

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 DSM 545 COM 1,2-CARBONATO
DE PROPILENO**

Florianópolis,
Maio de 2010

LUCI KELIN DE MENEZES QUINES

**EXTRAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO
POR Cupriavidus necator DSM 545 COM 1,2-CARBONATO
DE PROPILENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia M. F. Aragão
Co-orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell

**Florianópolis,
Maio de 2010**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.

Dedicatória

Grupo PHB: Gláucia, Willibaldo, Jaciane, Mélodi, Andrea, Márcia, Jorge, Camila e Murilo, vocês são os grandes responsáveis por este trabalho. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelo companheirismo, pela amizade, pela paciência e pelo carinho. Divido com vocês agora a vitória da finalização deste trabalho.

Mãe e Pai,
Isto foi possível por vocês acreditarem em mim e estarem sempre presentes na minha vida, embora estando tão distantes. Desculpa pelos momentos que não passamos juntos. Obrigada pela compreensão e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora, Doutora Gláucia Maria Falcão de Aragão, pela paciência, pela disponibilidade e generosidade, assim como pelas críticas, correções e idéias estimulantes. Você tem todo o meu respeito e admiração. Obrigada.

Ao Professor Doutor Willibaldo Schmidell, meu co-orientador, que muito admiro. Obrigada pelos ensinamentos e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Maria Isabel Rodrigues pela ajuda no planejamento experimental que contribuiu para enriquecer o trabalho.

À Jaciane que me ensinou com prazer e dedicação muito do que sei, sempre apostando e confiando no meu trabalho. Obrigada pela ajuda constante, deixo aqui registrado todo o meu agradecimento, admiração, amizade e carinho.

À Mélodi, pela amizade, companheirismo e carinho. Obrigada por estar sempre perto e me ajudar nos momentos mais difíceis deste trabalho, sem medir esforços.

Ao Fabio, meu amor e companheiro. Obrigada pela compreensão, apoio e por todo o carinho acreditando sempre em mim e me dando forças para chegar até aqui.

À minha querida irmã e meu cunhado, por fazerem parte da minha vida, sempre me incentivando. Obrigada por todo o carinho, amizade e acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos, amores da minha vida. Obrigada pelo amor sincero e inocente e por simplesmente existirem fazendo a minha vida muito mais feliz.

Aos meus avós, por todo o amor e incentivo.

À Barbara, pela companhia em algumas noites de trabalho, pelo incentivo, apoio e carinho.

À Marta e a Patrícia, pelas conversas, risadas, apoio e carinho. À Marta, ainda, por ter o abraço mais aconchegante tendo o dom de me acalmar.

À Morgana e a Susane, pelas longas conversas e risadas. Tenho muito carinho por vocês.

Às colegas pelo carinho e amizade: Beatriz, Letícia, Andréia, Francieli e Ana Paula.

Aos colegas do Engebio, por todo o respeito, compreensão, ajuda e incentivo.

À CAPES por ter financiado esta pesquisa.

Aos membros da banca Prof. Agenor, Prof^a. Regina e Prof^a Mônica, por aceitarem avaliar este trabalho contribuindo com suas sugestões.

*“Não desanimes
Persiste mais um tanto.
Não cultives o pessimismo.
Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios
erros.
Avança ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente.
Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o
coração
Não te impressiones à dificuldade.
Não desistas da paciência.
Não creias em realização sem esforço.
Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.
Se te enganaste em algum trecho do caminho,
reajusta a própria visão e procura o rumo certo.
Não contes vantagens nem fracassos.
Estuda buscando aprender.
Não se voltes contra ninguém.
Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que
Deus te confiou.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que
possas realizar.
E assim vencerás. ”*

Francisco Candido Xavier

RESUMO

Os Poli-hidroxicanoatos são biopolímeros estocados como fonte e reserva de energia intracelularmente em micro-organismos e, por serem biodegradáveis e biocompatíveis, são potenciais substitutos dos plásticos petroquímicos. O Poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) é o polímero mais estudado dentre os PHAs. Porém, o custo de produção e extração torna este polímero pouco competitivo comercialmente. Logo, é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e extração de P(3HB) com custo e impacto ambiental reduzidos. Este trabalho teve como objetivo estabelecer condições favoráveis à extração de P(3HB) utilizando 1,2-carbonato de propileno, solvente de baixa toxicidade, considerando a porcentagem de pureza e recuperação do biopolímero. A utilização deste solvente leva à diminuição do impacto ambiental causado por diferentes métodos de extração propostos na literatura para a recuperação do biopolímero. A produção de células contendo P(3HB) foi realizada através de cultivos de *Cupriavidus necator* DSM 545 em batelada alimentada, em biorreator. Estudou-se, a necessidade ou não de se fazer um pré-tratamento da biomassa antes da extração. Um delineamento experimental Plackett & Burman de doze ensaios mais três pontos centrais foi utilizado para selecionar as variáveis mais significativas na extração de P(3HB) por 1,2-carbonato de propileno. Foram realizados dois testes de recuperação do solvente 1,2-carbonato de propileno, após a extração, sendo um com aplicação de aquecimento e o outro com aquecimento e vácuo. Os resultados mostraram que o pré-tratamento térmico levou a uma maior porcentagem de recuperação e de pureza do polímero. A recuperação (95 %) e a pureza (84 %) mais elevada foram obtidas com a combinação de temperatura de extração de 150 °C, tempo de contato de 45 min. e relação biomassa/solvente de 11,5/75 g/mL, associado a um tempo de precipitação de 24 h. A concentração de P(3HB) em relação ao solvente mostrou interferir diretamente na porcentagem de recuperação do polímero. E por fim, o solvente 1,2-carbonato de propileno, utilizado na extração, foi recuperado em 80 % sob aquecimento a 90 °C e vácuo. O processo utilizando 1,2-carbonato de propileno mostrou-se eficiente para extração de P(3HB).

Palavras-chave: 1,2-carbonato de propileno; *Cupriavidus necator*; recuperação; poli(3-hidroxi-butirato); extração.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolymers stored as intracellular energy source in microorganisms and, by being biodegradable and biocompatible, they are potential substitutes of petrochemical-based plastics. Poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) is the most extensively polymer studied among PHAs. However, the costs of production and extraction turn this polymer commercially low competitive. Therefore, new synthesis processes and extraction of P(3HB) with low costs and reduced environmental impacts are needed. This work aimed to establish favorable conditions to extract P(3HB) using propylene carbonate, solvent of low toxicity, considering the percent purity and recovery of the biopolymer. The use of this solvent leads to a decrease of the environmental impact caused by different extraction methods proposed in the literature for the recovery of the biopolymer. The production of cells containing P(3HB) was performed using cultivations of *Cupriavidus necator* DSM 545 in fed batch, using a bioreactor. The need of a pretreatment of biomass before the extraction was studied. An experimental Plackett & Burman Design of 12 tests + 3 center points was used to select the most significant variables in the extraction of P(3HB) using 1,2-propylene carbonate. Two tests of recovery of 1,2-propylene carbonate after the extraction were assessed, being one of them heating application and the other heating and vacuum. The results showed that the thermal pretreatment led to a higher percent recovery and purity of the polymer. The highest recovery (95 %) and purity (84 %) were obtained with the combination of extraction temperature of 150 °C, contact time of 45 min. and ratio biomass/solvent of 11,5/75 g/mL, associated to precipitation time of 24 h. The concentration of P(3HB) in relation to the solvent seemed to interfere directly in the percent recovery of the polymer. Finally, the solvent propylene carbonate used in the extraction was recovered (80 %) in the heating temperature of 90 °C under vacuum. Therefore, the 1,2-propylene carbonate has proved efficient as solvent in the extraction of P(3HB).

Keywords: 1,2-propylene carbonate; *Cupriavidus necator*; recovery; poly-3-hydroxybutyrate, extraction.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1.1 Polímeros e o impacto ambiental	31
1.2 Poli-hidroxicanoatos - (PHAs).....	33
1.2.1 Poli(3-hidroxiacetato) – P(3HA).....	35
1.2.2 Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) – P(3HA-co-3HA)	36
1.3 Micro-organismos produtores de poli-hidroxicanoatos	37
1.3.1 <i>Cupriavidus necator</i>	37
1.4 Métodos de extração	38
1.4.1 Extração com solventes	38
1.4.2 Métodos de digestão	41
1.4.2.1 Digestão por surfactantes.....	41
1.4.2.2 Digestão com hipoclorito de sódio (NaOCl).....	42
1.4.2.3 Digestão com hipoclorito de sódio e clorofórmio	43
1.4.2.4 Digestão com surfactante e quelante	43
1.4.2.5 Digestão enzimática	44
1.4.3 Extração com rompimento mecânico	45
1.4.4 Extração supercrítica.....	46
1.4.5 Vantagens e desvantagens dos métodos de extração de PHAs.....	46
1.5 Propriedades do P(3HA)	47
1.6 Aplicações dos biopolímeros.....	50
1.7 Biodegradabilidade.....	54
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Produção de poli-hidroxicanoatos	57
2.1.1 Micro-organismo e meio de Cultivo	57
2.1.2 Fonte de carbono	57
2.1.3 Condições de cultivo	57
2.1.4 Determinações analíticas	58
2.1.4.1 Concentração de biomassa.....	58

2.1.4.2 Concentração de açúcar.....	59
2.1.4.3 Nitrogênio residual.....	59
2.1.4.4 Determinação do P(3HB).....	59
2.1.5 Tratamento de dados.....	60
2.2 Extração e purificação.....	60
2.2.1 Extração de P(3HB) usando clorofórmio.....	60
2.2.2 Extração de P(3HB) a partir de 1,2-carbonato de propileno.....	61
2.3 Estudos preliminares.....	64
2.3.1 Efeito do tempo de contato e da temperatura de aquecimento do solvente na extração de P(3HB).....	64
2.3.2 Estudo de diferentes pré-tratamentos para a biomassa celular ao final do cultivo.....	65
2.4 Determinação de pureza e recuperação de P(3HB).....	66
2.5 Recuperação do 1,2-carbonato de propileno.....	67

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 69

3.1 Síntese e extração de P(3HB) por <i>C. necator</i>	69
3.1.1 Cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> em biorreator visando a produção de P(3HB).....	69
3.1.2 Estudos preliminares.....	71
3.1.2.1 Efeito do tempo de contato e da temperatura de aquecimento do solvente na extração de P(3HB).....	71
3.1.2.2 Escolha do pré-tratamento aplicado à biomassa celular.....	73
3.1.3 Seleção das variáveis significativas no método de extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno.....	77
3.1.4 Extração de P(3HB) a partir de <i>C. necator</i> com 1,2-carbonato de propileno nas melhores condições obtidas no delineamento experimental PB e comparação com o método que utiliza clorofórmio como solvente.....	83
3.1.5 Influência da concentração de P(3HB) em relação ao volume de solvente nos resultados de extração.....	85
3.1.6 Recuperação do 1,2-carbonato de propileno.....	88

CONCLUSÕES..... 91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 93

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1 Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxialcanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica) (SILVA et al., 2007).</i>	33
<i>Figura 1.2 Fórmula química geral dos PHA. O valor de n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para n=1, os PHAs são classificados como PHAscl (“short chain length”), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R = (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl (“medium chain length”) (SILVA et al., 2007).</i>	34
<i>Figura 1.3 Imagens microscópicas de elétrons de transmissão (TEM) de C. necator na produção de P(3HB) a 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o “desaparecimento” dos elementos de mediação escuro-manchados dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final dos grânulos de P(3HB) após 24 h é de 0,5 µm (TIAN et al., 2005).</i>	38
<i>Figura 1.4 Fórmula estrutural do 1,2-carbonato de propileno.</i>	40
<i>Figura 1.5 Aplicações para o P(3HB).</i>	54
<i>Figura 1.6 Degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) Biopol[®] em lodo ativado (MADISON e HUISMAN, 1999).</i>	55
<i>Figura 1.7 Ciclo de biodegradação do P(3HB) (http://www.biocycle.com.br).</i>	56
<i>Figura 2.1 Biorreator Bioflo 110 utilizados nos experimentos.</i>	58
<i>Figura 2.2 Fluxograma do processo de extração com 1,2-carbonato de propileno.</i>	61
<i>Figura 2.3 Equipamento (rotaevaporador) utilizado para os testes com o solvente 1,2-carbonato de propileno para a extração de P(3HB).</i>	62
<i>Figura 2.4 Filtrado contendo 1,2-carbonato de propileno + P(3HB).</i>	62
<i>Figura 2.5 Fluxograma dos pré-tratamentos da biomassa.</i>	66
<i>Figura 3.1 Evolução da biomassa total X_t (■), biomassa residual X_R (linha), poli(3-hidroxi-<i>butirato</i>) P(3HB) (▲), nitrogênio (N) (◆) e substrato (S) (●) durante o cultivo. A linha pontilhada representa o momento da limitação de nitrogênio e as linhas contínuas representam o ajuste pelo software Lissage.</i>	70
<i>Figura 3.2 Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130°C/30 min., valores expressos em porcentagem de recuperação de P(3HB) de P(3HB). Onde: P – procedimento padrão, T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.</i>	74

<i>Figura 3.3 Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130 °C/30 min., valores expressos em porcentagem de pureza do polímero recuperado. Onde: P – procedimento padrão, T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 3.4 P(3HB) e resíduos celulares aderidos à parede do balão volumétrico, após o processo de extração com 1,2-carbonato de propileno, utilizando-se células úmidas.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 3.5 Comparação visual da quantidade de P(3HB) obtida entre os diferentes pré-tratamentos aplicados à biomassa celular, após a extração com 1,2-carbonato de propileno de células secas. Onde: T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 3.6 Porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza do P(3HB) obtido por extração com clorofórmio e com 1,2-carbonato de propileno, nas temperaturas de 140 e 150 °C.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 3.7 Porcentagem de rendimento e pureza do P(3HB) obtidas na extração com 1,2-carbonato de propileno, em diferentes concentrações de P(3HB) em relação ao solvente (328 e 54 g.L⁻¹) e tempos de contato (15 e 45 min.), à temperatura de 150 °C.</i>	<i>88</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.1 Dados físico-químicos do 1,2-carbonato de propileno.</i>	40
<i>Tabela 1.2 Comparação dos métodos de extração de poli-hidroxicanoatos.</i>	47
<i>Tabela 1.3 Comparação entre as características do P(3HB) e do PP.</i>	50
<i>Tabela 1.4 Potencial de substituição dos polímeros convencionais pelos bioplásticos (PRO-Bip 2004).</i>	53
<i>Tabela 2.1 Delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios + 3 pontos centrais para o estudo da extração do P(3HB) usando 1,2-carbonato de propileno.</i>	63
<i>Tabela 2.2 Níveis das variáveis utilizadas no delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios (PB12) e triplicata do ponto central para o estudo da extração do P(3HB).</i>	64
<i>Tabela 3.1 Resultados de porcentagem de pureza e de recuperação do polímero nos diferentes tempos de contato e temperaturas do solvente.</i>	71
<i>Tabela 3.2 Delineamento experimental (PB) para estudo da influência de cinco variáveis testadas na porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação de P(3HB) produzido por C. necator.</i>	78
<i>Tabela 3.3 Delineamento experimental (PB) para estudo da influência de cinco variáveis testadas nas porcentagens de pureza e recuperação de P(3HB) produzido por C. necator.</i>	79
<i>Tabela 3.4 Resultados dos efeitos das variáveis estudadas no delineamento PB 12 com triplicata do ponto central sobre a porcentagem de pureza do P(3HB) extraído com 1,2-carbonato de propileno.</i>	81
<i>Tabela 3.5 Resultados dos efeitos das variáveis estudadas no delineamento PB 12 com triplicata do ponto central sobre a porcentagem de recuperação do P(3HB) extraído com 1,2-carbonato de propileno.</i>	81
<i>Tabela 3.6 Propriedades da solução polimérica (polímero+solvente+resíduos celulares).</i>	86
<i>Tabela 3.7 Resultados de recuperação do 1,2-carbonato de propileno.</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS

MM	Meio mineral
HV	hidroxivalerato
3HV	3-hidroxivalerato
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
P(3HB-co-HV)	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-valerato)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PHAs	Poli-hidroxicarboxilatos
PHAscl	Polímeros de cadeia curta
PHAmcl	Polímeros de cadeia média
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Poli(cloreto de vinila)
PE	Polietileno
Xr	Biomassa residual (g.L^{-1})
Xt	Biomassa Total (g.L^{-1})
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em célula (g.g^{-1})
$Y_{X/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em célula (g.g^{-1})
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão
PB	Plackett & Burman
$m_{P(3HB)}$	Massa de P(3HB) detectada por cromatografia (g)
$m_{pó}$	Massa total de biopolímero utilizada para a análise cromatográfica (g)
m_p	Massa de P(3HB) puro após o processo de extração
m_i	Massa total de células utilizadas para a extração
$P_{P(3HB)}$	Porcentagem de polímero obtida durante o cultivo
R_S	Recuperação do solvente

INTRODUÇÃO

Os polímeros destacam-se como a segunda maior demanda dentre os derivados do petróleo, sendo desnecessário salientar os enormes problemas ambientais e de logística que as alternativas atuais de incineração, aterramento e reciclagem têm causado às sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento (SILVA et al., 2007). Em resposta a estes problemas, destacam-se os poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) que são poliésteres biológicos e biodegradáveis.

Os PHAs são polímeros acumulados como material de reserva de carbono e energia por vários micro-organismos, geralmente sob condições de limitação de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, e na presença de excesso de fonte de carbono (LEE et al., 1999). Muitos são os micro-organismos produtores de PHAs e a espécie *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial. Seu emprego difundido deve-se à sua habilidade de acumular grandes quantidades de polímero, a partir de fontes simples de carbono, como ácido acético, frutose e glicose entre outros (RAMSAY, 1994; KIM et al., 1994; MADISON e HUISMAN, 1999).

Dentre os poli-hidroxicarboxilatos (PHAs), o poli(3-hidroxi-butanato) (P(3HB)) é o biopolímero mais estudado, apresentando, além de sua biodegradabilidade, propriedades termoplásticas e mecânicas próximas às do polipropileno (LEE et al., 1996; MADISON e HUISMAN, 1999; RAMSAY, 1994).

Apesar da grande possibilidade de aplicações dos poli-hidroxicarboxilatos (área médica, farmacêutica, alimentícia e na indústria química) (Khanna e Srivastava, 2005), os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado, em virtude de seu alto custo em relação aos plásticos petroquímicos. Portanto, estudos que possam diminuir o custo total destes biopolímeros são necessários. Estima-se que o impacto do custo de recuperação de PHA no custo total do processo de produção possa equivaler a 50 % do valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHA acumulado na biomassa (SILVA et al., 2007). São necessárias técnicas de extração de P(3HB) que possam diminuir a quantidade de solventes utilizados e tornar o processo mais simples e menos poluente, reduzindo os custos de recuperação de P(3HB) (DALCANTON, 2006).

O processo de extração envolve a ruptura das células e a subsequente separação do polímero, a partir de material celular não-P(3HB) (BRAUNEGG et al., 1998). Para melhorar o rompimento celular, pode ser utilizada uma etapa de pré-tratamento da biomassa antes da extração. Estes pré-tratamentos podem ser térmico, alcalino, ácido/alcalino e com sal (FIORESE et al., 2009; KAPRITCHKOFF et al., 2000; TAMER et al., 1998; DONG e SUN, 2000). Os métodos mais utilizados no processo de extração de P(3HB) são: extração por solventes orgânicos, tais como clorofórmio (FORMOLO et al., 2005; DALCANTON, 2006; KESSLER e WITHOLT, 2001), 1,2-carbonato de propileno (LAFFERTY e HEINZLE, 1979; FIORESE et al., 2009); e dicloroetano (VANLAUTEM e GILAIN, 1982); digestão enzimática (HOLMES e LIM, 1990; SUZUKI et al., 2008; NEVES, 2009; KAPRITCHOFF et al., 2006); métodos mecânicos (TAMER et al., 1998; GARCIA, 2006;) e o uso de soluções aquosas de surfactante e quelantes (CHEN et al., 1999). A aplicação destes processos, em sua maioria, resulta em polímeros com boas propriedades. Porém, o grande volume de solventes resultantes da extração, causa impacto ambiental.

Os processos de extração e purificação de biopolímeros, que utilizam solventes halogenados, são agressivos ao meio ambiente e à saúde humana. Com isso, a extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno foi, primeiramente, proposta por Lafferty e Heinzle (1979) como alternativa aos solventes clorados. O 1,2-carbonato de propileno é um solvente polar e com baixa toxicidade, sendo sua principal vantagem o alto ponto de ebulição, em torno de 240 °C, o que proporciona uma baixa taxa de evaporação, podendo assim, ser reutilizado inúmeras vezes em futuras extrações.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar as melhores condições de extração, considerando-se porcentagem de pureza e recuperação de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno a partir da cultura de *C. necator* DSM 545, propondo um método alternativo ao método proposto por Fiorese (2008).

E como objetivos específicos:

- Produzir células com P(3HB) a partir de *C. necator* DSM 545 em biorreator utilizando como substrato glicose/frutose;
- Realizar testes preliminares sobre o efeito do tempo de contato e da temperatura do solvente na extração de P(3HB).

-
- Testar a necessidade de pré-tratamento da biomassa para facilitar o processo de extração;
 - Selecionar as variáveis mais significativas na extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno, utilizando um delineamento experimental Plackett & Burman (PB);
 - Comparar os resultados de extração P(3HB) a partir de *C. necator* com 1,2-carbonato de propileno nas melhores condições obtidas no delineamento experimental PB e com o método que utiliza clorofórmio como solvente.
 - Avaliar a influência da concentração de P(3HB) em relação ao volume de solvente utilizado na extração nas porcentagens de pureza e recuperação do polímero;
 - Recuperar o 1,2-carbonato de propileno após o processo de extração de P(3HB), visando sua reutilização do solvente.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Polímeros e o impacto ambiental

O uso de materiais poliméricos vem crescendo na sociedade. O aumento substancial do uso de polímeros de origem petroquímica em diversas aplicações nas últimas décadas é pauta de diversas discussões atuais, pois estes polímeros são descartados muito rapidamente, gerando um forte impacto ambiental (VOGELSAGER et al., 2004). No entanto, os plásticos convencionais, tais como o polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno (PE) e poli(cloreto de vinila) (PVC) apresentam velocidades baixas de degradação, o que pode levar a sérios problemas relativos ao desequilíbrio ambiental como, por exemplo, as quantidades crescentes de resíduos plásticos que se acumulam na natureza. Estes polímeros podem levar mais de uma centena de anos para se decompor, pondo em risco as relações presentes nos ecossistemas terrestres e marítimos (CHIELLINI e SOLARO, 1996; VOGELSAGER et al., 2004).

Cerca de 140 milhões de toneladas de plásticos derivados do petróleo são produzidas anualmente em todo mundo, significando um forte impacto ambiental (SHIMAO, 2001).

Nos Estados Unidos são despejadas mais de 160 milhões de toneladas anuais de lixo sólido no meio ambiente. Dessa massa total, 7 % correspondem a plásticos. Cada habitante norte-americano descarta 70 kg de lixo plástico por ano. Já na Europa, são 38 kg anuais. Segundo o Manual do Gerenciamento Integrado (IPT/CEMPRE), são produzidas diariamente no Brasil cerca de 241 mil toneladas de lixo, das quais 90 mil são de origem domiciliar. A média nacional de produção de resíduos por habitante estaria em torno de 600 g/dia. Uma cidade como São Paulo, no entanto, produz em média 1 kg/habitante.dia (<http://www.reciclaveis.com.br/noticias/00904/0090428eletronico.htm>).

Essa montanha de sacos, caixas, garrafas, latas, entre outros, contribui para a superlotação dos aterros sanitários e lixões, além de provocar a poluição de ruas e rios (BUCCI, 2003).

A presença do polímero de origem petroquímica nesses aterros representa um grave problema, pois, são extremamente estáveis, podendo permanecer intactos por longo tempo. Esta condição leva à formação de uma camada impermeabilizante, comprometendo a circulação de gases e líquidos, dificultando a degradação de outros materiais constituintes do lixo e retardando a estabilização das áreas dos aterros (GOMES e BUENO NETTO, 1997; KARNIOL, 2002).

Problemas adicionais foram descritos na reportagem da revista *Veja*, edição 2071 publicada em 30 de julho de 2008. Cerca de 70 % dos sacos plásticos, latas, garrafas e pneus são depositados no fundo do mar e o restante navega pela superfície. Esses lixões são devastadores para a vida marinha. Peixes e pássaros engolem pedaços de plástico e de metal acarretando na mortandade dos mesmos (Revista *Veja*, edição 2071 publicada em 30 de julho de 2008).

Estima-se que o lixo acumulado nos mares seja o responsável direto pela morte de 1 milhão de aves e mamíferos marinhos por ano. Quase todo esse lixo, chega aos oceanos levado pelas águas dos rios ou é arrastado pela maré das praias. São despejadas 675 toneladas de resíduos sólidos por hora no mar e 70 % desse total é constituído de objetos feitos de plástico (Revista *Veja*, edição 2071 publicada em 30 de julho de 2008).

A reciclagem e incineração são métodos utilizados para a solução desse problema ambiental. Entretanto, esses procedimentos não são suficientes para processar a grande quantidade de polímeros descartáveis, observando-se ainda que as propriedades finais dos polímeros reciclados são inferiores. A incineração, quando controlada, é uma alternativa já praticada em muitos países. No entanto, provoca uma poluição ambiental secundária, devido à produção de gases tóxicos (KIM, 2000). Um exemplo é a incineração do PVC, que libera ácido clorídrico (KRUPP e JEWELL, 1992).

A reciclagem e a conscientização nunca serão suficientes para deter essa poluição que alcança níveis alarmantes. A solução está na fabricação em larga escala de materiais produzidos com plásticos biodegradáveis e leis que proíbam ou restrinjam a fabricação de plásticos de origem petroquímica (www.sobiologia.com.br).

Recentemente, muitos esforços visando preservar o ecossistema têm levado à busca de novos materiais poliméricos que possam substituir parcialmente os materiais sintéticos (CARASCHI et al., 2002; ROSA et al., 2002). A Alemanha, por

exemplo, pretende substituir, nos próximos 60 anos, pelo menos 60 % do plástico sintético consumido internamente por polímeros biodegradáveis (VASCONCELOS, 2002).

Como alternativas para a minimização dos impactos causados pelos plásticos ao meio ambiente, vários estudos tem se voltado ao desenvolvimento e ao processamento dos polímeros biodegradáveis, que vem despertando um crescente interesse devido à amplitude de suas aplicações, que não ficam restritas somente à área ambiental, mas também à área biomédica. Neste contexto, destacam-se os poli-hidroxicanoatos (PHAs) que são poliésteres biológicos e biodegradáveis (DUARTE et al., 2004).

1.2 Poli-hidroxicanoatos - PHAs

Os Poli-hidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres completamente biodegradáveis em ambientes microbiologicamente ativos. Além de serem biocompatíveis podem ser biossintetizados por bactérias a partir de diversas fontes de carbono renováveis ou não-renováveis ou por plantas geneticamente modificadas (PRADELLA, 2006). São acumulados por diversas bactérias (Figura 1.1), na forma de grânulos intracelulares (medindo 0,2 - 0,5 μm de diâmetro) de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (BRAUNEGG et al, 1998; STEINBÜCHEL, 1991; GOMEZ et al., 1993). Em geral, a síntese de PHA por bactérias, em um meio nutritivo, ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células, sendo eles: Nitrogênio (N), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Ferro (Fe), etc.) (STEINBÜCHEL E VALENTIN, 1995; BRANDL et al., 1990).



Figura 1.1 Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxicanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica) (SILVA et al., 2007).

O termo PHA é aplicado a uma variada família de poliésteres representada pelo esquema da Figura 1.2.

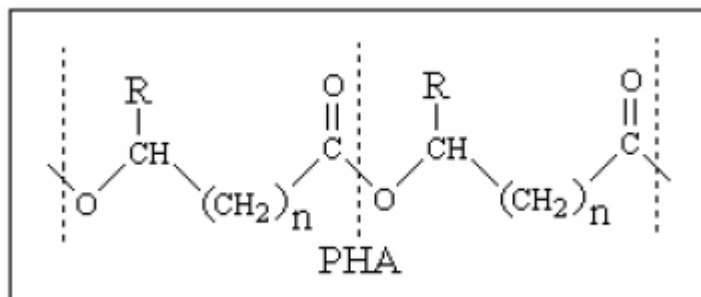


Figura 1.2 Fórmula química geral dos PHA. O valor de n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H , CH_3 , CH_2CH_3 , para $n=1$, os PHAs são classificados como PHAscl (“short chain length”), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando $R = (CH_2)_2CH_3$ a $(CH_2)_8CH_3$, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl (“medium chain length”) (SILVA et al., 2007).

Geralmente a produção biotecnológica de PHA em biorreatores, ocorre em duas fases. A primeira, denominada fase de crescimento, caracterizando-se pela produção de biomassa com baixo conteúdo de polímero estocado (RAMSAY et al., 1990). A segunda, denominada fase de acúmulo, ocorre quando um dos nutrientes essenciais ao crescimento (N, P, Mg, etc.) é limitado no meio de cultivo, e com simultâneo excesso da fonte de carbono (ANDERSON e DAWES, 1990).

Os PHAs são completamente biodegradados à água e dióxido de carbono, quando descartados em ambiente aeróbio (perda de 100 % de massa em 60 semanas). Em condições anaeróbias, sua degradação pode gerar metano e dióxido de carbono (perda total de massa polimérica em cerca de 6 semanas) (LUZIER, 1992).

Mais de 100 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHAs sintetizados por organismos naturais ou recombinantes, o que demonstra a grande diversidade de PHAs que podem ser produzidos. Entre os PHAs mais estudados e produzidos industrialmente, estão o poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) e o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)). O P(3HB-co-3HV) possui propriedades mecânicas superiores ao P(3HB), sendo mais flexível, o que o torna mais atrativo para fins industriais (BYROM, 1987; SQUIO e ARAGÃO, 2004).

No Brasil, a produção de PHAs começou a partir dos anos 90. Um projeto envolvendo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), e a

empresa Copersucar, iniciaram as pesquisas de produção de P(3HB) a partir da sacarose da cana-de-açúcar. Em 1995, foi implantada uma planta piloto, na Usina da pedra em Serrana-SP, para a produção de PHAs, com o objetivo de produzir P(3HB) para suprir o mercado para testes e provas. Essa é a única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, constituindo em uma produção integrada na usina sucroalcooleira. A resina é comercialmente conhecida como Biocycle (NONATO et al., 2001; http://www.resol.com.br/curiosidades/curiosidades_2.php?id=2724).

Um dos desafios para a produção de PHA é a redução dos custos ao mesmo nível dos congêneres produzidos a partir de petróleo. Muitas companhias projetam, uma diminuição substancial dos custos de produção para algo em torno de US\$ 1,8 a 2,00/kg, valor que, acreditam, seja competitivo com os polímeros de petróleo. Para tanto, ganhos de escala de produção, rotas tecnológicas otimizadas, a intensificação do uso de fontes renováveis de matérias-primas e energia de baixo custo tem atraído a atenção no desenvolvimento dos bioplásticos (PRADELLA, 2006).

1.2.1 Poli(3-hidroxiбутирато) – P(3HB)

O P(3HB) é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, sendo um poliéster natural e biodegradável pertencente à família dos poli-hidroxiálcanoatos, sintetizado e acumulado no interior de diferentes bactérias como grânulos intracelulares (inclusões insolúveis em água), com diâmetro de 100 a 800 nm podendo chegar a até 80 % da massa seca da célula (ANDERSON e DAWES, 1990; BRAUNEGG et al., 1998; TSUGE, 2002).

O interesse industrial na produção do P(3HB) iniciou-se na década de 60, quando suas propriedades termoplásticas foram primeiramente descritas. Durante a década de 70, esse polímero foi considerado como potencial substituto para os polímeros convencionais de origem petroquímica, uma vez que o P(3HB) é produzido por meio de fontes renováveis de carbono (GOMEZ et al., 1997).

O P(3HB) é um termoplástico altamente cristalino, duro e quebradiço, lembrando o poliestireno (PS) ou o poli(cloreto de vinila) (PVC) não-plastificado. Suas propriedades físicas são frequentemente comparadas às do polipropileno, por possuir ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea similares. Entretanto, a baixa processabilidade, o elevado grau de cristalinidade e

fragilidade do P(3HB) limitam suas aplicações (ZHANG et al., 1997). Contudo, agentes nucleantes, plastificantes e outros aditivos tem sido utilizados com intuito de ampliar o uso de P(3HB) em vários processos como, por exemplo, moldes por injeção (NONATO et al., 2001).

A produção de P(3HB) consome somente 10 % da energia não renovável utilizada no processo de produção do polipropileno (PP). As fontes de energia renováveis utilizadas no processo de produção do P(3HB) incluem cana de açúcar, açúcar (sacarose) e um álcool superior (subproduto da fermentação do etanol) utilizado como solvente extrator do biopolímero (<http://www.biocycle.com.br>).

1.2.2 Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) – P(3HB-co-3HV)

Embora seja biodegradável e termoplástico, o P(3HB) é quebradiço, o que limita suas aplicações. A inserção de unidades de 3-hidroxi-valerato (HV), contendo cinco átomos de carbono dá origem ao copolímero P(3HB-co-3HV), com propriedades que lhe conferem maior maleabilidade (SILVA et al., 2007).

O copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido em duas fases, sendo que a partir do início da fase de acúmulo, são adicionados glicose e ácido propiônico. P(3HB-co-3HV) com até 30 mol% de unidades 3HV é produzido e essa fração pode ser controlada pela razão glicose/ácido propiônico adicionada. Como o ácido propiônico, em níveis acima de 0,1 % no meio, é tóxico ao micro-organismo e inibe a síntese de polímero, sua alimentação precisa ser bem controlada (BYROM, 1987; SQUIO e ARAGÃO, 2004).

A empresa inglesa ZENECA Bioproducts foi a pioneira no desenvolvimento industrial do P(3HB-co-3HV). Este copolímero possui melhores propriedades mecânicas de processabilidade, em relação ao polímero P(3HB), em função do aumento da resistência ao impacto, da maciez e da flexibilidade (SCHNEIDER, 2006). As propriedades físicas e térmicas desses copolímeros são dependentes da composição de (HV), e a temperatura de fusão decresce com o aumento da fração de HV no copolímero, sem afetar a temperatura de degradação. Isto permite melhores condições de processabilidade (POIRIER et al., 1995).

A MONSANTO em 1996 adquiriu da Alemanha o processo de produção do copolímero (P(3HB-co-3HV)) comercializado com o nome BIOPOL^{IM}.

1.3 Micro-organismos produtores de poli-hidroxicanoatos

Os micro-organismos capazes de acumular PHAs são geralmente 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 baratas, velocidades de crescimento e síntese de polímero, e o máximo conteúdo de polímero acumulado, devem ser levados em consideração na escolha do micro-organismo. Um número de bactérias, incluindo *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azobacter vinelandii*, metilotrofos, *Pseudomonas* e *Escherichia coli* e, as versões recombinantes de *C. necator*, *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* tem sido empregadas para a produção de PHAs (LEE et al., 1995; BYROM, 1987).

1.3.1 *Cupriavidus necator*

Muitos são os micro-organismos produtores de PHA. Entre eles, a espécie *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta melhores condições à produção industrial. Este micro-organismo destaca-se pela possibilidade de acumular mais de 80 % de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos como glicose, frutose, dentre outros (RAMSAY, 1994).

O acúmulo de PHA, na forma de grânulos, em *C. necator*, geralmente ocorre quando existe excesso de fonte carbono e limitação de algum nutriente essencial à sua multiplicação. 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, o processo é feito inversamente, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo do polímero no interior da célula (TIAN et al., 2005). O biopolímero pode sofrer degradação intracelular que ocorre, via de regra, em condições de cultura opostas àquelas onde se observa o seu acúmulo, ou seja, em situações onde haja pouca disponibilidade da fonte de carbono, e não haja limitação de outras necessidades nutricionais.

A Figura 1.3 mostra a evolução do crescimento e de acúmulo de polímero P(3HB) ao longo de 24 h de cultivo.

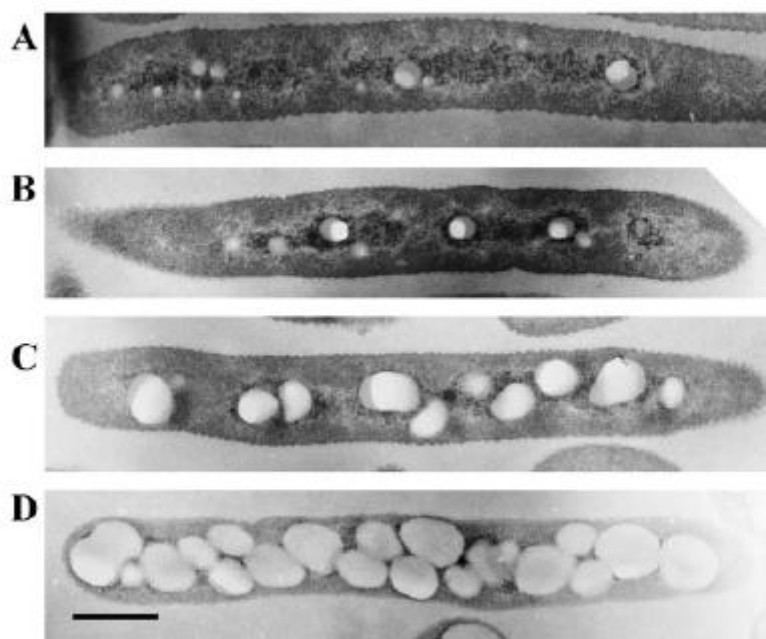


Figura 1.3 Imagens microscópicas de elétrons de transmissão (TEM) de *C. necator* na produção de P(3HB) a 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o "desaparecimento" dos elementos de mediação escuro-manchados dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final dos grânulos de P(3HB) após 24 h é de 0,5 μm (TIAN et al., 2005).

1.4 Métodos de extração

Como os PHAs são produzidos intracelularmente, os métodos adotados para extração e purificação destes polímeros contribuem significativamente para o desenvolvimento e economia global do processo de produção. O desenvolvimento de metodologia que permita a recuperação por processo simples, eficiente e menos poluente dos PHAs é uma proposta necessária e atrativa. Após o cultivo, a suspensão celular contendo PHAs é separada por processos convencionais, em seguida, a parede celular precisa ser rompida para a extração do polímero. Vários métodos de extração foram desenvolvidos para a recuperação de PHAs. A seguir, são apresentados alguns métodos de recuperação de biopolímeros.

1.4.1 Extração com solventes

Após o cultivo, as células contendo PHA são separadas do caldo fermentado por meio de processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-

centrifugação. Em seguida, as células são rompidas para a recuperação do polímero. A maioria dos processos de extração de PHA, propostos na literatura, envolve o rompimento das células com o uso de solventes, tais como: hidrocarbonetos clorados, cloreto de metila, clorofórmio e dicloroetano. Esses solventes rompem as células, solubilizando seus lipídios, inclusive os PHAs. Compostos orgânicos polares, como acetonas e alcoóis, também podem ser citados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHAs intactos (KESSLER e WITHOLT, 2001; HOLMES e LIM, 1990).

Estima-se que o impacto do custo de recuperação de PHA no custo total do processo de produção possa equivaler a 50 % do valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHA acumulado na biomassa (SILVA et al., 2007).

Os solventes mais utilizados no processo de extração de P(3HB) são: o clorofórmio (FORMOLO et al., 2005; DALCANTON, 2006; KESSLER e WITHOLT, 2001), o 1,2-carbonato de propileno (LAFFERTY e HEINZLE, 1979; FIORESE et al., 2009); e o dicloroetano (VANLAUTEM e GILAIN, 1982).

A vantagem do uso de solventes reside na alta pureza do produto (>99 %). Entretanto, as soluções de polímero extraídas são muito viscosas, sendo difícil a remoção do material celular. A utilização de grandes volumes de solventes voláteis e tóxicos, na recuperação de P(3HB), não somente aumenta o custo total de produção, como gera conseqüências ambientais graves (MCCHALICHER et al., 2009; SILVA et al., 2007).

São necessárias técnicas de extração de P(3HB) que possam diminuir a quantidade de solventes utilizados e tornar o processo mais simples e menos poluente, reduzindo, assim, os custos de recuperação de P(3HB) (DALCANTON, 2006).

No Brasil, foi desenvolvido um método de recuperação de P(3HB) utilizando 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. A biomassa era submetida a estes solventes a alta temperatura, solubilizando o polímero na fase orgânica, seguindo-se a remoção dos restos celulares por filtração e precipitação do polímero na massa de solvente por resfriamento da solução, com remoção do solvente e secagem (DERENZO et al., 2002). Esta tecnologia está sendo utilizada em escala industrial (NONATO et al.,

2001). Este processo foi recentemente modificado para inserir, após a precipitação do polímero, uma etapa de concentração da suspensão polímero/solvente através de sua passagem por um equipamento de microfiltração (MANTELATTO et al., 2005).

Segundo Chen et al., (2001), para potencializar a produção de P(3HB), é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e extração deste polímero, de baixo custo e impacto ambiental reduzido, buscando torná-lo mais competitivo e, desta forma, potencializar sua aplicabilidade. Neste contexto, dentre os solventes utilizados até o momento para a extração de PHA da célula, do ponto de vista da química verde, destaca-se o 1,2-carbonato de propileno, cuja fórmula estrutural pode ser vista na Figura 1.4, por possuir muitas características atraentes. Constatou-se que a utilização de solventes tóxicos e altamente voláteis, para a extração de poli-hidroxicarboxilatos, é contraditória ao fato de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas por polímeros de origem petroquímica. O 1,2-carbonato de propileno segundo a IUPAC recebe a nomenclatura de 4-metil-1,3-dioxolan-2-ona.

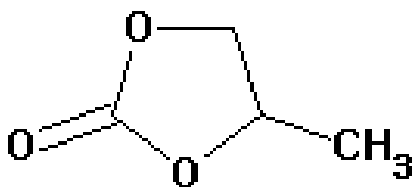


Figura 1.4 Fórmula estrutural do 1,2-carbonato de propileno.

Na Tabela 1.1 estão apresentados os dados físico-químicos do 1,2-carbonato de propileno.

Tabela 1.1 Dados físico-químicos do 1,2-carbonato de propileno.

Propriedades físico-químicas	1,2-carbonato de propileno
Solubilidade em água	240 g/l (20 °C)
Ponto de fusão	-49 °C
Massa molar	102.09 g/mol
Densidade	1.205 g/cm ³ (20 °C)
Ponto de ebulição	240 °C

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Propylene_carbonate

O 1,2-carbonato de propileno é um líquido claro, altamente polar, não viscoso e com baixa toxicidade. Além disso, não persiste no meio ambiente e não é genotóxico, ou seja, não causa danos aos genes de uma célula ou de um organismo (CIR, 1987; EPA, 1998) e possui alto ponto de ebulição, próximo a 240 °C. Esta propriedade, quando comparada com as temperaturas de processamento, garante um baixo risco de perda do solvente por evaporação, garantindo alta porcentagem de recuperação. Além disso, a comparação entre os pontos de ebulição do 1,2-carbonato de propileno com os não solventes como o metanol e a água sugerem que esses solventes podem ser facilmente separados e reutilizados após a recuperação dos PHAs. Portanto, a maioria das recuperações de polímeros poderia ser realizada com solventes reciclados, limitando o consumo de solventes caros e, conseqüentemente, reduzindo os custos do processo de extração (MCCHALICHER et al., 2009).

Embora haja uma preocupação sobre a presença de solventes residuais em plásticos, o 1,2-carbonato de propileno já foi aprovado para uso em muitas aplicações sensíveis, tais como cosméticos. Estudos têm demonstrado que o 1,2-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 consiste na aplicação de doses diárias de até 5000 mg de 1,2-carbonato de propileno por quilograma de peso corporal de ratos, não demonstraram nenhum efeito após 90 dias. Embora esses estudos não sejam conclusivos, sugerem que o 1,2-carbonato de propileno pode ser adequadamente utilizado para aplicações sensíveis, tais como embalagens para alimentos (CIR 1987, MCCHALICHER et al.,2009).

1.4.2 Métodos de digestão

1.4.2.1 Digestão por surfactantes

Os surfactantes se incorporam à membrana lipídica, rompendo a parede celular de bactérias como *C. necator*, auxiliando na extração de P(3HB) (JACQUEL et al., 2008). O surfactante também provoca a solubilização de materiais celulares não poliméricos. A vantagem potencial da utilização de surfactantes é a alta qualidade da

recuperação de P(3HB), pequena produção de poluentes e aplicação em altas concentrações celulares (SUZUKI et al., 2008; SINGH et al., 2007).

O uso individual de surfactante não proporciona PHAs com valores superiores que 97 % de pureza, sendo necessária a utilização de outros agentes tais como hipoclorito e hidróxido de sódio. Além disso, altas doses de surfactante são necessárias, aumentando o custo de recuperação dos PHAs (JACQUEL et al., 2008).

Suzuki et al. (2008) estudaram a utilização de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) como surfactante para a purificação de P(3HB) produzido por *Burkholderia cepacia* IPT64. O tratamento com SDS mostrou eficiência na solubilização de materiais celulares não-P(3HB) (NPCM) e no aumento da pureza do biopolímero após a digestão enzimática. Quando a relação SDS/células foi de 0,56, obteve-se um polímero com 71 % de pureza. Quando SDS foi utilizado sozinho, obteve-se um polímero com 38 % de pureza.

Kim et al. (2003) estudaram a recuperação de P(3HB) produzido por *C. necator* em alta densidade celular sob adição de SDS. A concentração celular variou de 50-300 g/L de células secas, já a relação SDS/biomassa ficou em 0,1 e 0,7. O percentual de P(3HB) extraído usando a proporção SDS/ biomassa superior a 0,4 foi de 90 % com pureza de 95 %. O método de recuperação de P(3HB), com adição de SDS, mostrou-se promissor economicamente para a recuperação de polímero de culturas de alta densidade celular.

1.4.2.2 Digestão com hipoclorito de sódio (NaOCl)

O hipoclorito de sódio é utilizado para a digestão do material celular não-P(3HB). Contudo, durante essa digestão ocorre grande degradação de P(3HB), resultando na redução da massa molar desse biopolímero. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95 % (LEE et al., 1996).

Berger et al. (1989) buscando minimizar a degradação do biopolímero, através da digestão com NaOCl, otimizaram: a concentração inicial de biomassa, o tempo de digestão e o pH da solução de hipoclorito. O P(3HB) a partir de biomassa original, com Massa Molar Ponderal Média (Mw) igual a 1.200.000, apresentou após a digestão: 95 % de pureza e Mw de 600.000, ou seja, a massa molar do polímero foi reduzida para 50 %.

Segundo Ramsay et al., (1990) a realização de um pré-tratamento com surfactante e digestão com hipoclorito sob condições otimizadas resulta em um PHA mais puro e com menor degradação.

1.4.2.3 Digestão com hipoclorito de sódio e clorofórmio

Um método de recuperação de P(3HB), produzido por *C. necator* utilizando dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio foi desenvolvido por Choi e Lee. (1997). A partir deste método, obtiveram uma solução constituída por três fases, sendo a fase superior de solução de hipoclorito de sódio, a fase intermediária o material não-PHA e a fase inferior contendo clorofórmio e P(3HB). A fase mais leve e a intermediária foram removidas, o P(3HB) dissolvido em clorofórmio foi precipitado com a adição de um não solvente composto por metanol e água. No final do processo obtiveram P(3HB) em pó.

Em um processo de recuperação de P(3HB) sintetizado por *C. necator*, Hahn et al. (1994) utilizaram dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio. O P(3HB) em pó foi recuperado com solução de 30 % de hipoclorito, tempo de tratamento de 90 min e relação 1:1 de clorofórmio em relação à fase aquosa. Sob estas condições foi alcançada uma recuperação do polímero e uma porcentagem de pureza de 91 % e 97 %, respectivamente. O uso do hipoclorito de sódio juntamente com clorofórmio reduziu significativamente a degradação do P(3HB). Entretanto, este processo de dispersão de P(3HB) requer uma grande quantidade de solvente.

Ao utilizar a dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio para recuperar P(3HB) produzido a partir de *C. necator*, Kim et al. (2003) obtiveram 99 % de pureza, para concentrações celulares entre 10 e 100 g.L⁻¹. Porém, a recuperação foi reduzida com o aumento da concentração celular, devido à elevação da viscosidade da solução, onde a recuperação foi de 74 % para uma concentração celular de 100 g.L⁻¹.

1.4.2.4 Digestão com surfactante e quelante

Chen et al. (1999) reportaram uma técnica de recuperação de P(3HB) usando solução aquosa de surfactante e quelante. As condições ótimas de extração foram encontradas para razão de surfactante-biomassa seca de 0,12:1 e razão de

quelante-biomassa seca de 0,08:1. Nestas condições, a pureza foi de 98,7 %, a recuperação de 93,3 % e a massa molar de $3,1 \cdot 10^5$ Da, sendo a massa molar original de $4 \cdot 10^5$ Da. Segundo os autores, a adição de quelante pode desestabilizar a membrana celular externa. Essas mudanças na membrana fazem com que o rompimento da parede de *C. necator* seja mais fácil e se obtenha uma maior pureza do P(3HB) recuperado. Apesar do método de surfactante e quelante apresentarem bons resultados para recuperação, pureza e degradação do biopolímero, os autores concluíram que o processo gera um grande volume de águas residuais.

1.4.2.5 Digestão enzimática

O método de recuperação de PHAs utilizando digestão enzimática tem a vantagem de ser um processo seletivo e eficiente em termos energéticos, além de oferecer menor risco de danos ao produto quando comparado com outras metodologias (ASENJO e SUK, 1986). Considerando que o uso de enzimas conduz a bons níveis de recuperação, a elevação do custo no processo é o principal inconveniente desta tecnologia (JACQUEL et al., 2008).

Métodos de digestão enzimática em meio aquoso foram desenvolvidos pela empresa Zeneca Bioproducts, como alternativa à extração com solventes (HOLMES e LIM, 1990). Eles consistem em tratamento térmico da biomassa, contendo o PHA, para ruptura das células e desnaturação dos ácidos nucléicos, que poderiam interferir nos passos subsequentes. Em seguida, realiza-se um tratamento enzimático, com a mistura de várias enzimas hidrolíticas (lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases, entre outras) e lavagem com surfactantes aniônicos, para solubilizar o material celular não desejado (*debris* celulares). A maior parte do material é hidrolisado por estas enzimas enquanto o polímero permanece intacto. Após a lavagem e floculação, o polímero é recuperado como um pó branco, que é convertido em *chips* para ser comercializado (BYROM, 1987; KESSLER e WITHOLT, 2001).

Suzuki et al. (2008) estudaram a purificação de P(3HB) produzido por *Burkholderia cepacia* IPT64 através de uma via química e enzimática. Os tratamentos químicos foram realizados no pré ou pós-tratamento para os tratamentos enzimáticos. A enzima utilizada para o tratamento enzimático foi a enzima proteolítica Esperase 8.0 L[®] fornecida pela Novozymes Latin America, e para

os tratamentos químicos foram utilizados os seguintes reagentes: dodecil sulfato de sódio (SDS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e fenton's. Nenhum resultado efetivo foi obtido com a ação isolada de H_2O_2 , SDS e fenton's (mistura de H_2O_2 e sais de ferro) na purificação do P(3HB). Os melhores resultados de pureza para o polímero foram obtidos quando a digestão enzimática foi utilizada, como um pré-tratamento, seguido do tratamento com um agente químico.

Neves (2009) testou diferentes enzimas para a recuperação e purificação de PHAs por *C. necator*. As enzimas testadas foram: Alcalase[®] (endoprotease) fornecida pela Novozymes; Corolase L10[®] (protease a base de papaína), Corolase 7089[®] (proteolítica que contém exclusivamente endoprotease), Corolase PP[®] (contém enzimas proteolíticas como endoprotease), Rohalase Barley[®] (complexo enzimático que contém predominantemente β -glucanase), Rohalase BX[®] (β -glucanase), Rohament CL[®] (celulase) cedidas pela AB Enzimes; Celumax BC[®] (sistema de enzimas à base de mananase, celulase e hemicelulase) e Protemax FC[®] (endo/exo-peptidases) da Prozyn Biosolutions. Das nove enzimas avaliadas a Celumax[®] BC foi a que apresentou melhor resultado. Quando o tratamento com esta enzima foi realizado a 60 °C e pH 4,0, obteve-se recuperação de 94,5 % e pureza de 91 % de P(3HB-co-3HV).

Kapritchoff et al. (2006) estudaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação de P(3HB) produzido por *C. necator*. As enzimas testadas foram: quimiotripsina bovina da Biobrás (Brasil), tripsina bovina da Biobrás (Brasil), bromelina da Merck (Germany), papaína da Merck (Germany), lisozima da Boehringer Mannheim (Germany), celulase da Sigma-Aldrich (USA), pancreatina bovina da KimMaster (Brasil). Com a pancreatina a 50 °C e pH de 9,0 obteve-se 90 % de P(3HB) puro.

1.4.3 Extração com rompimento mecânico

O rompimento mecânico da célula é amplamente utilizado para recuperar proteínas intracelulares (TAMER et al., 1998).

Garcia (2006) propôs um método mecânico alternativo para extração do P(3HB) usando para ruptura celular pérolas de vidro em um moinho de bolas. Na biomassa, adicionaram-se pérolas de vidro e clorofórmio e a solução foi submetida a aquecimento e agitação. Após esta etapa, as células foram rompidas no moinho de

bolas. Em seguida, foram centrifugadas, formaram-se três fases distintas, sendo a fase inferior composta pelas pérolas de vidro, a fase intermediária contendo clorofórmio mais polímero e a fase superior formada pelos *debris* celulares. As condições ótimas de processo foram 0,7 g de pérolas de vidro com 1,25 mm de diâmetro para 2 mL de suspensão celular e 1 mL de clorofórmio. Este método mecânico desenvolvido para extração de P(3HB) de *C. necator* apresentou um rendimento de extração 64 % e pureza de 89 %.

1.4.4 Extração supercrítica

Hejazi et al. (2003) aplicaram a técnica de extração supercrítica com CO₂ à recuperação de P(3HB) de células de *C. necator*. Os efeitos de diferentes condições tais como tempo de exposição, pressão, temperatura e volume de metanol, foram investigados utilizando análise estatística para determinar as melhores condições. As condições ótimas para o rompimento celular e recuperação de P(3HB) foram os seguintes: tempo de contato de 100 min, pressão de 200 atm, temperatura de 40° C e 0,2 mL de metanol. Em condições ideais, obteve uma recuperação de 89 % de P(3HB). Os autores encontraram ótimas condições de extração, porém para aumentar a eficiência do método foram necessários passos adicionais de pré-tratamento com bases, bem como um cuidado adicional para que não ocorresse hidrólise alcalina na extração de P(3HB) da célula.

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), amplamente aplicáveis para técnicas de extração em larga escala.

1.4.5 Vantagens e desvantagens dos métodos de extração de PHAs

A Tabela 1.2 mostra a comparação entre os métodos de extração expostos neste trabalho.

Tabela 1.2 Comparação dos métodos de extração de poli-hidroxicanoatos.

Método de isolamento	Vantagens	Desvantagens
Extração com solvente	Eliminação de endotoxina Alta pureza Não degrada o polímero	Rompimento da morfologia natural do grânulo de PHA; riscos relacionados à utilização de solventes halogenados; baixa recuperação; elevada quantidade de solvente necessária.
Digestão com surfactantes	Tratamento de alta densidade celular Não degradação do polímero	Baixa pureza; necessidade do tratamento de águas residuais.
Digestão com NaOCl	Alta pureza	Degradação do polímero
Digestão com NaOCl e clorofórmio	Baixa degradação do polímero de pureza elevada	Elevada quantidade de solvente necessária
Digestão com surfactante e quelante	Elevado grau de pureza Impacto ambiental reduzido	Grande volume de água residual
Digestão enzimática	Boa recuperação	Alto custo com enzimas
Supercrítica CO ₂	Baixo custo Baixa toxicidade	Baixa recuperação

Fonte: JACQUEL et al. (2008)

1.5 Propriedades do P(3HB)

Todos os PHAs compartilham algumas propriedades que os recomendam para determinadas aplicações e os tornam interessantes para a indústria. Eles são termoplásticos e/ou elastoméricos, insolúveis em água, não-tóxicos, biocompatíveis, exibem propriedades piezoelétricas (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos), como revelado para o P(3HB) e para o P(3HB-co-3HV) (FORMOLO et al., 2003).

As propriedades desejáveis às diferentes aplicações de um material polimérico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência a pressão, resistência ao alongamento antes de ruptura e forte resistência ao impacto. A massa molar do P(3HB) produzido pelo *C. necator* é, usualmente, em torno de 1.10^4 a 3.10^6 g.mol⁻¹ (SUDESH et al., 2000).

Segundo Agus et al. (2006) o polímero com alta massa molecular é um material muito útil para a preparação de filmes e fibras fortes por extração quente ou fria.

O P(3HB) é um termoplástico que possui propriedades físicas e mecânicas comparáveis às do polipropileno (PP), sendo um material semicristalino, com alta temperatura de fusão e alto grau de cristalinidade, o que o torna duro e quebradiço, tornando limitadas suas aplicações. O grau de fragilidade depende do grau de cristalinidade, da temperatura de transição vítrea e da microestrutura. Sendo insolúvel em água, apresenta baixa permeabilidade a O₂, H₂O e CO₂ e é totalmente biodegradável (GHAFAR, 2002; DUARTE et al., 2004).

A degradação térmica do P(3HB) ocorre com o aquecimento desse poliéster a temperaturas próximas a seu ponto de fusão (170-200 °C). Nessas condições, ocorre a quebra das ligações ésteres entre as unidades repetitivas e a rápida redução de sua massa molar média. A degradação do P(3HB) em temperaturas entre 170–200 °C produz principalmente oligômeros. Uma vez que a degradação térmica resulta na diminuição da massa molar do P(3HB), todas as propriedades físicas e mecânicas também são alteradas. Por exemplo, a degradação térmica pode resultar em diminuição da temperatura de fusão e no grau de cristalinidade, da viscosidade, além de tornar o P(3HB) mecanicamente frágil. Os efeitos da degradação sobre as propriedades do P(3HB) mostrados nesse item permitem concluir que o processamento desse poliéster em extrusoras ou injetoras deve ocorrer em condições restritas de temperatura (QUENTAL et al., 2010).

A flexibilidade de um polímero também pode ser avaliada através do módulo de elasticidade ou módulo de Young, quanto menor o módulo de Young maior a elasticidade do polímero.

Em termos de propriedades físicas, o módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado à sua rigidez ou flexibilidade, de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero (SCHNEIDER, 2006). Os filmes obtidos a partir de P(3HB) apresentam uma excelente impermeabilidade ao oxigênio e uma resistência aos raios ultravioleta (UV) superior a do polipropileno, o que o torna interessante para uso em embalagens de alimentos (BUCCI, 2003; HOLMES, 1985).

Para tornar o P(3HB) um material economicamente competitivo, é imprescindível aperfeiçoar seu processamento utilizando processos usuais de transformação de polímeros a partir do estado plastificado (temperatura de

processamento > Tg para polímeros amorfos ou temperatura de processamento > Tm para polímeros semicristalinos) que, por sua vez, é muito limitado devido à degradação térmica sofrida pelo P(3HB). A possibilidade de processá-lo e moldá-lo como um típico termoplástico ampliariam suas aplicações (CALLISTER, 1997; QUENTAL et al., 2010).

A cristalinidade de um polímero pode ser considerada como um “arranjo ordenado”, uma repetição regular de estruturas atômicas moleculares. O P(3HB) apresenta todos os seus átomos de carbono ligados assimetricamente, com cristalinidade variando entre 55 e 80 % (LEE et al., 1996).

Vários estudos importantes têm sido realizados na tentativa de reduzir a fragilidade do P(3HB). Alguns desses estudos baseiam-se na obtenção de copolímeros com unidades de hidroxivalerato, que apresentam menor cristalinidade e melhores propriedades mecânicas que o P(3HB). Outros estudos baseiam-se na mistura física com diversos outros polímeros biodegradáveis e sintéticos (FIORESE, 2008).

A Tabela 1.3 compara as principais características dos polímeros P(3HB) e PP. Ambos se fundem à temperaturas muito próximas, 180 °C para o P(3HB) e 174 °C para o PP. Os valores de Tg dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir Tg = -17 °C, mostra-se mais flexível que o P(3HB) (Tg = 5 °C). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada pelo módulo de elasticidade do PP (1700 MPa), que é bem inferior ao do P(3HB) (3500 MPa). No entanto, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade (FORMOLO et al., 2003).

Tabela 1.3 Comparação entre as características do P(3HB) e do PP.

Características	P(3HB)	(PP)
Temperatura de fusão	180°C	174°C
Temperatura de transição vítrea (T_g)	5°C	-17°C
Densidade	1.18 – 1.25 g/cm ³	0,91 g/cm ³
Grau de cristalinidade	70%	68%
Permeabilidade de oxigênio	45 (cm ³ /m ² /at/dia)	1700 (cm ³ /m ² /at/dia)
Módulo de elasticidade (Módulo de Young)	3500MPa	1700MPa
Tensão de cisalhamento	40MPa	38MPa
Resistência à ruptura	5%	400%
Massa molar	1 – 8 . 10 ⁵	2,2 – 7 . 10 ⁵

Fonte: Gomes e Bueno Netto (1997).

1.6 Aplicações dos biopolímeros

As aplicações do P(3HB) e dos PHAs estão diretamente ligadas às suas propriedades específicas: mecânicas, físicas, térmicas, de biocompatibilidade e de biodegradação, dentre outras (SCHNEIDER, 2006; VASCONCELOS, 2002; FORMOLO et al., 2003).

Suas propriedades físicas permitem que sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais de origem petroquímica, na sua grande maioria de aplicações como peças desenvolvidas por termoformagem e injeção em moldes, filmes extrudados e fios, dentre outros. Por ser biocompatível, encontram-se na área médica aplicações como fios de sutura, moldes para engenharia de tecidos e matriz para liberação controlada de fármacos. As propriedades físicas de PHA, bem como suas aplicações, dependem em grande medida de sua composição monomérica e do tamanho da cadeia. Por outro lado, a composição de PHA e sua massa molar, dependem da natureza química da matéria-prima oferecida como fonte de carbono, das condições ambientais de operação do biorreator e do tipo da bactéria empregada. Desta maneira, as características do polímero podem ser racionalmente moduladas no biorreator de produção (PRADELLA, 2006).

Em 28 de maio de 2009 o Instituto Nacional de Plásticos publicou que até 2011, a empresa PHB Industrial vai aumentar consideravelmente sua capacidade de produção do P(3HB). A intenção é passar a produção anual de 50 toneladas (t) para

36 mil t. Desse total, apenas 5 % deverá circular no mercado nacional. O restante será exportado para a Europa, Estados Unidos e alguns países da Ásia, como o Japão (<http://www.inp.org.br/boletins/048.html>).

A FDA (*Food and Drug Administration*), órgão que normatiza o setor de alimentos e remédios nos Estados Unidos, já aprovou o uso do plástico biodegradável de P(3HB) em embalagens alimentícias (MORAES, 2004).

No Brasil (boletim eletrônico da ABEQ) há o projeto de lei 203/91 cujo título é Política Nacional de Resíduos Sólidos o qual (finalmente) foi aprovado na Câmara e estaria voltando ao Senado para a apreciação final e aprovação. Pelo texto, fabricantes, importadores, distribuidores e comerciantes terão de investir para colocar no mercado artigos recicláveis e que gerem a menor quantidade possível de resíduos sólidos (http://www.abeq.org.br/Boletins/Boletim_Mar%C3%A7o_2010/Boletim%20192%20mar%C3%A7o%202010_1.htm).

A Injecom, empresa paulistana que produz objetos de plástico injetado, está no mercado há 18 anos, começou a comercializar em novembro de 2006 os invólucros de P(3HB) para mudas. No mercado, esses invólucros na forma de tubos são chamados de “tubets”. O tempo de decomposição depois de enterrado e seu formato foram projetados especialmente para a reprodução de mudas. A Votorantim e International Papers, indústria de papel e celulose, estão na lista de interessados pelo novo produto. As pequenas mudas saem dos viveiros nesses tubos de plástico, de onde são retiradas antes de serem plantadas na terra. Os “tubets” de plástico convencional são reutilizáveis, mas são pagos custos de frete, lavagem, esterilização e de reposição da ordem de 20 % ao ano. Testes realizados em “tubets” de P(3HB) mostraram que, como as mudas são plantadas direto na terra, a eliminação do manuseio evita a contaminação que atinge cerca de 20 % das plantas quando são usados os “tubets” convencionais (<http://www.inovacao.unicamp.br/pipe/report/061030-phb.shtml>).

De acordo com Coutinho et al. (2004), o P(3HB) vai atender aos requisitos de uma área específica de mercado, pois muitas empresas reconhecem que ter um produto feito com plástico biodegradável é um diferencial importante. O custo de produção dos PHAs ainda é muito alto comparado aos plásticos convencionais, o que limita suas aplicações em certos mercados (SCHNEIDER, 2006).

O desafio atual para os PHAs, que também é comum para todos os outros bioplásticos, é a redução dos custos ao mesmo nível dos congêneres produzidos a

partir de petróleo. Nosso país tem posição mundial privilegiada na produção de biopolímeros por dispor de matérias primas renováveis a baixo custo (fontes de carbono e energia) e por potencialmente, possuir mão-de-obra qualificada formada pelos diversos grupos de pesquisa já estabelecidos. O Brasil oferece oportunidades para o estabelecimento de uma plataforma mundial produtora e exportadora de biopolímeros, desde que ações concretas de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento sejam estabelecidas pelos órgãos públicos, em consonância com os setores produtivos do país (PRADELLA, 2006).

O potencial de substituição dos polímeros convencionais pelos bioplásticos é indicado pela literatura e mostrado na Tabela 1.4. Dentre estas substituições, destacam-se as áreas de embalagens, descartáveis e fibras têxteis, mercados dominantes no consumo de termoplásticos.

Exemplos de aplicações correntes e em desenvolvimento para os bioplásticos estão expostas na Figura 1.5.

Tabela 1.4 Potencial de substituição dos polímeros convencionais pelos bioplásticos (PRO-Bip 2004).

Materiais	PVC	PE-HD	PE-LD	PP	PS	PMMA	PA	PET		PC
Polímeros de amido	-	+	+	+	+	-	-	-		-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+		-
PTT	-	-	-	+	-	-	++	++		+
PBT	-	-	-	++	-	-	+	++		+
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-		-
PHB/HHx	+	++	++	++	+	-	-	+		-

++ substituição completa;

+ substituição parcial;

- não substituição.

PVC: cloreto de polivinila

PE-HD: polietileno de alta densidade

PE-LD: polietileno de baixa densidade

PBT: polibutileno tereftalato

PP: polipropileno

PS: poliestireno

PMMA: polimetil metacrilato

PA: poliamida

PET: polietileno tereftalato

PC: policarbonato

Fonte: Pradella (2006)

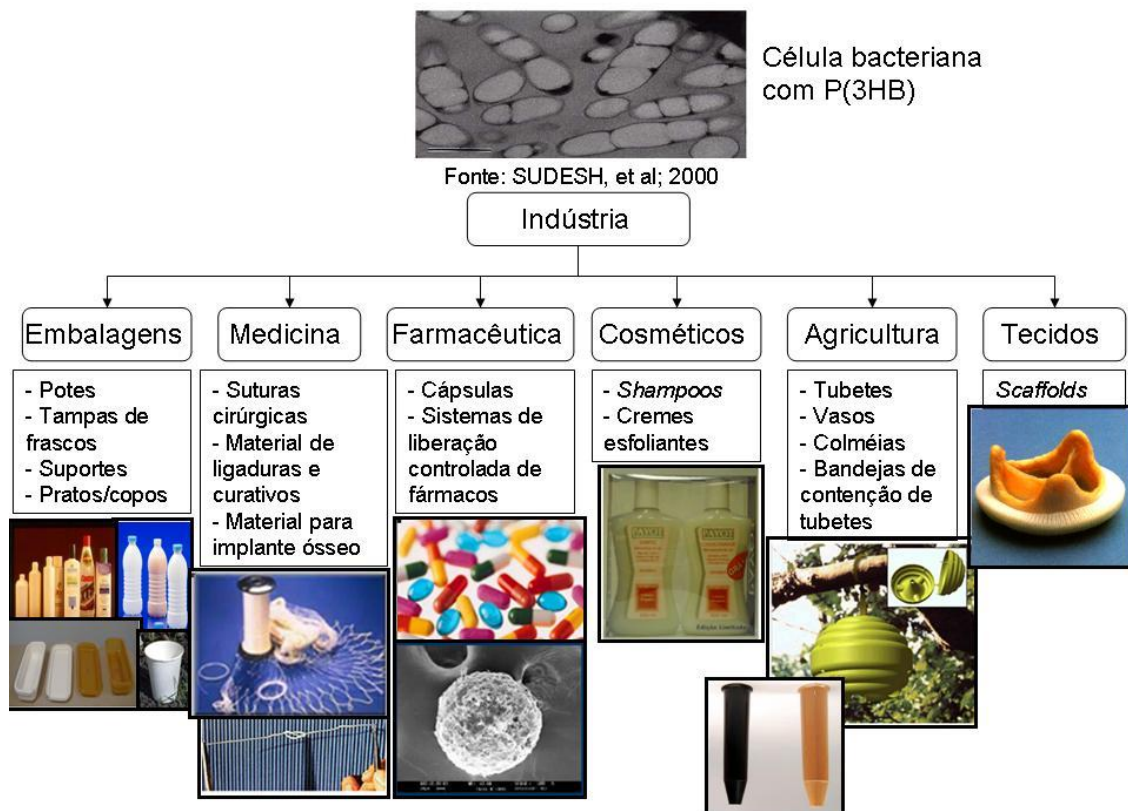


Figura 1.5 Aplicações para o P(3HB).

1.7 Biodegradabilidade

Segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* (ASTM-D-883), citado por ROSA et al. (2002), polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, derivam desse processo CO_2 , CH_4 , componentes celulares microbianos e outros produtos.

A velocidade de biodegradação dos PHAs é função de vários fatores, como população microbiana presente no ambiente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. Estes polímeros são sólidos insolúveis em água, enquanto as depolimerases são enzimas solúveis. Por isso, a degradação acontece através de uma reação heterogênea em duas etapas. A primeira é a de adsorção da enzima na superfície do polímero e a segunda, a de hidrólise das cadeias poliméricas, pelo sítio ativo da enzima. A

hidrólise sempre ocorre em uma superfície reacional, entre as enzimas adsorvidas e sítios de adsorção livres (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Na Figura 1.6 está exposta a degradação de frascos de Biopol[®] produzido pela Metabolix (EUA) em sistema aeróbio de lodo ativado, durante 0, 2, 4, 6 e 8 semanas (MADISON e HUISMAN, 1999).

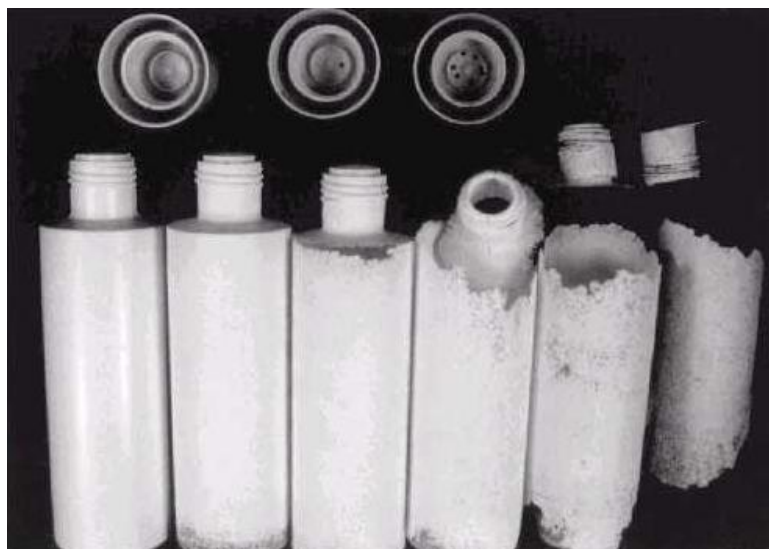


Figura 1.6 Degradação de frascos de P(3HB-co-3HV) Biopol[®] em lodo ativado (MADISON e HUISMAN, 1999).

A Figura 1.7 apresenta o ciclo de biodegradação do P(3HB). Neste ciclo, através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO₂ e água para produzir carboidratos. Esses podem ser utilizados como substrato em um processo fermentativo com micro-organismos específicos produzindo P(3HB) que serão processados formando artigos plásticos. Após sua utilização, o P(3HB) é depositado em ambiente microbiano ativo e a biodegradação deste polímero formará CO₂ e água.

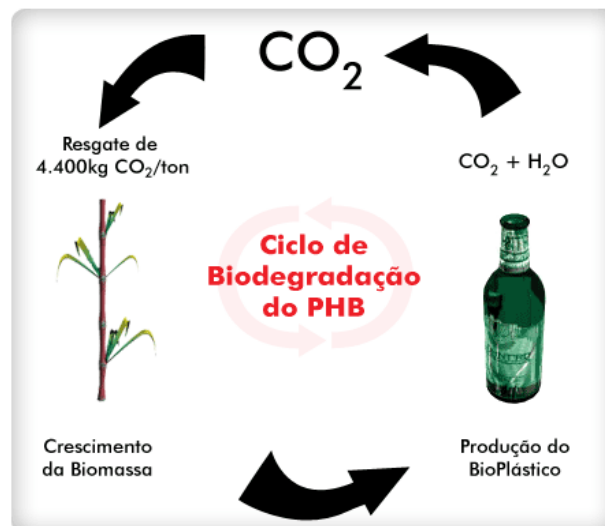


Figura 1.7 Ciclo de biodegradação do P(3HB) (<http://www.biocycle.com.br>).

O P(3HB) é um dos poli-hidroxicanoatos mais estudados e é degradado por inúmeros micro-organismos em diferentes ecossistemas (KIM, 2000). Os problemas decorrentes da poluição ambiental gerada pelo lixo plástico têm levado a comunidade científica a refletir sobre possíveis alternativas para o problema. Para o gerenciamento do lixo plástico produzido em sociedade, a biodegradação é uma das alternativas que tem sido proposta.

Rosa et al. (2002) avaliaram a biodegradação dos polímeros poli- β -(hidroxibutirato) (P(3HB)), poli- β -(hidroxibutirato-co-valerato) (P(3HB-co-HV)) e poli-(ϵ -coprolactona) (PCL) em solo compostado, utilizando a técnica de biodegradação aeróbica e observaram que o P(3HB) apresentou maior velocidade de degradação, principalmente no intervalo de 27 a 40 dias de exposição. Nesse período, a velocidade de biodegradação, medida em gramas de CO_2 por dia, foi de 2,72 g/dia.

CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de poli-hidroxicarboxilatos

2.1.1 Micro-organismo e meio de cultivo

O micro-organismo utilizado nos estudos foi uma linhagem de *Cupriavidus necator* (DSM 545), mutante de forma espontânea para a utilização da glicose.

Os experimentos foram conduzidos utilizando dois pré-inóculos. O primeiro foi realizado em caldo nutriente (NB), contendo peptona de carne (5,0 g.L⁻¹) e extrato de carne (3,0 g.L⁻¹), enquanto o segundo foi o meio mineral (MM) sem limitação de nitrogênio, estabelecido por Ramsay (1994) modificado por Aragão et al. (1996).

O meio de cultivo final foi composto dos nutrientes que compõem o meio mineral tendo a seguinte composição (por litro de meio): 1,5 g KH₂PO₄, 8,65 g Na₂HPO₄, 0,06 g citrato de amônio e ferro III, 0,01 g CaCl₂.2H₂O, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 2,3 g (NH₄)₂SO₄, 0,19 g ácido nitrilotriacético e elementos traço 1 mL. A solução de elementos traço apresentou em sua composição (por litro de meio): 0,3 g H₃BO₃, 0,2 g CoCl₂.6H₂O, 0,1 g ZnSO₄.7H₂O, 0,03 g MnCl₂.4H₂O, 0,03 g Na₂MoO₄.2H₂O, 0,02 NiCl₂.6H₂O g e 0,01 g CuSO₄.5H₂O.

2.1.2 Fonte de carbono

Glicose: frutose (1:1) foram utilizadas como fontes de carbono. Foi preparada uma solução concentrada de glicose: frutose (500 g.L⁻¹) e adicionada ao meio de maneira a proporcionar uma concentração inicial de cultivo de 40 g.L⁻¹.

2.1.3 Condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em biorreator com capacidade volumétrica de 5 L Bioflo 110 (New Brunswick) (Figura 2.1) com um volume de meio de 3 L. O biorreator, contendo a solução do meio final (item 2.1.1), foi autoclavado durante 20 min. a 121 °C. No início do cultivo foi adicionada a solução de glicose:frutose (1:1)

com concentração de 500 g.L^{-1} , com a finalidade de compor o meio inicial com 40 g.L^{-1} de açúcares redutores totais e, a solução de nitrogênio para o meio limitado. O inóculo, proveniente do segundo pré-cultivo (MM), foi adicionado na quantidade de 10 % do volume final de meio no biorreator.

Durante o cultivo a temperatura foi mantida em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH ajustado a 7,0 com soluções de $\text{NaOH } 2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ou $\text{HCl } 2,7 \text{ mol.L}^{-1}$. As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente e, aumentadas gradualmente de forma a se manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 30 % em relação à saturação com ar atmosférico.



Figura 2.1 Biorreator Bioflo 110 utilizados nos experimentos.

2.1.4 Determinações analíticas

2.1.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa das amostras coletadas foi avaliada em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para estar dentro do intervalo da calibração efetuada. A medida da concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de

cultura, 2 mL. O meio de cultura foi pesado em tubos *ependorf* de 2 mL cada, previamente secos e pesados, a 14000 rpm, e o precipitado foi ressuspensão com água destilada e centrifugado duas vezes para lavagem, seguido de secagem em estufa a 90 °C por 24 h. A amostragem foi realizada em triplicata.

2.1.4.2 Concentração de açúcar

A determinação de açúcar foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores totais.

2.1.4.3 Nitrogênio residual

A concentração de nitrogênio residual foi determinada pelo *kit* Uréia-ES (Analisa), que determina a uréia pelo método enzimático-colorimérico. A uréia, através da ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal, que é determinado por colorimetria.

2.1.4.4 Determinação do P(3HB)

A determinação da concentração de P(3HB) foi realizada através de cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Brandl et al., (1988).

Um volume de 2 mL de meio de cultivo foi centrifugado a 4000 rpm e as células foram lavadas duas vezes com água destilada sendo congeladas para serem utilizadas na metanólise. Após descongelamento, as células foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_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 °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. Após, adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 segundos para formação de duas fases. Com uma pipeta *Pasteur*, a fase orgânica (inferior) (clorofórmio + P(3HB)) foi retirada e colocada em *ependorfs* para análise em cromatografia gasosa (CG).

Para a elaboração da curva de P(3HB), o polímero puro (P(3HB) da Sigma) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,002 e 0,0286 g, e submetido à metanólise conforme descrito por Brandl et al., (1988).

Cromatografia Gasosa

A coluna utilizada para a determinação de P(3HB) foi de sílica fundida (\varnothing 0,53mm X 30m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo usado foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo constante de 30 mL/min⁻¹ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 200 °C, 230 °C e 120 °C. A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software Clarity Lite* (DataApex®).

2.1.5 Tratamento de dados

2.1.5.1 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelo programa *Lissage*, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribe Larrea.

2.2 Extração e purificação

2.2.1 Extração de P(3HB) usando clorofórmio

Segundo a metodologia desenvolvida por Dalcanton (2006), parte-se de 2 g de biomassa adicionando-se 100 mL de clorofórmio a uma temperatura de 60 °C, sob agitação em agitador magnético, durante 2 h. Posteriormente, os resíduos celulares foram separados por centrifugação (3000 g) durante 15 min.. O polímero foi recuperado por evaporação do solvente e formação de um filme de P(3HB).

2.2.2 Extração de P(3HB) a partir de 1,2-carbonato de propileno

O solvente utilizado para a extração de P(3HB) foi o 1,2-carbonato de propileno ($C_4H_6O_3$) (da Merck Schuchardt OHG' - pureza > 99%).

Para a extração do polímero foi utilizado o método baseado na Patente US 4140741 (Lafferty e Heinsle, 1979) e Fiorese (2008), com modificações. A Figura 2.2 apresenta um fluxograma das etapas de extração realizadas.

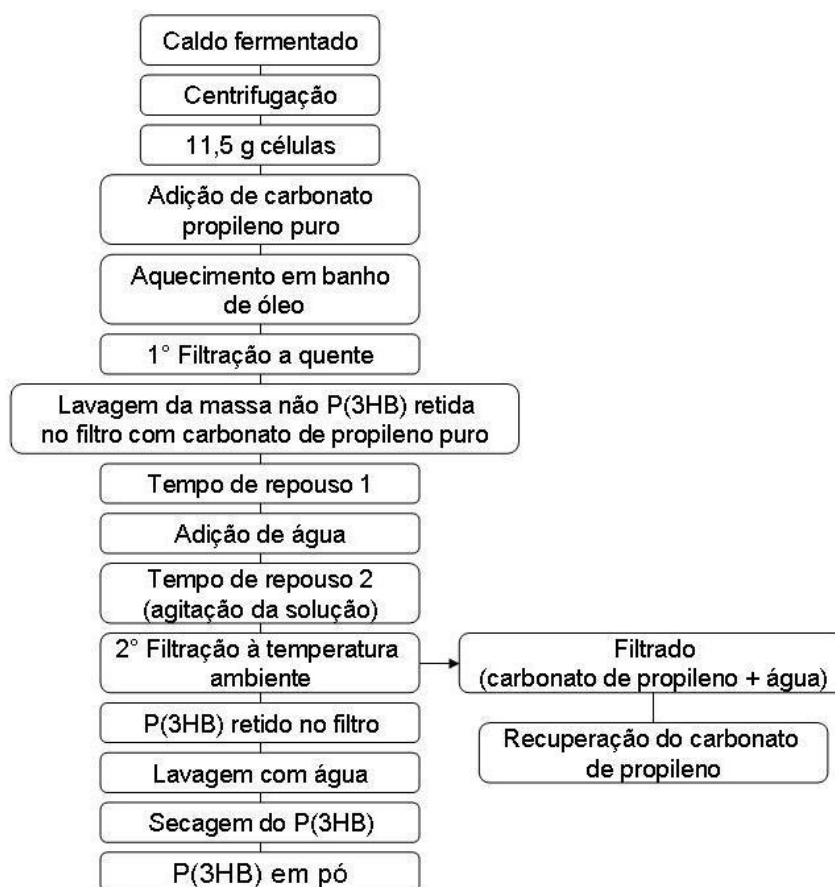


Figura 2.2 Fluxograma do processo de extração com 1,2-carbonato de propileno.

De acordo com a Figura 2.2, observa-se que, inicialmente foram pesadas 11,5 g de células secas, em seguida, foram ressuspensas em um volume (variável x_5) de 1,2-carbonato de propileno puro (Merck) aquecido até as temperaturas de teste (variável x_2). O tempo de extração (variável x_1) iniciou a partir do momento em que se atingiu a temperatura de teste. Os testes foram realizados em rota- evaporador sob agitação constante (Figura 2.3).



Figura 2.3 Equipamento (rotaevaporador) utilizado para os testes com o solvente 1,2-carbonato de propileno para a extração de P(3HB).

A mistura (1,2-carbonato de propileno + P(3HB)), obtida após o tempo de extração, foi submetida à filtração a quente utilizando filtro qualitativo. A massa não-P(3HB) retida no filtro foi lavada com 30 mL de 1,2-carbonato de propileno aquecido na mesma temperatura da extração. O filtrado ficou em repouso por um determinado tempo (variável x_3), à temperatura ambiente, para que houvesse a precipitação de todas as cadeias poliméricas (Figura 2.4).



Figura 2.4 Filtrado contendo 1,2-carbonato de propileno + P(3HB).

Após o tempo de repouso, foi adicionado água destilada em uma relação 4:1 água:solvente à solução contendo o polímero e 1,2-carbonato de propileno. A solução permaneceu sob agitação por um determinado tempo (variável x_4) em agitador magnético. Decorrido o tempo de agitação, a suspensão foi submetida a uma segunda filtração à temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro

foi lavado com 300 mL de água destilada e o filtro contendo a massa polimérica disposto em estufa a 65 °C por 24 h, para secagem.

Buscando encontrar as melhores condições de pureza e recuperação para o método de extração proposto, utilizou-se um delineamento experimental Plackett & Burman (Rodrigues e lemma, 2005) de 12 ensaios + 3 pontos centrais (Tabela 2.1) para o estudo das melhores condições de extração do P(3HB).

A influência das cinco variáveis na porcentagem de pureza e na porcentagem de recuperação do polímero foi investigada. Cada variável independente foi testada nos níveis, maior (+), menor (-) e ponto central (0), como mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 Delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios + 3 pontos centrais para o estudo da extração do P(3HB) usando 1,2-carbonato de propileno.

Ensaio	x₁	x₂	x₃	x₄	x₅
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

Tabela 2.2 Níveis das variáveis utilizadas no delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios (PB12) e triplicata do ponto central para o estudo da extração do P(3HB).

Variável	código	-1	0	+1
Tempo de contato (min.)	x_1	15	30	45
Temperatura de aquecimento (°C)	x_2	110	130	150
Tempo de repouso 1 (h)	x_3	12	18	24
Tempo de repouso 2 (h)	x_4	12	18	24
Vol. Solvente/Massa celular (mL/g)	x_5	25/11,5	50/11,5	75/11,5

2.3 Estudos preliminares

2.3.1 Efeito do tempo de contato e da temperatura de aquecimento do solvente na extração de P(3HB)

Os testes preliminares sobre o efeito do tempo de contato e da temperatura do solvente na extração de P(3HB) foram realizados segundo metodologia baseada em Fiorese (2008) e na Patente US 4140741. A biomassa utilizada nestes testes apresentava 68 % de P(3HB).

Inicialmente, pesou-se 11,5 g de células secas que foram suspensas em 25 mL de 1,2-carbonato de propileno (MERCK) aquecido nas temperaturas de 100 °C e 130 °C. Os tempos de contato do solvente com a célula utilizados nos testes foram de 15, 30, 37 e 45 min. Decorrido o tempo de contato, a mistura (1,2-carbonato de propileno + P(3HB)) obtida foi submetida à filtração a quente. A massa não-P(3HB) retida no filtro foi lavada com 40 mL de 1,2-carbonato de propileno a 100 °C. O filtrado ficou em repouso durante 24 h. Após esse tempo, adicionou-se 180 mL de água destilada à solução contendo P(3HB) e 1,2-carbonato de propileno. Em seguida, a solução permaneceu sob agitação em agitador magnético durante 24 h. Decorrido esse período, submeteu-se a suspensão a uma segunda filtração à temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro foi lavado com 150 mL

de água destilada. O filtro contendo P(3HB) foi seco em estufa a 65 °C por 24 h para obtenção do polímero em pó.

2.3.2 Estudo de diferentes pré-tratamentos para a biomassa celular ao final do cultivo

Antes da realização do planejamento experimental, foi realizado um estudo do melhor pré-tratamento a ser aplicado na biomassa, de forma a promover a desestabilização da parede celular e, com isto, melhorar a extração do polímero (FIORESE, 2008).

As extrações com as condições de pré-tratamento foram testadas com as cinco variáveis na condição do ponto central do delineamento PB (Item 2.2.2). Estas extrações foram realizadas com as células secas e úmidas.

Ao final do cultivo, o procedimento padrão (sem pré-tratamento), chamado de P, consistiu na recuperação da biomassa por centrifugação do caldo de cultura (4000 rpm, 15 min), sendo o precipitado lavado duas vezes com água destilada e congelado.

Dois diferentes pré-tratamentos foram testados. O primeiro pré-tratamento, chamado de T, envolveu a elevação da temperatura do meio de cultivo para 95 °C por 45 min. Este tratamento, segundo Kapritchkoff (2000), tem a função de desnaturar o material genético e desestabilizar a membrana externa. Após o término deste tempo, o meio de cultivo foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 min., sendo o precipitado, lavado duas vezes com água destilada e congelado.

O segundo pré-tratamento, chamado de (pH+T), envolveu variações no pH e na temperatura. O pH do meio foi elevado para 9, com a adição de hidróxido de amônio 1 M. O meio de cultivo foi, então, aquecido até 60 °C, permanecendo a esta temperatura por 5 min.. Decorrido este tempo, o pH do meio foi diminuído para 4 com a adição de ácido clorídrico 1 M, sendo a solução deixada em repouso, para a decantação das células. Duas fases distintas foram formadas, a fase líquida, livre de material celular, foi retirada com o auxílio de uma pipeta e descartada. A outra fase, contendo certa quantidade de líquido e material celular foi centrifugada a 4.000 rpm por 15 min.. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado (FIORESE, 2008).

Para os ensaios de extração com células úmidas, o caldo fermentado foi centrifugado e lavado com água destilada. Quando as extrações foram realizadas com células secas, o caldo fermentado foi centrifugado, lavado com água destilada e as células submetidas à secagem em estufa a 100 °C por 24 h.

Na Figura 2.5 é apresentado o fluxograma das etapas dos diferentes pré-tratamentos da biomassa celular.

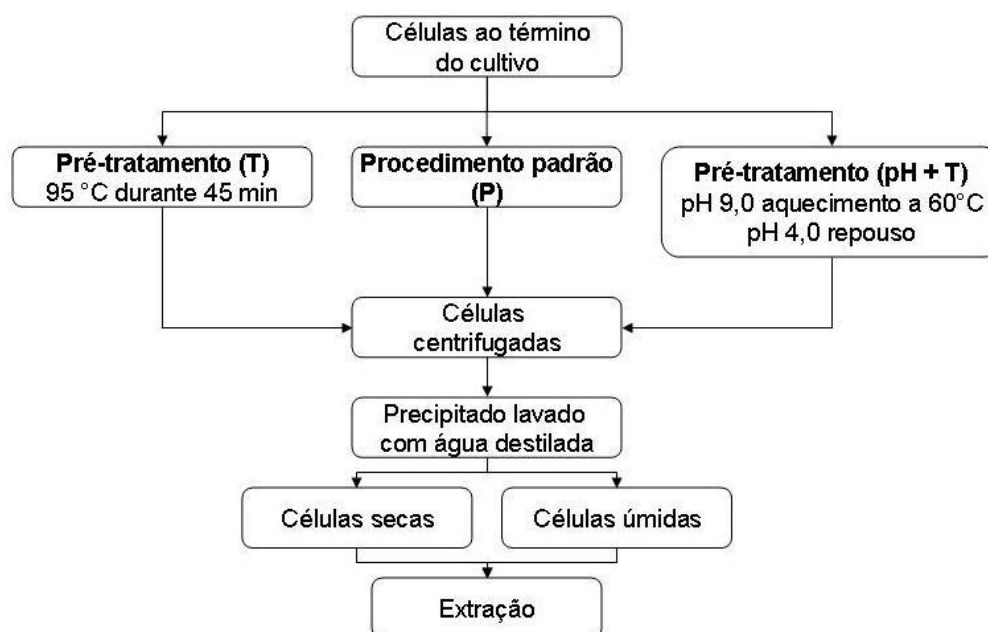


Figura 2.5 Fluxograma dos pré-tratamentos da biomassa.

2.4 Determinação de pureza e recuperação de P(3HB)

O P(3HB) foi determinado por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Brandl et al. (1988). Para a determinação da pureza do P(3HB) extraído, utilizou-se a equação (1).

$$pureza = \frac{m_{P(3HB)}}{m_{pó}} \quad (1)$$

onde: $m_{P(3HB)}$ é a massa de P(3HB) detectada por cromatografia (g) e $m_{pó}$ é a massa total de biopolímero em pó utilizada para a análise cromatográfica (g).

A partir da pureza conhecida do P(3HB) extraído, foi possível determinar a recuperação por meio da equação (2).

$$\text{recuperação} = \frac{m_p}{m_i} \quad (2)$$

Sendo $m_p = m_f \cdot \text{pureza}$ (3)

onde: m_p é a massa de P(3HB) puro após o processo de extração, ou seja, é a massa de pó obtida após extração (m_i), vezes sua respectiva pureza (equação 3).

Sendo $m_i = m_t \cdot P_{P(3HB)}$ (4)

onde: m_i é a massa total de células utilizadas para a extração (m_t) vezes a porcentagem de polímero obtida durante o cultivo ($P_{P(3HB)}$)(equação 4).

2.5 Recuperação do 1,2-carbonato de propileno

Após a segunda filtração no processo de extração de P(3HB), obteve-se uma mistura de 1,2-carbonato de propileno, água e outros componentes solúveis. Visando obter uma maior porcentagem de recuperação de solvente e permitir a reutilização do mesmo, efetuaram-se dois testes de recuperação em evaporador rotativo (rotaevaporador), conforme descrito abaixo.

- O balão do rotaevaporador contendo 1,2-carbonato de propileno misturado com água foi colocado no banho a 120 °C equipado com um condensador para que a vaporização da água ocorresse, restando somente o solvente, 1,2-carbonato de propileno no balão.
- O balão do rotaevaporador contendo 1,2-carbonato de propileno com água foi colocado no banho a 90 °C e, em seguida, submetido a vácuo utilizando uma bomba a vácuo. Para que houvesse a separação da água do solvente, no final a água evaporou e no balão permaneceu somente 1,2-carbonato de propileno.

Para a determinação da porcentagem de recuperação do 1,2-carbonato de propileno, utilizou-se a equação (5).

$$R_s = \left(\frac{V_r}{V_i} \right) \quad (5)$$

onde: R_s – recuperação do solvente, V_i - Volume de 1,2-carbonato de propileno utilizado na extração e V_r –Volume de 1,2-carbonato de propileno recuperado.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese e extração de P(3HB) por *C. necator*

3.1.1 Cultivo de *Cupriavidus necator* em biorreator visando a produção de P(3HB)

Foram realizados quatro ensaios para obtenção de P(3HB) produzido por *C. necator*, utilizando glicose/frutose como substrato.

A estratégia utilizada para os 4 cultivos foi batelada alimentada, tendo como nutriente limitante o nitrogênio adicionado na forma de uréia. As fontes de nitrogênio e de carbono foram adicionadas de forma a se evitar a limitação destes nutrientes na fase de crescimento celular, baseando-se nos fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}=0,5 \text{ g.g}^{-1}$) e nitrogênio em célula ($Y_{X/N}=8 \text{ g.g}^{-1}$).

O cultivo foi iniciado com 40 g.L^{-1} de glicose/frutose (S) em um volume inicial de 3 L no biorreator. A fase de crescimento se caracterizou pela produção de cerca de 20 g.L^{-1} de células. Na fase de produção, ocorreu limitação da fonte de nitrogênio e realização de pulsos de glicose/frutose (batelada alimentada) para manter a concentração desses substratos em 15 g.L^{-1} .

Na Figura 3.1 são apresentados os resultados de concentração de biomassa total (X_t), biomassa residual (X_R), poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)), nitrogênio (N) e substrato (S) de um dos quatro cultivos realizados. Os outros três cultivos apresentaram o mesmo comportamento.

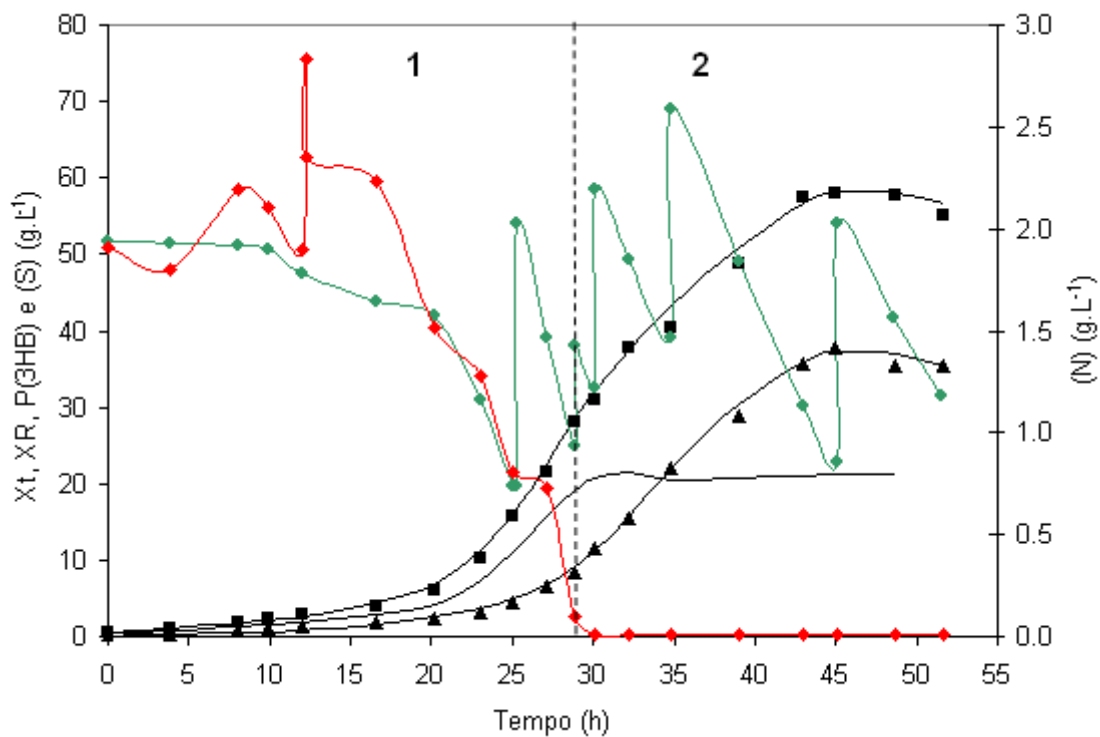


Figura 3.1 Evolução da biomassa total X_t (■), biomassa residual X_R (linha), poli(3-hidroxi-butarato) P(3HB) (▲), nitrogênio (N) (♦) e substrato (S) (●) durante o cultivo. A linha pontilhada representa o momento da limitação de nitrogênio e as linhas contínuas representam o ajuste pelo *software Lissage*.

Nesta Figura 3.1, observam-se duas fases bem características: a fase (1) de crescimento celular e a fase (2) de produção de biopolímero. Durante a fase de crescimento, (processo em batelada), biomassa total (X_t) e biomassa residual (X_R) aumentaram exponencialmente. No final desta fase, as células apresentavam cerca de 30 % de P(3HB). Esse fato indicou que concentrações de nitrogênio entre 1-2 $g.L^{-1}$ já permite o acúmulo intracelular de polímero na fase de crescimento.

Na segunda fase, que ocorreu após a limitação de nitrogênio abaixo de 0,4 $g.L^{-1}$ (linha pontilhada da Figura 3.1) com aproximadamente 29 horas de cultivo, a produção de P(3HB) foi acentuada, alcançando um acúmulo total de 64 % de biopolímero no interior das células após 23 h. Nesta fase, a variação da biomassa residual foi quase inexistente. A curva de concentração de substrato mostra os pontos em que foram realizadas as alimentações em açúcar (solução com 500 $g.L^{-1}$), de forma que a concentração de substrato no biorreator, na fase de produção, não fosse inferior a 15 $g.L^{-1}$.

Após o cultivo de 52 h, a produção de P(3HB) alcançou 140,0 g e a suspensão contendo 218,7 g de células, foi utilizada para o estudo da utilização de pré-tratamento da biomassa celular (item 3.1.2.2).

3.1.2 Estudos preliminares

3.1.2.1 Efeito do tempo de contato e da temperatura de aquecimento do solvente na extração de P(3HB)

As porcentagens de pureza e recuperação do P(3HB) extraído com 1,2-carbonato de propileno nos tempos e nas temperaturas de estudo são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Resultados de porcentagem de pureza e de recuperação do polímero nos diferentes tempos de contato e temperaturas do solvente.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pureza (%)	Recuperação (%)
130	45	53	49
130	37	65	54
130	30	75	64
130	15	60	62
100	45	57	0,5
100	37	86	0,3
100	30	72	0,5
100	15	81	0,4

Analisando-se a Tabela 3.1, observa-se que a condição temperatura/tempo que apresentou a maior porcentagem de recuperação foi a temperatura de 130 °C/30 min. No teste a 100 °C por 37 min., obteve-se o maior índice de pureza chegando a 86 %, entretanto, a porcentagem de recuperação foi muito baixa (0,3 %). Segundo a Patente US 4140741, valores de temperatura variando entre 100-120 °C e tempos curtos de extração promovem uma recuperação incompleta de P(3HB), o que se pode confirmar pelos resultados obtidos nestes testes. Fiorese (2008), utilizando 1,2-carbonato de propileno na condição de 130 °C/30 min., obteve 95 % de recuperação e 84 % de pureza para o P(3HB). No entanto, o volume de 1,2-carbonato de propileno era 6 vezes superior ao utilizado no presente trabalho. Lafferty e Heinzle

(1979) obtiveram uma recuperação de 40 % de P(3HB) produzido por *Hydrogenomonas eutropha* H-16 utilizando como solvente o 1,2-carbonato de propileno, à temperatura de extração de 110 °C, mas a pureza do polímero não foi avaliada.

Kapritchkoff et al. (2006) estudaram a recuperação e purificação de P(3HB) com enzimas e obtiveram uma pureza de 62,2 % com uma porcentagem de recuperação de 90 %. Garcia (2006) desenvolveu um método mecânico (moinho de bolas) de extração de P(3HB), onde o polímero foi recuperado com uma pureza de 90,42 %.

Chen et al. (1999) desenvolveram um processo de recuperação de P(3HB) que envolve o uso de solução de surfactante-quelante e obtiveram uma recuperação de 93,3% com uma pureza de 98,7 %. Utilizando diferentes métodos de extração de P(3HB), os autores citados encontraram valores superiores de porcentagem de recuperação e de porcentagem de pureza para o polímero que os obtidos no presente estudo, que foram pureza de 75 % e recuperação de 64 % para a temperatura de 130 °C por 30 min.

As porcentagens de pureza obtidas são inferiores às esperadas. Este resultado pode ser devido ao fato de que o P(3HB) obtido no presente estudo apresentou uma coloração amarelada, característica da presença de 1,2-carbonato de propileno. Uma das hipóteses levantadas para aumentar a porcentagem de pureza é o aumento do volume de água utilizado para lavar o P(3HB), com a finalidade de remover completamente o 1,2-carbonato de propileno do polímero, aumentando assim, a porcentagem de pureza do polímero.

McChalicher et al. (2009) investigaram a solubilidade de P(3HB) da Biopol[®] em 1,2-carbonato de propileno em temperaturas variando de 100 a 150 °C e verificaram que, à temperatura de 100 °C, não ocorreu dissolução do P(3HB). Esses autores concluíram que são necessárias temperaturas superiores a 125 °C para dissolver o P(3HB). No presente trabalho observou-se que a 100 °C ocorreu dissolução do P(3HB), porém, as porcentagens de recuperação de P(3HB) foram muito baixas.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3.1, a temperatura de 100 °C, na extração de P(3HB), não foi utilizada na continuação deste estudo. Já a temperatura de aquecimento de 130 °C e tempo de contato solvente/célula de 30 min. foram utilizados no estudo da seleção das variáveis significativas na extração de P(3HB), pois evidenciou melhores resultados de recuperação e pureza.

Visando aumentar a porcentagem de pureza do polímero, o volume de água utilizado na etapa final da extração foi aumentado em 100 %.

3.1.2.2 Escolha do pré-tratamento aplicado à biomassa celular

Trabalhos da literatura indicam a utilização de tratamentos da biomassa anteriores ao processo de extração para promover a desestabilização da parede celular e, com isto, melhorar a extração do polímero (FIORESE et al., 2009; KAPRITCHKOFF et al., 2000; KAPRITCHKOFF et al., 2006; TAMER et al., 1998). Para o estudo da aplicação de diferentes pré-tratamentos da biomassa foram utilizadas células de um mesmo cultivo contendo 64 % de P(3HB).

Devido à sua natureza intracelular é necessário romper as células, a fim de facilitar a liberação de P(3HB) (JACQUEL et al., 2008). O pré-tratamento da biomassa é destinado a facilitar a ação do solvente no processo de extração, melhorando a pureza e recuperação do polímero (FIORESE et al., 2009). Pré-tratamentos da biomassa são propostos na literatura, dentre eles: o tratamento ácido e/ou alcalino, o tratamento térmico, o tratamento com sal e o tratamento de congelamento (FIORESE et al., 2009; KAPRITCHKOFF et al., 2000; TAMER et al., 1998; DONG e SUN, 2000).

O tratamento térmico preliminar tem um impacto sobre as células, pois desnatura o material genético e as proteínas, desestabilizando a membrana externa (JACQUEL et al., 2008; KAPRITCHKOFF et al., 2006). Desta forma, alguns autores visando definir uma estratégia adequada de rompimento da parede celular para a liberação do P(3HB), realizaram estudos sobre o uso de tratamento térmico nas células ao final do cultivo, utilizando temperaturas entre 60 e 95 °C durante 5 a 45 min. (KAPRITCHKOFF et al., 2006; FIORESE et al., 2008; KAPRITCHKOFF et al., 2000).

A utilização de tratamento ácido/alcalino juntamente com tratamento térmico foi estudada como processos de floculação da biomassa e hidrólise da célula (KATAYAMA e TABETA, 1978; FIORESE, 2008). Esses tratamentos envolveram elevação do pH na faixa de 7 a 9 e aquecimento entre 50 a 115 °C, seguido da redução do pH para 1,2 a 5.

Neste trabalho, dois diferentes pré-tratamentos foram testados de acordo com o fluxograma (Figura 2.5) apresentado em materiais e métodos. O procedimento

padrão (P) consiste na recuperação da biomassa por centrifugação do caldo de cultura, seguido de lavagem com água destilada (sem pré-tratamento). Os pré-tratamentos da biomassa foram: tratamento térmico do caldo de cultura (T) a 95 °C durante 45 min., e tratamento com combinação do aumento de temperatura para 60 °C e variação de pH (elevação do pH para 9, seguido da diminuição para 4) (pH+T).

A biomassa tratada foi concentrada por centrifugação e lavada com água destilada. Os dois pré-tratamentos (T e (pH+T)) e o procedimento padrão (P) foram testados em células úmidas e secas.

As amostras de biomassa obtidas com cada um dos pré-tratamentos e com o padrão foram submetidas ao processo de extração de P(3HB) utilizando 1,2-carbonato de propileno nas condições 130 °C e 30 min. Esta é a melhor condição da Tabela 3.1, seguido por precipitação do polímero, durante o tempo de 36 h.

Os resultados de recuperação e pureza obtidos para os dois pré-tratamentos da biomassa e para o procedimento padrão, em células secas e úmidas, são apresentados nas Figuras 3.2 e 3.3, respectivamente.

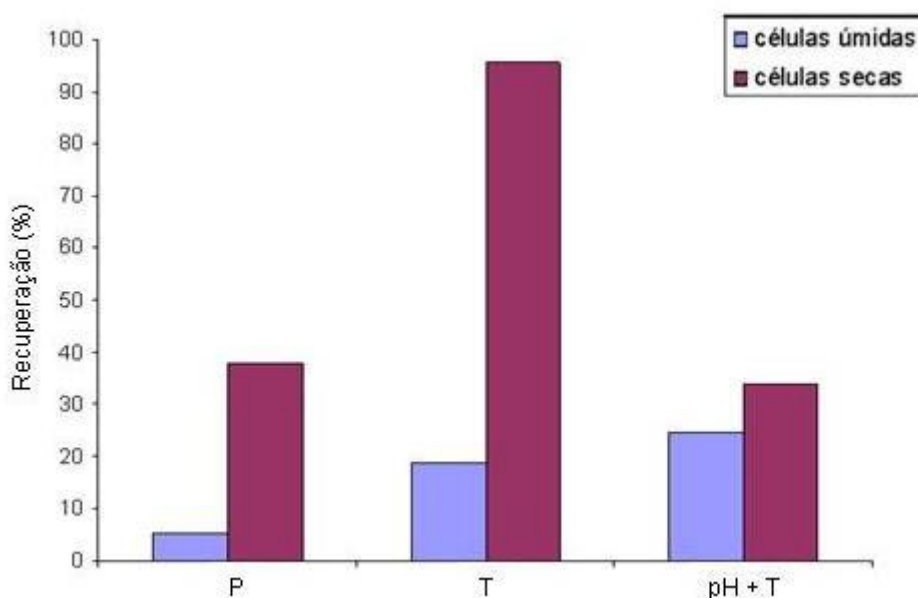


Figura 3.2 Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130°C/30 min., valores expressos em porcentagem de recuperação de P(3HB) de P(3HB). Onde: P – procedimento padrão, T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.

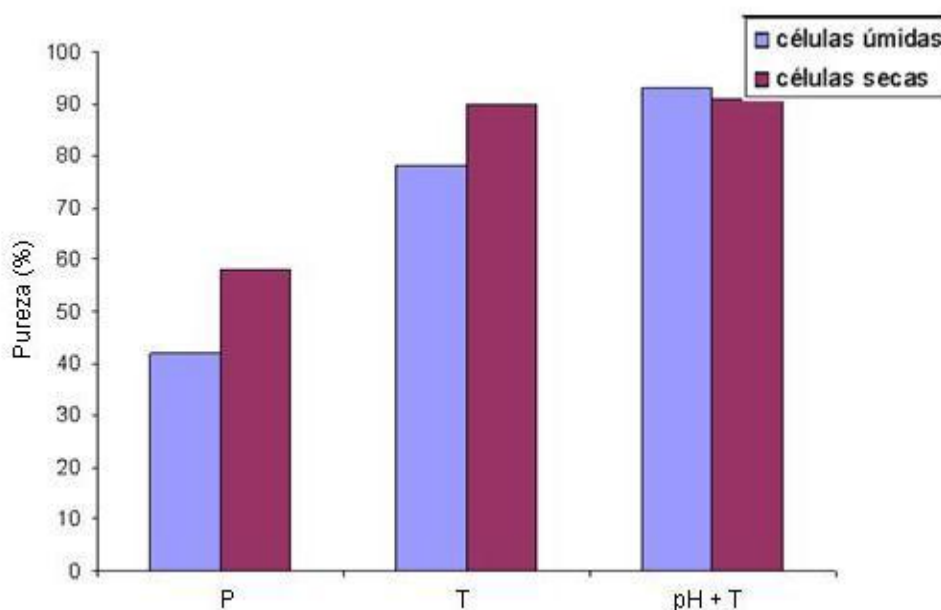


Figura 3.3 Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130 °C/30 min., valores expressos em porcentagem de pureza do polímero recuperado. Onde: P – procedimento padrão, T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.

Em termos de porcentagem de pureza, o melhor pré-tratamento da biomassa foi o “pH + T” utilizando células úmidas chegando a um aumento de 51 % de pureza, quando comparado ao procedimento padrão, sem tratamento. O mesmo não foi observado para a porcentagem de recuperação do polímero extraído, pois para qualquer um dos tratamentos estudados, os melhores resultados encontrados foram quando se utilizaram células secas.

Com relação à porcentagem de recuperação do polímero, nota-se que, com a introdução dos fatores pH e temperatura (tratamento (pH +T)) nas células úmidas e secas frente ao procedimento normal, não houve um rendimento de extração satisfatório, chegando no máximo de 24,5 % de recuperação para células úmidas frente ao procedimento padrão com 5,2 % de rendimento. O pré-tratamento “pH+T” não se mostrou eficiente na recuperação de P(3HB).

Segundo Fiorese et al. (2009), pré-tratamentos de pH envolvendo a utilização de grandes quantidades de produtos químicos (ácidos e bases), não são vantajosos, tendo em vista o custo do processo de recuperação e as questões ambientais.

A baixa porcentagem de extração quando se utilizou células úmidas se deve, muito provavelmente, a perdas no processo de extração. Quando as células úmidas entraram em contato com o solvente, na temperatura de extração de 130 °C, formou-se uma suspensão muito densa que ficou aderida à parede do balão, como pode ser

observado na Figura 3.4, levando a uma perda de material, com conseqüente diminuição da porcentagem de recuperação de P(3HB).



Figura 3.4 P(3HB) e resíduos celulares aderidos à parede do balão volumétrico, após o processo de extração com 1,2-carbonato de propileno, utilizando-se células úmidas.

Observando os resultados apresentados nas Figuras 3.2 e 3.3, nota-se que o pré-tratamento “T” em células secas foi o que apresentou os melhores valores em relação ao índice de recuperação (95,8 %) e pureza (90 %), frente aos demais pré-tratamentos testados. Os valores obtidos são superiores aos apresentados por Fiorese (2008) que também utilizou 1,2-carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB) de células úmidas, pré-tratadas com uma temperatura de 60 °C durante 5 min. O polímero obtido apresentou pureza de 83 % e recuperação de 93,6 %. Uma possível explicação para este fato é que o pré-tratamento térmico provocaria uma desestabilização da parede celular da bactéria, possibilitando assim a obtenção de uma maior quantidade de polímero extraído. Sendo assim, este pré-tratamento foi utilizado nos experimentos realizados para seleção das variáveis significativas no processo de extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno.

Na Figura 3.5, observa-se a comparação da quantidade de polímero obtida nos diferentes pré-tratamentos da biomassa, utilizando-se células secas.

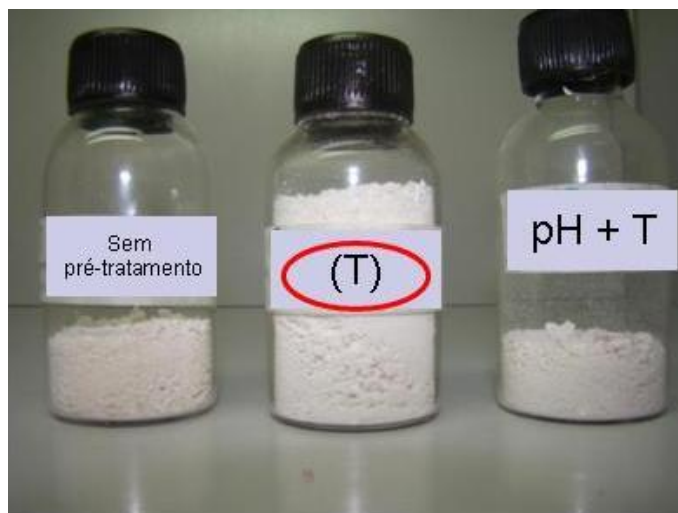


Figura 3.5 Comparação visual da quantidade de P(3HB) obtida entre os diferentes pré-tratamentos aplicados à biomassa celular, após a extração com 1,2-carbonato de propileno de células secas. Onde: T – tratamento térmico e pH + T - tratamento com combinação de temperatura e variação de pH.

3.1.3 Seleção das variáveis significativas no método de extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno

A seleção das variáveis com efeito significativo no processo de extração foi realizada através de um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB). Segundo Rodrigues e lemma (2005), esta metodologia é utilizada para uma seleção prévia das variáveis. O objetivo dos experimentos foi selecionar entre cinco variáveis testadas, as mais importantes em relação à porcentagem de pureza e de recuperação, na extração de P(3HB) a partir de *C. necator*.

Para os ensaios do delineamento PB foram utilizadas células de um mesmo cultivo com 72 % de P(3HB), pré-tratadas com o tratamento térmico de 95 °C durante 45 min., concentradas e secas. A relação volume de solvente/massa celular utilizada no planejamento PB foi de 25/11,5 mL.g⁻¹ para todos os ensaios. A porcentagem da extração foi definida como sendo o percentual de P(3HB) extraído em relação ao total de P(3HB) presente na célula, a partir da análise de uma massa conhecida de células (CHOI e LEE, 1999).

Para estes ensaios, aplicou-se um planejamento PB de 12 ensaios com 5 variáveis, com triplicata do ponto central (Tabela 3.2). Os três experimentos relativos aos pontos centrais foram realizados em diferentes momentos do planejamento (começo, meio e fim) de modo a se avaliar melhor as possíveis interferências

analíticas que podem ocorrer durante os diferentes experimentos. A repetição do ponto central permite também a determinação do erro puro e da repetibilidade do processo.

As variáveis analisadas no processo de extração de P(3HB) foram: tempo de contato solvente/célula (min.), temperatura do solvente (°C), tempo de repouso 1 (h), tempo de repouso 2 (h) e relação volume de água /volume de solvente (mL.mL⁻¹) na etapa de precipitação do polímero.

Tabela 3.2 Delineamento experimental (PB) para estudo da influência de cinco variáveis testadas na porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação de P(3HB) produzido por *C. necator*.

Ensaio	t _{contato} (min)	T _{aquec} (°C)	t _{repouso1} (h)	t _{repouso2} (h)	Vol água/ Vol. solvente (mL/ mL)	Pureza (%)	Recuperação (%)
1	45	110	24	12	50/25	79	14
2	45	150	12	24	50/25	68	49
3	15	150	24	12	150/25	84	35
4	45	110	24	24	50/25	80	21
5	45	150	12	24	150/25	60	44
6	45	150	24	12	150/25	80	51
7	15	150	24	24	50/25	82	51
8	15	110	24	24	150/25	74	20
9	15	110	12	24	150/25	59	21
10	45	110	12	12	150/25	81	9
11	15	150	12	12	50/25	75	39
12	15	110	12	12	50/25	91	9
13	30	130	18	18	100/25	73	39
14	30	130	18	18	100/25	80	41
15	30	130	18	18	100/25	75	42

Observando a Tabela 3.2, nota-se que os resultados obtidos de porcentagens de pureza do P(3HB) extraído variaram de 59 a 91 %, e as porcentagens de recuperação obtidas para o polímero ficaram entre 9 e 51 %. Com os resultados obtidos por meio do delineamento PB, verificou-se que os melhores resultados encontrados para porcentagem de recuperação (51 %) de P(3HB) foram nos experimentos 6 e 7 com temperatura de aquecimento de 150 °C. Entretanto, observa-se uma baixa porcentagem de recuperação de P(3HB) para os ensaios realizados. Este fato, pode ser devido à relação da concentração de P(3HB)/solvente ter sido muito elevada, ou seja, ao baixo volume de solvente/massa de célula (25 mL

de solvente/11,5 g de célula). Isto resultou numa alta viscosidade da solução de polímero + solvente + resíduos celulares, levando a perdas de P(3HB), no processo de extração.

Buscando melhorar as porcentagens de recuperação na extração de P(3HB) optou-se por realizar um segundo planejamento PB de 12 ensaios e 5 variáveis com triplicata do ponto central (Tabela 3.3), utilizando, como uma variáveis, a relação volume do solvente/massa celular (mL.g^{-1}).

Nos ensaios do segundo delineamento PB foram utilizadas células de um mesmo cultivo com 34,5 % de P(3HB), pré-tratadas com tratamento térmico definido no item 3.1.2.2, concentradas e secas.

As variáveis analisadas no processo de extração de P(3HB) foram: tempo de contato solvente/célula (min.), temperatura de aquecimento do solvente ($^{\circ}\text{C}$), tempo de repouso 1 (h), tempo de repouso 2 (h) e relação volume de solvente/massa celular (mL.g^{-1}). O volume de água utilizado na etapa de precipitação do polímero em relação ao volume de solvente foi de 4:1.

Tabela 3.3 Delineamento experimental (PB) para estudo da influência de cinco variáveis testadas nas porcentagens de pureza e recuperação de P(3HB) produzido por *C. necator*.

Ensaio	t_{contato} (min)	T_{aquec} ($^{\circ}\text{C}$)	t_{repouso1} (h)	t_{repouso2} (h)	Vol solvente/ Massa celular (mL.g^{-1})	Pureza (%)	Recuperação (%)
1	45	110	24	12	25/11,5	75	40
2	45	150	12	24	25/11,5	81	74
3	15	150	24	12	75/11,5	79	85
4	45	110	24	24	25/11,5	62	33
5	45	150	12	24	75/11,5	82	99
6	45	150	24	12	75/11,5	82	98
7	15	150	24	24	25/11,5	81	79
8	15	110	24	24	75/11,5	69	26
9	15	110	12	24	75/11,5	64	25
10	45	110	12	12	75/11,5	65	27
11	15	150	12	12	25/11,5	80	73
12	15	110	12	12	25/11,5	61	26
13	30	130	18	18	50/11,5	77	81
14	30	130	18	18	50/11,5	80	86
15	30	130	18	18	50/11,5	81	87

Observa-se pelos resultados obtidos para extração de P(3HB) na Tabela 3.3, que, dependendo da condição do ensaio, a pureza variou de 60 a 82 %, e a recuperação de 25 a 99 %. É relevante citar que os valores das variáveis na

condição do ponto central constituíam a condição usada no estudo do pré-tratamento da biomassa anteriormente ao estudo do delineamento PB, que resultou, em uma pureza de 90 % e uma recuperação de 96 %. Esta diferença poderia ser devido ao fato de que as células utilizadas para o estudo do pré-tratamento foram de um cultivo diferente, com diferentes porcentagens de P(3HB) do que as usadas para este delineamento experimental PB.

Fiorese et al. (2009) utilizando 1,2-carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB) na temperatura e tempo de extração de 130 °C e 30 min., obtiveram uma recuperação de 95 % e pureza de 84 %. Porém, o volume de solvente utilizado era 3 vezes maior que o utilizado na condição do ponto central do presente estudo. Hanh et al. (1994) obtiveram um grau de pureza de 97 % e uma recuperação de 91 % para extração de P(3HB) com clorofórmio e hipoclorito de sódio. Neves (2009) utilizando enzimas para extração de PHA obteve uma recuperação de 94,5 % e um polímero com 91 % de pureza. Os autores citados, utilizando diferentes métodos de extração de P(3HB) encontraram valores próximos de porcentagem de recuperação para o polímero que os obtidos nesse estudo.

De acordo com os resultados obtidos no delineamento PB (Tabela 3.3), verificou-se que duas condições de ensaios testadas para extração do P(3HB) se destacaram em termos de porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza, sendo eles: os experimentos 5 e 6. Nestes experimentos, foram utilizadas as condições de extração de 45 min. de tempo de contato solvente/biomassa, 150 °C de temperatura de aquecimento, tempos de repouso (1) e (2) entre 12 e 24h e relação volume de solvente/massa celular de 75/11,5 (mL.g⁻¹). Os experimentos 5 e 6 atingiram 82 % de pureza e recuperação de 99 e 98 %, respectivamente.

Para melhor interpretação dos resultados e determinação das variáveis que influenciam significativamente na porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação do P(3HB), na extração com 1,2-carbonato de propileno, realizou-se uma análise estatística dos resultados obtidos. As Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam os efeitos dos fatores sobre as respostas de porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação da extração de P(3HB), utilizando 1,2-carbonato de propileno como solvente.

O número entre parênteses do valor t (Tabelas 3.4 e 3.5) é igual a 8 graus de liberdade, ou seja, 15 ensaios menos 7 informações determinadas (5 efeitos + média + curvatura).

Tabela 3.4 Resultados dos efeitos das variáveis estudadas no delineamento PB 12 com triplicata do ponto central sobre a porcentagem de pureza do P(3HB) extraído com 1,2-carbonato de propileno.

	Efeito	Erro padrão	8 graus de liberdade (t)	p-valor
Média	73,42	1,11	66,27	<0,0001
Curvatura	11,83	4,95	2,39	0,0440
tcontato	2,17	2,22	0,98	0,3568
Taquec.	14,83	2,22	6,69	0,0002
Tempo repouso 1	2,50	2,22	1,13	0,2919
Tempo repouso 2	-0,50	2,22	-0,23	0,8271
Vol sol./Mcel.	0,17	2,22	0,08	0,9419

Tabela 3.5 Resultados dos efeitos das variáveis estudadas no delineamento PB 12 com triplicata do ponto central sobre a porcentagem de recuperação do P(3HB) extraído com 1,2-carbonato de propileno.

	Efeito	Erro padrão	8 graus de liberdade (t)	p-valor
Média	57,11	1,93	29,57	<0,0001
Curvatura	55,02	8,64	6,37	0,0002
tcontato	9,82	3,86	2,54	0,0345
Taquec.	54,97	3,86	14,23	<0,0001
Tempo repouso 1	6,10	3,86	1,58	0,1532
Tempo repouso 2	-2,26	3,86	-0,58	0,5752
Vol sol./Mcel.	5,96	3,86	1,54	0,1613

Na Tabela 3.4, observa-se que, das cinco variáveis testadas, somente a variável temperatura de aquecimento ($p=0,0002$) apresentou influência significativa ($p < 0,05$) na de pureza de P(3HB), no processo de extração.

Quando se analisa a influência das variáveis sobre a porcentagem de recuperação de P(3HB) (Tabela 3.5), observa-se que, das cinco variáveis estudadas, apenas duas, tempo de contato solvente/biomassa ($p=0,0345$) e temperatura de aquecimento ($p < 0,0001$), apresentaram valores de p menores que o nível de significância ($p < 0,05$), mostrando influência significativa sobre a porcentagem de recuperação no processo de extração de P(3HB).

Foram utilizados os resultados dos efeitos das variáveis estudadas no delineamento PB 12 com triplicata do ponto central considerando-se as respostas com curvatura, por apresentarem um erro padrão inferior aos obtidos com as respostas sem curvatura.

Os ensaios 1, 4, 8, 9,10 e 12, realizados à temperatura de extração de 110 °C, apresentaram pureza entre 61 e 75 % e recuperação em torno de 25 e 33 %. Estes valores são inferiores aos apresentados nos ensaios em que temperaturas mais altas foram utilizadas, confirmando que o fator temperatura de contato influencia significativamente nas respostas de pureza e recuperação de P(3HB). À temperatura de 110 °C, as extrações podem ter sido incompletas como sugerido por Lafferty e Heinzle (1979).

A temperatura de aquecimento apresentou efeito estatisticamente significativo, indicando que o aumento nos seus valores provocou o aumento no rendimento e na pureza do P(3HB) na extração. O tempo de contato do solvente com as células mostrou efeito significativo positivo para de recuperação do P(3HB), indicando que o aumento no seu valor provocou o aumento nesta porcentagem. Os tempos de repouso (1) e (2) da solução polimérica não foram estatisticamente significativos dentro da faixa estudada.

A relação volume de solvente/massa de células não foi estatisticamente significativa. Entretanto, o valor desta variável foi fixado no nível superior do planejamento (75/11,5 mL.g⁻¹) pois, em ensaios em que as células tinham um teor elevado de P(3HB), situação do primeiro planejamento experimental, o volume de solvente utilizado foi importante para garantir a dissolução do polímero.

Baseado nos resultados obtidos, para a continuação dos testes de extração, os níveis das variáveis tempo de contato solvente/célula e temperatura de aquecimento foram fixados nos níveis mais altos de 150 °C e 45 min., respectivamente. Os tempos de repouso (1) e (2), por não apresentarem efeito significativo, foram fixados no nível mais baixo de 12 h.

3.1.4 Extração de P(3HB) a partir de *C. necator* com 1,2-carbonato de propileno nas melhores condições obtidas no delineamento experimental PB e comparação com o método que utiliza clorofórmio como solvente

Após serem estabelecidas as variáveis estatisticamente significativas no processo de extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno, optou-se por explorar melhor a faixa de temperatura que apresentou melhor condição de extração. Como já haviam sido testadas as temperaturas de 130 °C (ponto central do planejamento) e 150 °C (ponto +1 no planejamento), optou-se por realizar ensaios de extração na temperatura de 140 °C e repetir os ensaios com a temperatura de 150 °C, para melhor definição deste importante parâmetro de processo. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

As células utilizadas foram as mesmas do delineamento experimental PB, com pré-tratamento térmico de 95 °C durante 45 min., secas, e com 34,5 % de P(3HB). Com estas mesmas células, também foi realizada uma extração com o método proposto por Dalcanton (2006) que utiliza clorofórmio como solvente para comparação em termos de porcentagem de recuperação do polímero obtido e porcentagem de pureza.

Na Figura 3.6 são apresentados os resultados de porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação do P(3HB) obtidos por extração com clorofórmio e com 1,2-carbonato de propileno, nas temperaturas de 140 e 150 °C, tempo de extração de 45 min., tempos de repouso (1) e (2) de 12 h cada e relação volume de solvente/massa de células 75/11,5 mL.g⁻¹.

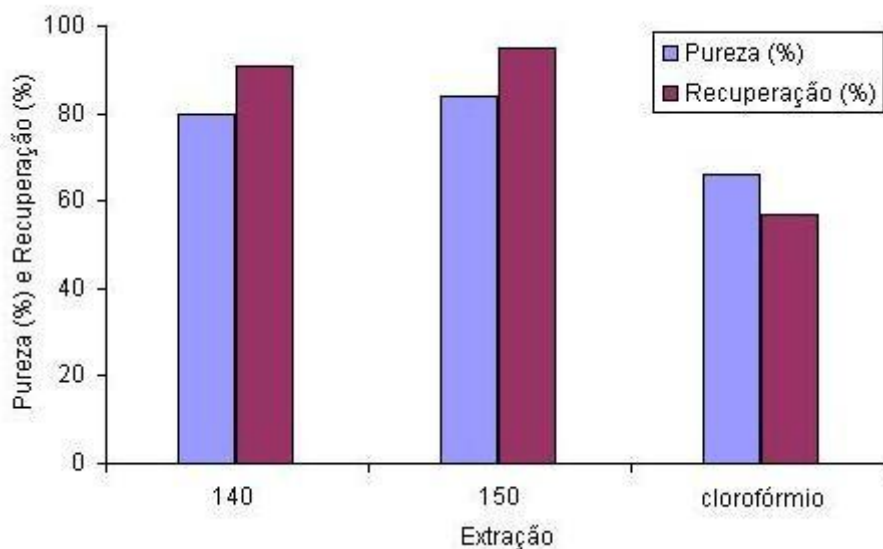


Figura 3.6 Porcentagem de recuperação e porcentagem de pureza do P(3HB) obtido por extração com clorofórmio e com 1,2-carbonato de propileno, nas temperaturas de 140 e 150 °C.

A Figura 3.5 demonstra que o P(3HB) extraído com a temperatura de 150 °C foi o que apresentou a maior porcentagem de pureza (84 %) e porcentagem de recuperação (95 %). Para a temperatura de 140 °C, os resultados de porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação foram 80 % e 91 %, respectivamente.

Na extração com clorofórmio, obtiveram-se os resultados mais baixos para porcentagens de extração de P(3HB), sendo 38 % inferior à recuperação pelo método proposto no presente trabalho, e com pureza de 66 %.

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que a extração de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno na temperatura de 150 °C apresentou as melhores porcentagens de pureza e de recuperação.

Dalcanton (2006) em seus ensaios de extração de P(3HB) de células úmidas obteve, para o método com clorofórmio aqui empregado, uma porcentagem de recuperação do polímero de 94 % e pureza de 98 %, a partir de células úmidas.

O maior rendimento na extração de P(3HB) por 1,2-carbonato de propileno encontrado por Lafferty e Heinzle (1979) de P(3HB), a partir de células secas de *Azotobacter chroococcum* DSM 377, foi de 87 %, na temperatura de 140 °C e tempo de contato de 30 min.. Porém, a pureza do polímero não foi avaliada. Esses autores utilizaram a relação volume de solvente/massa de células de 6,25 mL.g⁻¹, a qual no presente trabalho foi de 6,5 mL.g⁻¹.

Fiorese et al. (2009), utilizando 1,2-carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB), obtiveram os melhores resultados de porcentagem de pureza (84 %) e de recuperação (95 %) para o polímero na condição de 130 °C por 30 min., sendo as mesmas porcentagens encontradas no presente trabalho. Entretanto, o método desenvolvido por esses autores, utiliza o dobro do volume de solvente (150 mL) para 11,5 g de biomassa, na extração, em comparação com o presente estudo que faz uso de 75 mL de solvente para 11,5 g de biomassa. No processo de extração, nas etapas de precipitação e lavagem do P(3HB), estes autores utilizam acetona como não solvente, enquanto que neste trabalho é utilizada água.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com o método proposto por Fiorese et al., (2009), o presente estudo apresenta vantagens em relação ao volume de solvente e do não solvente (acetona) utilizados, reduzindo os custos do processo de extração com a diminuição de solvente, tornando o processo menos poluente, devido a substituição de acetona por água, e sem geração de resíduos líquidos tóxicos. Além da melhoria do ponto de vista ambiental, haverá uma diminuição do custo do processo de recuperação de P(3HB) que, segundo CHOI e LEE (1998), pode representar até 50 % dos custos de produção do polímero.

3.1.5 Influência da concentração de P(3HB) em relação ao volume de solvente nos resultados de extração

No planejamento experimental realizado, a relação volume de solvente/biomassa não foi estatisticamente significativa. Entretanto, durante a realização dos diferentes experimentos apresentados neste trabalho, observaram-se as características das soluções de solvente quando a biomassa apresentava diferentes conteúdos de P(3HB). Quando se utilizam células com grande concentração de polímero e baixos volumes de solvente, obtêm-se soluções poliméricas muito viscosas e de difícil filtração na etapa de separação dos resíduos celulares da solução contendo P(3HB). Isto leva a perdas de polímeros que ficam aderidos aos resíduos celulares reduzindo o rendimento da extração de P(3HB). Fez-se então, o estudo das propriedades da solução de P(3HB) em 1,2-carbonato de propileno.

Para o estudo das características da solução polímero + solvente + resíduos celulares foram utilizadas células com 72 %, 68 % e 34,5 % de P(3HB) dissolvidas

em diferentes volumes de 1,2-carbonato de propileno, em temperaturas de 130 e 150 °C, nos tempos de extração (tempo de contato solvente/célula) de 30 e 45 min..

Na Tabela 3.6 são apresentadas as características de filtração das soluções poliméricas (polímero + solvente + resíduos celulares) em diferentes: concentrações de P(3HB), temperaturas e tempos de contato. Considerou-se como concentração de P(3HB) a relação entre o total de P(3HB) presente na célula em uma massa conhecida de células e o volume de solvente utilizado. O que pode ser exemplificado, no caso de uma massa de células de 5 g, contendo 65 % de P(3HB), foi adicionada a 75 mL de solvente. Logo a concentração de P(3HB)/solvente será 43,3 g.L⁻¹.

Tabela 3.6 Propriedades da solução polimérica (polímero+solvente+resíduos celulares).

Ensaio	Concentração P(3HB) (g.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de contato (min.)	Propriedades da suspensão
1	304	130	45	Viscoso, mas filtrável
2	304	130	15	Viscoso, mas filtrável
3	328	130	30	Altamente viscoso e de difícil filtração
4	328	150	45	Altamente viscoso e de difícil filtração
5	328	150	15	Altamente viscoso e de difícil filtração
6	156	150	45	Viscoso, mas filtrável
7	156	150	15	Viscoso, mas filtrável
8	78	130	30	Filtrável
9	78	150	45	Filtrável
10	78	150	15	Filtrável

Por meio da Tabela 3.6, pode-se observar que a viscosidade aparente das soluções poliméricas nas mesmas temperaturas e concentrações de P(3HB) não apresentou diferença com a variação do tempo de contato (solvente + polímero).

De acordo com as propriedades das soluções poliméricas apresentadas na Tabela 3.5, para temperaturas de 130 °C e 150 °C deve-se utilizar a relação P(3HB)/solvente inferior a 300 g.L⁻¹, para evitar perdas de P(3HB) no processo de recuperação do polímero de biomassa celular.

Lafferty e Heinzle (1979) descreveram a alta solubilidade de PHAs em 1,2-carbonato de propileno em temperaturas de 120 a 150 °C. Para a temperatura de 120 °C e concentração de P(3HB) de 200 g.L⁻¹, os autores observaram que o polímero apresenta-se completamente solúvel em 1,2-carbonato de propileno, sendo filtrável a solução obtida. Quando estes autores utilizaram uma concentração de P(3HB) em 1,2-carbonato de propileno de 340 g.L⁻¹ com temperatura de 150 °C obtiveram uma solução muito viscosa e de difícil filtração.

McChalicher et al. (2009) investigaram a solubilidade máxima de P(3HB) Biopol® em 1,2-carbonato de propileno para temperaturas variando de 110 a 140 °C. Foram testadas diversas concentrações em cada temperatura, a fim de determinar a solubilidade máxima de P(3HB) no solvente. Segundo os autores, o limite aproximado de solubilidade de P(3HB) em 1,2-carbonato de propileno, à temperatura de 130 °C é de 280 g.L⁻¹ e para a temperatura de 140 °C a concentração de P(3HB), não deve ser superior a 350 g.L⁻¹.

Na Figura 3.7 estão apresentados os resultados de porcentagens de recuperação e pureza de P(3HB) a partir de *C. necator* com 1,2-carbonato de propileno, em diferentes concentrações de P(3HB) em relação ao solvente e tempos de contato, à temperatura de 150 °C. Os ensaios foram realizados nas concentrações de 328 g.L⁻¹ e 54 g.L⁻¹ de P(3HB) em solvente, na temperatura de 150 °C e nos tempos de 15 e 45 min..

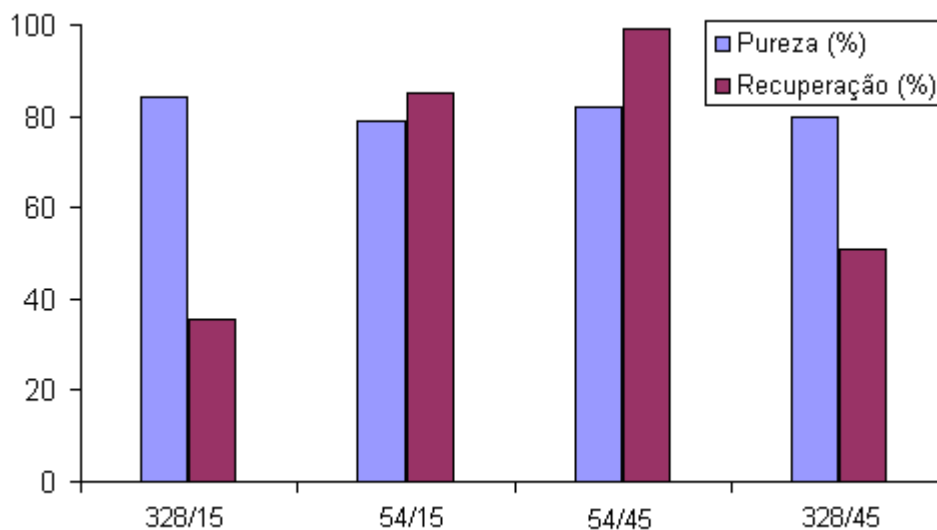


Figura 3.7 Porcentagem de rendimento e pureza do P(3HB) obtidas na extração com 1,2-carbonato de propileno, em diferentes concentrações de P(3HB) em relação ao solvente (328 e 54 g.L⁻¹) e tempos de contato (15 e 45 min.), à temperatura de 150 °C.

Nas altas concentrações de P(3HB) em solvente (328 g.L⁻¹), houve perda de polímero no processo de extração, devido à formação de uma solução polimérica muito viscosa, como demonstrado pelo baixo rendimento obtido (35 e 51 %) nos tempos de 15 e 45 min., respectivamente (Figura. 3.6). Quando a concentração de P(3HB) em 1,2-carbonato de propileno foi reduzida para 54 g.L⁻¹, as porcentagens de recuperação tiveram um aumento de 50 % para 15 min. e 48 % para 45 min. de extração. Foi possível observar que a concentração de P(3HB) no solvente não interfere nos valores de porcentagem de pureza do polímero após a extração.

Observou-se neste caso, que a concentração de P(3HB) em relação ao solvente no processo de extração é de grande importância, tendo em vista que, nas extrações com elevadas concentrações de polímero sob as mesmas condições (tempo e temperatura) em comparação com as extrações de concentrações de polímero mais baixas, ocorre uma redução na porcentagem de recuperação de P(3HB), devido a perdas de polímero na etapa de filtração pela formação de soluções poliméricas muito viscosas.

3.1.6 Recuperação do 1,2-carbonato de propileno

Após a realização do processo de extração, obteve-se o solvente 1,2-carbonato de propileno misturado à água. Foram estudados dois diferentes métodos de

recuperação do solvente, de forma a garantir a recuperação do solvente para sua reutilização no processo de extração.

Para analisar as possíveis perdas de solventes durante o processo de recuperação foram realizados testes com 1,2-carbonato de propileno puro + água, no qual, 10 mL de 1,2-carbonato de propileno puro foi misturado a 10 mL de água destilada. A mistura foi então submetida aos dois processos de recuperação do solvente descritos no item 2.6.

Na Tabela 3.7 estão apresentados os resultados de porcentagem de recuperação do 1,2-carbonato de propileno dos testes realizados com solvente puro e do solvente resultante da segunda filtração do processo de extração de P(3HB) de células de *C. necator*.

Tabela 3.7 Resultados de recuperação do 1,2-carbonato de propileno.

	% Recuperação à temperatura de 120 °C	% Recuperação à temperatura de 90 °C sob vácuo
1,2-carbonato de propileno puro + água	99	99
1,2-carbonato de propileno após extração	80	80

Pelos dados da Tabela 3.7, observa-se que os valores obtidos de recuperação do 1,2-carbonato de propileno após a extração foram os mesmos para os dois métodos de recuperação (80 %). Para os testes realizados com 1,2-carbonato de propileno puro, obteve-se uma porcentagem de recuperação de 99% para os dois métodos de recuperação propostos. Estes resultados indicam que não ocorrem perdas de 1,2-carbonato de propileno no processo de recuperação, confirmados pela elevada porcentagem de recuperação (99 %) obtida para o teste com solvente puro. Este fato deve-se ao elevado ponto de ebulição (240 °C) do 1,2-carbonato de propileno, que garante um baixo risco de perda de solvente por evaporação no processo de extração.

Os dois métodos de recuperação para o 1,2-carbonato de propileno apresentaram as mesmas porcentagens de recuperação, porém, quando se utilizou o processo de recuperação com temperatura de 120 °C sem vácuo o tempo para a recuperação do solvente foi de 4 h, já quando, utilizado o processo de recuperação com temperatura de 90 °C e vácuo, este tempo foi reduzido para 1 h. Sendo assim,

o processo de recuperação de 1,2-carbonato de propileno escolhido para o estudo foi o que envolve a temperatura de 90 °C e aplicação de vácuo.

McChalicher et al., (2009) recuperaram 1,2-carbonato de propileno, após a extração de P(3HB), a 90 °C sob vácuo, porém, não apresentaram os resultados de porcentagem de recuperação do solvente.

Com base nos resultados obtidos para recuperação de 1,2-carbonato de propileno após a extração de P(3HB) é possível notar que ocorrem perdas de cerca de 20 % de solvente durante o processo de extração.

CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo geral: estudar as melhores condições de extração, considerando as porcentagens de pureza e recuperação de P(3HB) com 1,2-carbonato de propileno a partir da cultura de *C. necator* DSM 545, propondo um método alternativo ao método de extração com 1,2-carbonato de propileno proposto por Fiorese (2008) e recuperar o 1,2-carbonato de propileno utilizado na extração de P(3HB).

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O 1,2-carbonato de propileno pode ser utilizado como solvente para extração de P(3HB) da célula de *C. necator* DSM 545. Nas extrações realizadas com a etapa de pré-tratamento térmico foi possível uma maior porcentagem de recuperação do P(3HB);
- Com as condições de temperatura de aquecimento de 150 °C, tempo de contato célula/solvente de 45 min., tempo de repouso da solução polimérica de 24 h e relação volume de solvente/massa celular de 75/11,5 (mL.g⁻¹) foram obtidas as melhores porcentagens de pureza e recuperação para a extração com o solvente 1,2-carbonato de propileno;
- A influência da quantidade de P(3HB) em relação ao solvente no processo de extração mostrou ser de grande importância para a recuperação de P(3HB) na extração;
- Quando o 1,2-carbonato de propileno, após a extração do P(3HB), foi submetido a uma temperatura de 90 °C e vácuo, obteve-se uma recuperação de 80 % do solvente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUS, J. et al. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutirate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability*. V. 91, p. 1138-1146, 2006.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*. V. 54, p. 450-472, 1990.
- ARAGÃO, G. M. F. et al. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 937-942, 1996.
- ASENJO, J. A.; SUK, J. S. Microbial conversion of methane into poly-b-hydroxybutirate (PHB): growth and intracellular product accumulation in type methanotroph. *Journal of Fermentation Technology*, v. 64, p. 271-278, 1986.
- BERGER, E. et al. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques*, v. 3, p. 227-232, 1989.
- BRANDL, H. et al. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 41, pp. 77-93, 1990.
- BRANDL, H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) 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, pp. 127-161, 1998.
- BUCCI, D. Z. *Avaliação de embalagens de PHB (poli (ácido 3- hidroxibutírico)) para alimentos*. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Produção) – 166p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech*, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CALLISTER, W. D. Jr., *Material Science and Engineering – An Introduction*, John Wiley e Sons, Inc., New York., pp 472-481, 1997.
- CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M.; LEÃO, A. L. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirate (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. *Acta Scientiarum.*, v. 24, n. 6, p. 1609-1614, 2002.
- CHEN, Y. et al. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 153-157, 1999.

- CHEN, Y. et al. Cleaner recovery of poly(3hydroxybutiric acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. *Process Biochemistry*, 36:501 – 506, 2001.
- CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. *Advanced Materials*, v. 8, p. 305-313, 1996.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym. Degrad. Stabil*, 59, p. 387–393, 1998.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 5, p. 13–21, 1999.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engeneering*, 17, p. 335-342, 1997.
- CIR. Final report on the assessment of propylene carbonate. *J Am Coll Toxicol*, 6, p. 23-51, 1987.
- COUTINHO, B. C. et al. *A Importância e as Vantagens do Polihidroxibutirato (Plástico biodegradável)*. Disponível em: <<http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/viewFile/49/53/>> p. 76-81. htm, 2004. Acesso em: 10 jan. 2010.
- DALCANTON, F. *Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos*. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- DERENZO, S. et al.. Processo de extração de biopolímeros. *Brazilian patent application* PI 9302312, 1993.
- DONG, Z.; SUN, X. A new method of recovering polyhydroxyalcanoate from *Azotobacter chroococcum*, *Chin. Sci. Bull*, 45, p. 252-255, 2000.
- DUARTE, M. A. T. et al. Estudo da Compactação a Frio de Poli (3-Hidroxibutirato)-Morfologia e Resistência à Compressão. *Revista Matéria*, v. 9, p. 386-391, 2004.
- EPA. Environmental profile for propylene carbonate, Cincinnati, OH: National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. *Environmental Protection Agency*, 1998.
- FIORESE, M. L. et al. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, V. 9, p. 454-461, 2009.
- FIORESE, M. L. *Estratégias de cultivo, recuperação e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha*. . Tese de Doutorado (Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- FORMOLO, M. C. et al. Obtenção, caracterização e biodegradação em solo de poli(3-hidroxibutirato) In: *VI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, Joinville, 2003.

FORMOLO, M. L. et al. Nova estratégia para extração de poli(3-hidroxiacetato) sintetizado por *Ralstonia eutropha*. In: *VIII Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPOL)*, Águas de Lindóia, 2005.

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

GHAFFAR, A. *Development material based on poly(3-hydroxybutyrate) PHB*. Dissertation Zur Erlangung des akademischen grades. Doctor rerum naturalium der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle, Saale. Disponível em: <<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/02H017/prom.pdf> / p. 123>, 2002. Acesso em: 5 mar. 2010.

GOMES, J. G. C., BUENO NETO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*. V.17, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J. G. C. et al. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. *Rev Microbiol* 28 (Supl. 1), p. 43-48, 1997.

GOMEZ, J. G. C., RODRIGUES, M.F.A., FONTOLAN. Detecção de clones bacterianos produtores de polihidroxialcanoatos (PHAs) através da coloração de Sudan. *Congresso Brasileiro de Microbiologia* 17. p. 1993.

HAHN, S. K. et al. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 256-261, 1994.

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid dispersion of *Ralstonia eutropha* for Poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1519-1523, 2003.

HOLMES, P. A. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physical Technology*, v. 16, p. 32-36, 1985.

HOLMES, P. A., LIM, G. B. Separation process. U. S. *Patent*, nº 4.910.14, 1990.

IPT/CEMPRE, Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado. 1 ed.: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, Publicação IPT 2163, 1995.

JACQUEL, N. et al. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, V.39, P. 15-37, 2008.

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

KAPRITCHKOFF, F. M. et al. Seleção de enzimas visando a lise da parede celular de *Ralstonia eutropha*. In: XIII- SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, Teresópolis. *Anais do XIII-SINAFERM*, 2000.

KARNIOL, T.R. *Pioneirismo brasileiro na produção de plástico biodegradável*. Disponível em: <[HTTP://www.noambiental.com.br/html/noticiasreportagem/html/reportagem/](http://www.noambiental.com.br/html/noticiasreportagem/html/reportagem/)>. Acesso em: 10 mar. 2010.

KATAYAMA, M.; TABETA, Y. US *Patent* 4 123 426, 1978. Disponível em: <<http://www.patentstorm.us/patents/4123426/fulltext.html>>. Acesso em: 8 jan. 2010.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, v. 86, p. 97-104, 2001.

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.

KIM, B. S. et al. 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.

KIM, B. S. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 27, p. 774-777, 2000.

KIM, M. et al. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology Letters*, 25, p. 55- 59, 2003.

KRUPP, L. R.; JEWELL, W. J. Biodegradability of modified plastics films in controlled biological environments. *Environmental Science Technology*, 26, p.193-198, 1992.

LAFFERTY, R. M.; HEINSLE, E. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid). US *Patent* 4,140,741, 1979.

LEE, S. Y. et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, p. 255-258, 1996.

LEE, S. Y., CHOI, J., WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 31-36, 1999.

LEE, S. Y.; LEE, Y. K.; CHANG, H. N. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 79, p. 177-180, 1995.

LUZIER, W. D. *Materials derived from biomass biodegradable materials*. Proc. Nat. Acad. Sci.USA, v. 89, p. 839-842, 1992.

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.

MANTELATTO, P. E. et al. Process for recovering polyhydroxyalkanoates ('phas') from cellular biomass. US *Patent*. 052175, 2005.

- MARANGONI, C. *Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Ralstonia eutropha Utilizando Substratos de Baixo Custo e Ácido Propiônico*. p.191. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- MCCHALICHER, C. W.J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. *American Institute of Chemical Engineers*, 2009.
- MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of micro-organisms. *Biotechnol. Advances*. 13 (3), p. 491 – 551, 1995.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959
- MORAES, M. F. V. *Produção e caracterização da blenda polimérica biodegradável poli(hidroxibutirato) [PHB]/co-poliéster alifático aromático [ecoflex] para aplicações em embalagens*. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Materiais), Universidade Federal do Ouro Preto, 2004. Disponível em: <<http://www.tede.ufop.br/tdebusca/arquivo.php?cod-Arquivo=7>>. Acesso: 15 jan. 2010.
- NEVES, A. L. P. *Uso de enzimas na extração de Polihidroxialcanoatos sintetizados por Cupriavidus necator*. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- NONATO, R. V., MANTELATTO, P. E., ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 1-5, 2001.
- POIRIER, Y. et al. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastic and elastomers, in bacteria and plants. *Nature Biotechnology*, v. 13, p. 142-150, 1995.
- 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>. Acesso em: 23 ago. 2009.
- QUENTAL, A. C. et al. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. *Química Nova*, v XY, p. 1-9, 2010.
- RAMSAY, B. A. et al. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers. *Proceedings*, p. 9-7, Austria, 1994.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. *Casa do Pão Editora*, 2005.

ROSA, D.S. et al. Avaliação da biodegradação de poli-beta-(hidroxibutirato), poli-beta-(hidroxibutirato-co-valerato) e poli(-coprolactona) em solo compostado. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 311-317, 2002.

SCHNEIDER, A. L. S. *Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato obtido por Ralstonia eutropha*. Tese de Doutorado (Engenharia Química), 220p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SHIMAO, M. *Biodegradation of plastics*. Current Opinion in Biotechnology, Japão, n.12, p. 242-247, 2001.

SHUMANN, D.; MULLER, R. A. US Patent 0186398. 2003. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2003/0186398.html>>. Acesso em: 23 mar. 2010.

SILVA, L. F. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. XY, 2007.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 99–121, 2007.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. *Química Nova*, v. 27(4), p. 615-622, 2004

STEINBUCHER, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. *Biomaterials: novel materials from biological sources*. V. New York: Stockton, p. 123-213, 1991.

STEINBÜCHER, A.; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Letter*, v. 128, p. 219-228, 1995.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUZUKI, D. V. et al. 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.

TAMER, I. M.; MOO-YOUNG, M.; CHIST, Y.; Optimization of poly(beta-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess. Eng.* v. 19, p. 459-468, 1998.

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.

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.

VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. *Pesquisa FAPESP*, outubro/2002.

VAULAUTEM, N.; GILAIN, J.; Process for separating poly-beta-hydroxybutirates from a biomass, US. *Patent* 4,310,684, 1982.

VEJA revista, edição 2071 publicada em 30 de julho de 2008. Disponível em <http://veja.abril.com.br/300708/p_130.shtml>. Acesso em: 8 jan. 2010.

VOGELSAGER N. JR. et al. Filmes de P(3HB) e PCL: Acompanhamento da Biodegradação em Solo por Propriedades Térmicas e Morfológicas. *Revista Matéria*, v. 9, n. 4, p. 370 - 377, 2004.

ZHANG, L. et al. Biodegradable Polymer Blends of Poly(3-hydroxybutirate) and Starch Acetate. *Polymer International*, 44: 104-110, 1997.

<http://www.reciclaveis.com.br/noticias/00904/0090428-eletronico.htm>. Acesso em 19/12 de 2009.

www.sobiologia.com.br. Acesso em 15/01 de 2010.

<http://www.resol.com.br/curiosidades/curiosidades2.php?id=2724>. Acesso em 15/01 de 2010.

<http://www.biocycle.com.br>. Acesso em 10/11 de 2009.

<http://www.inp.org.br/boletins/048.html>. Acesso em 12/02 de 2010.

<http://www.inovacao.unicamp.br/pipe/report/061030-phb.shtml>. Acesso em 3/03 de 2010.

http://www.abeq.org.br/Boletins/Boletim_Mar%C3%A7o_2010/Boletim%20192%20mar%C3%A7o%202010_1.htm. Acesso em 5/05 de 2010.