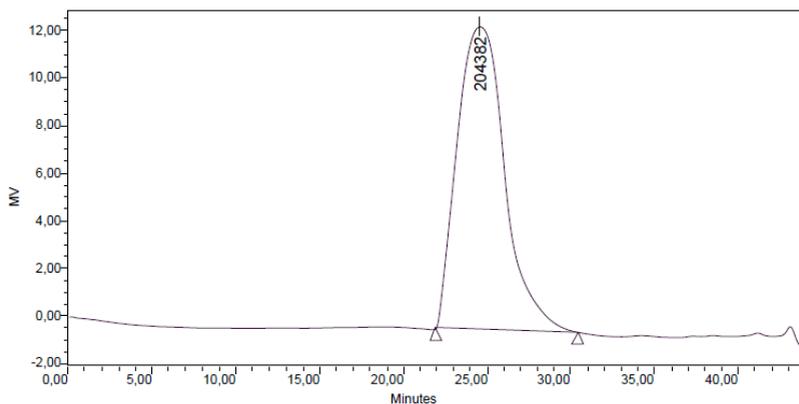
**Figura B.1.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 5 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

	Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1						153675	329276	248199	608427	950137	2,142669

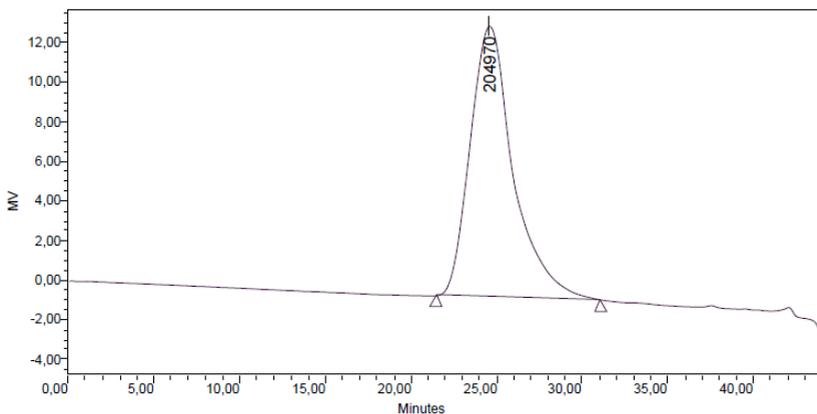
**Figura B.2.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 15 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					132284	268822	204382	467108	672892	2,032158

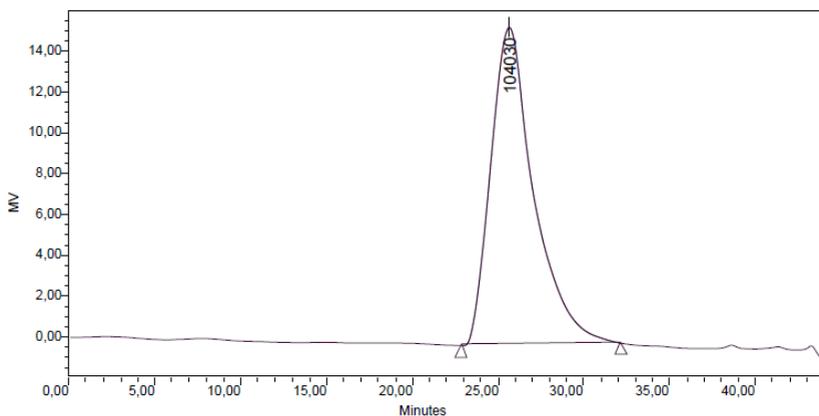
**Figura B.3.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 30 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

	Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1						116475	241969	204970	425974	662051	2,077436

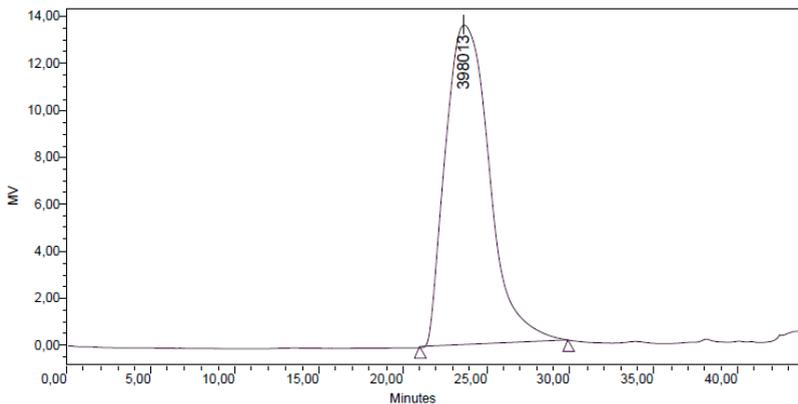
**Figura B.4.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com o método controle (biomassa sem tratamento) a 150 °C por 45 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					62817	109388	104030	165195	223918	1,741373

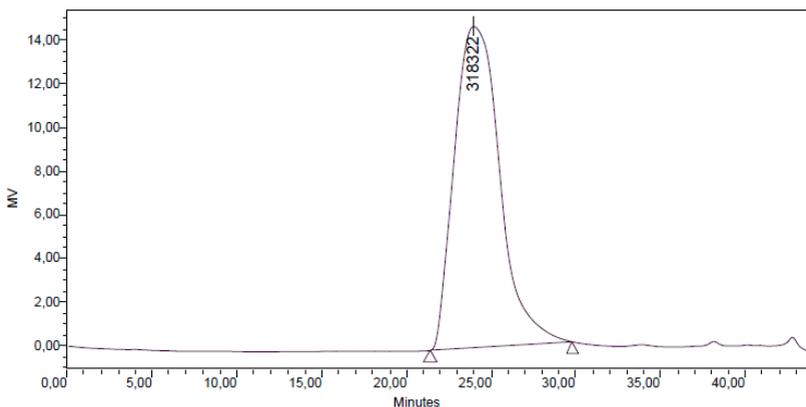
**Figura B.5.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 5 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					209291	452978	398013	786412	1129449	2,164350

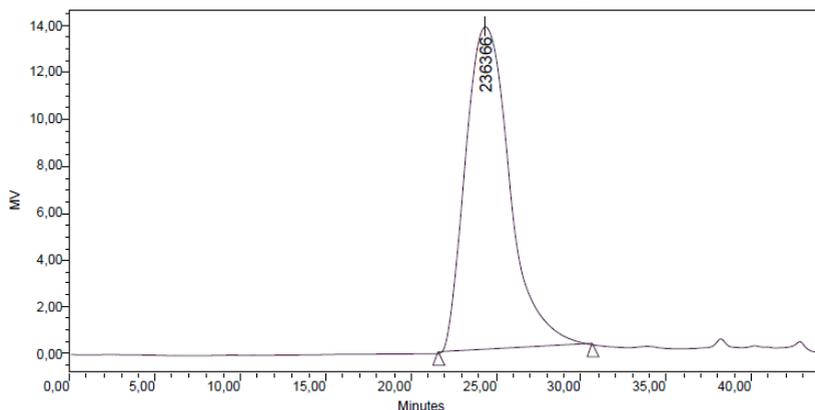
**Figura B.6.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 15 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

	Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1						177543	364274	318322	630630	915982	2,051751

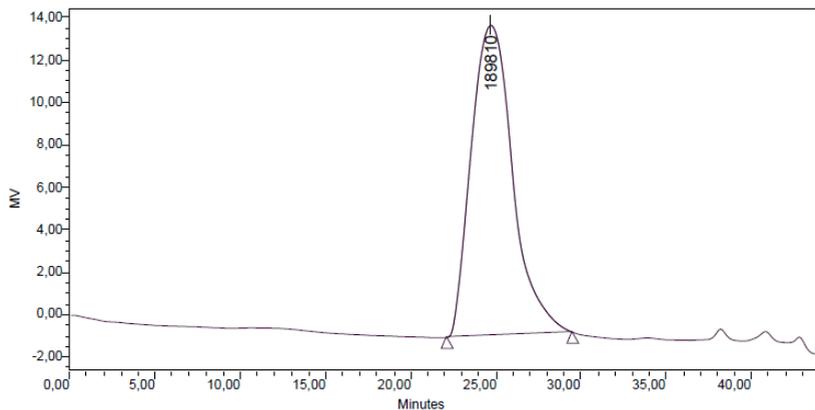
**Figura B.7.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 30 min.



**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

	Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1						136117	278225	236366	473059	688855	2,044003

**Figura B.8.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 1300 bar e 2 passagens, e carbonato de propileno a 150 °C por 45 min.

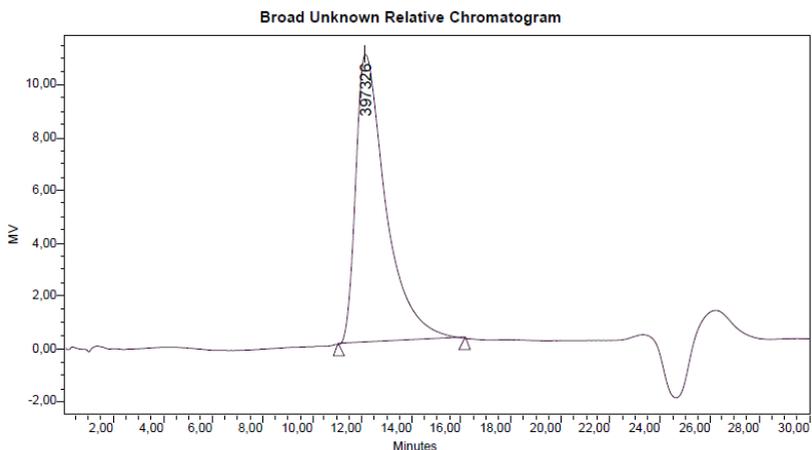


**Broad Unknown Modified Universal Peak Table**

Distribution Name	Mv (Daltons)	K (dl/g)	alpha	Intrinsic Viscosity (dl/g)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1					130706	225189	189810	349072	481024	1,722872

## ANEXO III

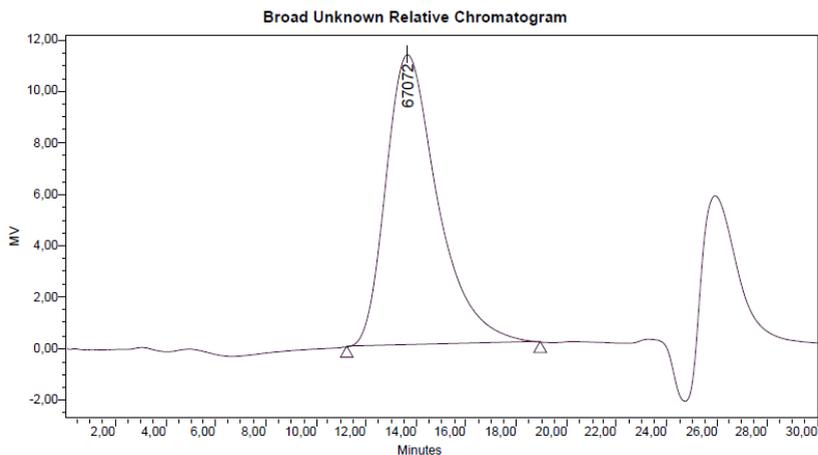
**Figura C.1.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com homogeneizador à alta pressão, 900 bar e 1 passagem, e carbonato de propileno a 150 °C por 5 min.



**Broad Unknown Relative Peak Table**

Distribution Name	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1	158045	333580	397326	537895	746608	2,110671	1,612491	2,238169

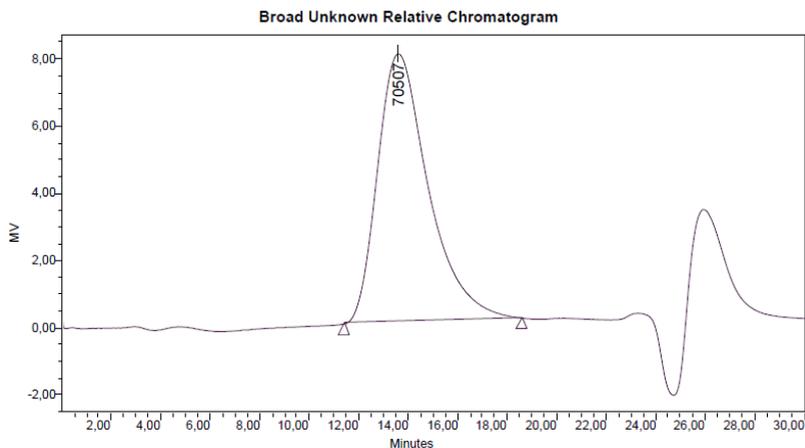
**Figura C.2.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 12 h e 12 h, respectivamente.



**Broad Unknown Relative Peak Table**

Distribution Name	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1	37050	80660	67072	174951	352782	2,177070	2,169006	4,373707

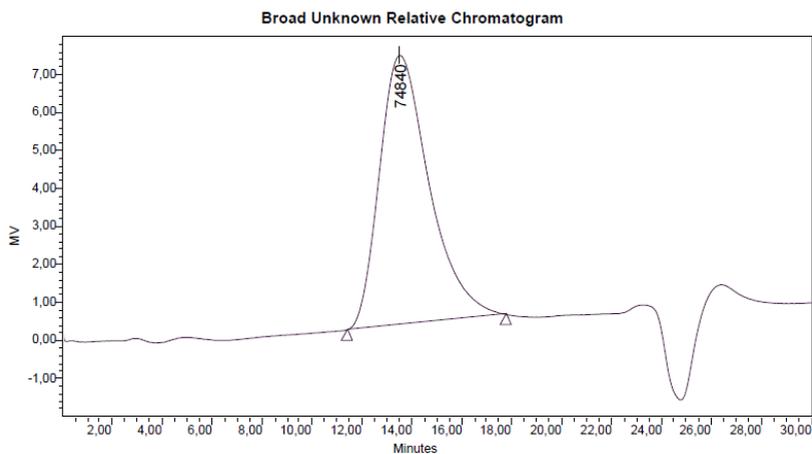
**Figura C.3.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 0 h e 12 h, respectivamente.



**Broad Unknown Relative Peak Table**

	Distribution Name	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity	Mz/Mw	Mz-1/Mw
1		38966	82045	70507	166899	302189	2,105525	2,034241	3,683220

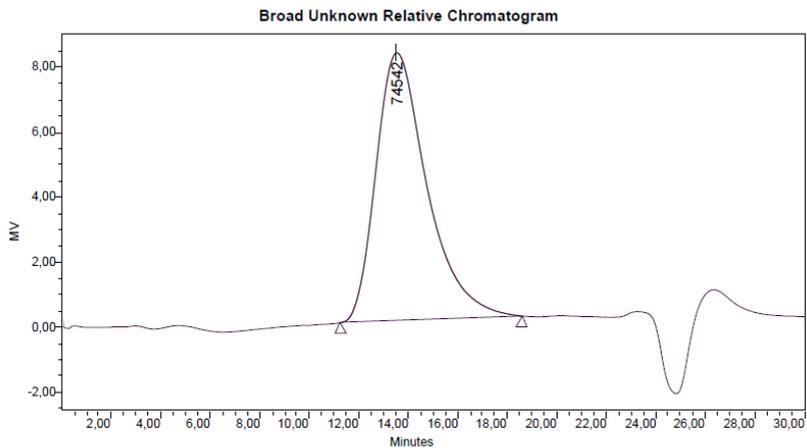
**Figura C.4.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso (Tr) e agitação de 0,5 h e 0,5 h, respectivamente.



**Broad Unknown Relative Peak Table**

Distribution Name	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1	44081	88820	74840	177814	315832	2,014922	2,001959	3,555864

**Figura C.5.** Cromatograma obtido pela análise de GPC para determinação da massa molar do polímero extraído com carbonato de propileno (controle) a 150 °C por 45 min e tempos de repouso ( $T_r$ ) e agitação de 0 h e 0,5 h, respectivamente.

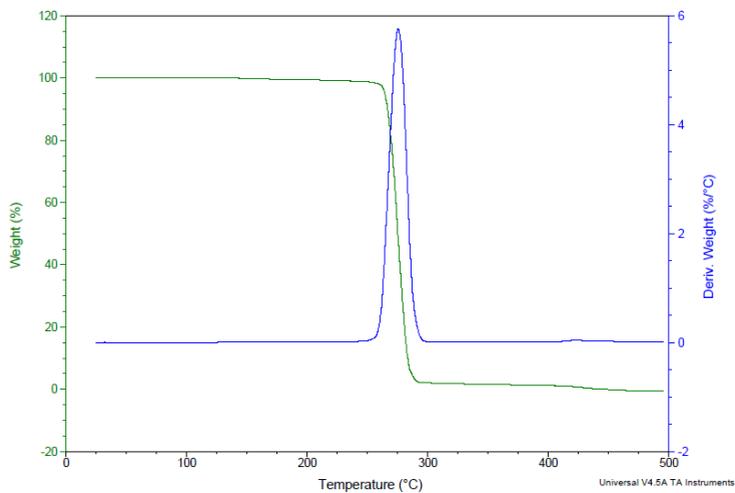


**Broad Unknown Relative Peak Table**

Distribution Name	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1	40533	88827	74542	191909	371212	2,191474	2,160485	4,179058

## ANEXO IV

**Figura D.1.** Curvas de TGA da amostra de P(3HB) extraída com carbonato de propileno (não reutilizado) puro.



**Figura D.2.** Curvas de TGA da amostra de P(3HB) extraída com carbonato de propileno reutilizado 11 vezes.

