

EXTRAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P(3HB)), PRODUZIDO POR *Cupriavidus necator*, COM CARBONATO DE PROPILENO E ULTRASSOM

L. K. QUINES¹, M. SCHMIDT¹, K. ZANFONATO¹, F. M. MARTINHAGO¹, S. M. OLIVEIRA²,
W. SCHMIDELL¹, G. M. F. ARAGÃO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Caracterização
E-mail para contato: glaucia@enq.ufsc.br

RESUMO – Poli-hidroxiálcanoatos (PHAs) são biopolímeros sintetizados como reserva de energia por bactérias em forma de grânulos intracelulares. O P(3HB) é o mais visado no âmbito acadêmico entre os PHAs. No entanto, seu uso comercial é limitado devido às técnicas de produção e extração serem bastante dispendiosas. Logo, é imprescindível a busca por novas técnicas de produção e extração. Este trabalho associou o pré-tratamento de rompimento celular com ultrassom à extração de P(3HB), produzido por *C. necator*, utilizando carbonato de propileno. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo cinético da recuperação de P(3HB) a partir de duas biomassas: sem pré-tratamento e pré-tratada com ultrassom, com carbonato de propileno em diferentes temperaturas (130 e 150 °C) e verificar a influência do tempo de contato nos resultados de pureza, recuperação e massa molar de P(3HB). Os resultados mostraram influência do tempo de contato das células com o solvente e da temperatura de aquecimento na recuperação e na massa molar do P(3HB). Com o aumento da temperatura (130 para 150 °C) e do tempo de extração (5 para 45 min) obteve-se maior recuperação de P(3HB) e maior redução da massa molar. A recuperação de P(3HB) mais elevada foi obtida na extração de células pré-tratadas com ultrassom, a 150 °C, com tempo de 45 min, sendo esta de 92 %, frente a 82 %, sem o uso do pré-tratamento. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com ultrassom é eficaz para obter alta porcentagem de pureza e recuperação de P(3HB).

1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais plásticos biodegradáveis, encontram-se os poli-hidroxiálcanoatos (PHAs), que são polímeros acumulados como material de reserva de carbono e/ou energia, intracelularmente por vários microrganismos. Os PHAs têm recebido muita atenção devido à sua similaridade aos plásticos convencionais e sua completa biodegradabilidade (Lee, 1996). Entre os PHAs, o poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) é o biopolímero mais visado em estudos acadêmicos. No entanto, seu uso comercial é limitado devido às técnicas de produção e extração serem bastante dispendiosas (Ienczak *et al.*, 2011).

Por se tratar de um produto intracelular, o P(3HB) deve ser extraído da célula ao término do cultivo. O tratamento da biomassa, após o cultivo, para a extração do PHA acumulado, é uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar alterações nas propriedades do produto. Como os PHAs são produtos acumulados intracelularmente, no citoplasma das células bacterianas, as células precisam ser separadas do caldo cultivado (Anis *et al.*, 2013). Para simplificar a ruptura celular e aumentar a recuperação de P(3HB), uma etapa de pré-tratamento da biomassa cultivada pode ser realizada, podendo empregar produtos químicos como ácidos e bases, tratamento térmico e tratamento mecânico, como a utilização de ultrassom e homogeneizador de alta pressão (Jacquel *et al.*, 2008).

Estima-se que o impacto do custo de recuperação de P(3HB) no custo total do processo de produção possa representar mais de 40 % do valor final do produto (Silva *et al.*, 2007). A utilização de solventes tóxicos e altamente voláteis para a extração de P(3HB) (por exemplo, clorofórmio) é contraditória ao fato de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica. Com isso, o uso do solvente carbonato de propileno foi proposto na literatura por Lafferty e Heinze (1979). Além de ser de baixa toxicidade, este solvente é de fácil recuperação, podendo minimizar assim, custos de produção.

Este trabalho teve como objetivo realizar cinéticas de recuperação de P(3HB), a partir de biomassas sem pré-tratamento e pré-tratada com ultrassom, utilizando carbonato de propileno em diferentes temperaturas de aquecimento e verificar a influência do pré-tratamento e do tempo de extração nos resultados de pureza, recuperação e massa molar de P(3HB).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biomassa

A biomassa de *Cupriavidus necator* DSM 545 com P(3HB), produzido durante cultivo com glicose como fonte de carbono, foi utilizada no presente estudo. As biomassas de *C. necator* utilizadas nestes ensaios foram provenientes de cultivos diferentes e apresentavam 69 e 73 % de P(3HB), em ensaios sem pré-tratamento da biomassa e ensaios com pré-tratamento da biomassa com ultrassom, respectivamente.

2.2 Pré-tratamento da Biomassa

2.2.1 Procedimento padrão – sem pré-tratamento: Ao término do cultivo, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 2.000 g durante 15 min. O precipitado, contendo as células, foi lavado duas vezes com água destilada e submetido à secagem em estufa a 65 °C por 24 h.

2.2.2 Pré-tratamento com ultrassom: No pré-tratamento da biomassa com rompimento mecânico, o ultrassom utilizado foi o *Ultrasonic Dismembrator* 500 (400 W) fabricado pela *Fisher Scientific*.

O volume de amostra ultrassonificado foi de 35 mL. O recipiente utilizado para o aplicação do ultrassom apresentava 3 cm de diâmetro e 5 cm de altura, a fim de assegurar maior homogeneidade do sistema. Foram realizados três ciclos de aplicação do ultrassom no meio de

cultivo (tempo de aplicação de 59 segundos e pausa de 30 segundos) na amplitude de 50 %. Para a aplicação do ultrassom, os ensaios foram realizados em banho de gelo, com a finalidade de evitar o acréscimo de temperatura da biomassa. Após este pré-tratamento, a suspensão celular foi centrifugado a 2.000 g por 15 minutos, sendo as células lavadas com água destilada e centrifugadas novamente, na mesma condição. Enfim, as células foram submetidas à secagem em estufa a 65 °C durante 24 h.

2.3 Recuperação de P(3HB)

O solvente utilizado para a extração de P(3HB) foi o carbonato de propileno (Merck). Para a extração do polímero, utilizou-se o método baseado em Quines (2010). O método se baseia no uso de 0,15 g células/mL de solvente.

2.3.1 Cinética da Recuperação de P(3HB) Com Carbonato de Propileno a partir de biomassa Sem Pré-Tratamento e Pré-Tratada Com Ultrassom e avaliação da Massa Molar: As biomassas de *C. necator* utilizadas nestes ensaios foram provenientes de cultivos diferentes e apresentavam 69 e 73 % de P(3HB), em ensaios sem pré-tratamento da biomassa e ensaios com pré-tratamento da biomassa com ultrassom, respectivamente.

Estudou-se a cinética de extração de biopolímero, de biomassa pré-tratada com ultrassom, na temperatura de aquecimento das células com o solvente de 130 e 150 °C, em tempos de contato de 5, 15, 30 e 45 min. Além disso, foi realizada cinética de extração de P(3HB) de biomassa sem pré-tratamento com carbonato de propileno a 150 °C nos tempos de 5, 15, 30 e 45 min.

Para a avaliação da massa molar do P(3HB) extraído com carbonato de propileno a partir de células pré-tratadas com ultrassom, foi realizada a análise de massa molar dos polímeros extraídos a 130 e 150 °C nos tempos de 30 e 45 min. A análise da massa molar de polímeros extraídos de células sem pré-tratamento, a 150 °C nos tempos de 5, 15, 30 e 45 min, também foi realizada.

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).

2.5 Determinação da Massa Molar de P(3HB) (Mm)

As determinações de massa molar e índice de polidispersão do P(3HB) extraído neste trabalho foram realizadas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) (Laboratório de Caracterização - PUC/RS). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio P.A., concentração de 5,0mg/mL (agitação por 20 min) e analisadas em cromatógrafo da *Waters Instruments* equipado com uma bomba isocrática, modelo 1515 (eluente: PhMe, fluxo: 1mL/min), detector por índice de refração, modelo 2414; temperatura do detector: 35°C e coluna Styragel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar a influência do tempo de contato da biomassa com o solvente na pureza, recuperação e na massa molar do P(3HB), extraído de células sem pré-tratamento e pré-

tratadas com ultrassom, foram realizadas cinéticas de recuperação de P(3HB) a partir das biomassas de *C. necator*.

A Figura 1 apresenta os dados de recuperação, pureza, massa molar e índice de polidispersão dos polímeros extraídos a 130 e 150 °C para biomassa pré-tratada com ultrassom e a 150 °C para biomassa sem pré-tratamento.

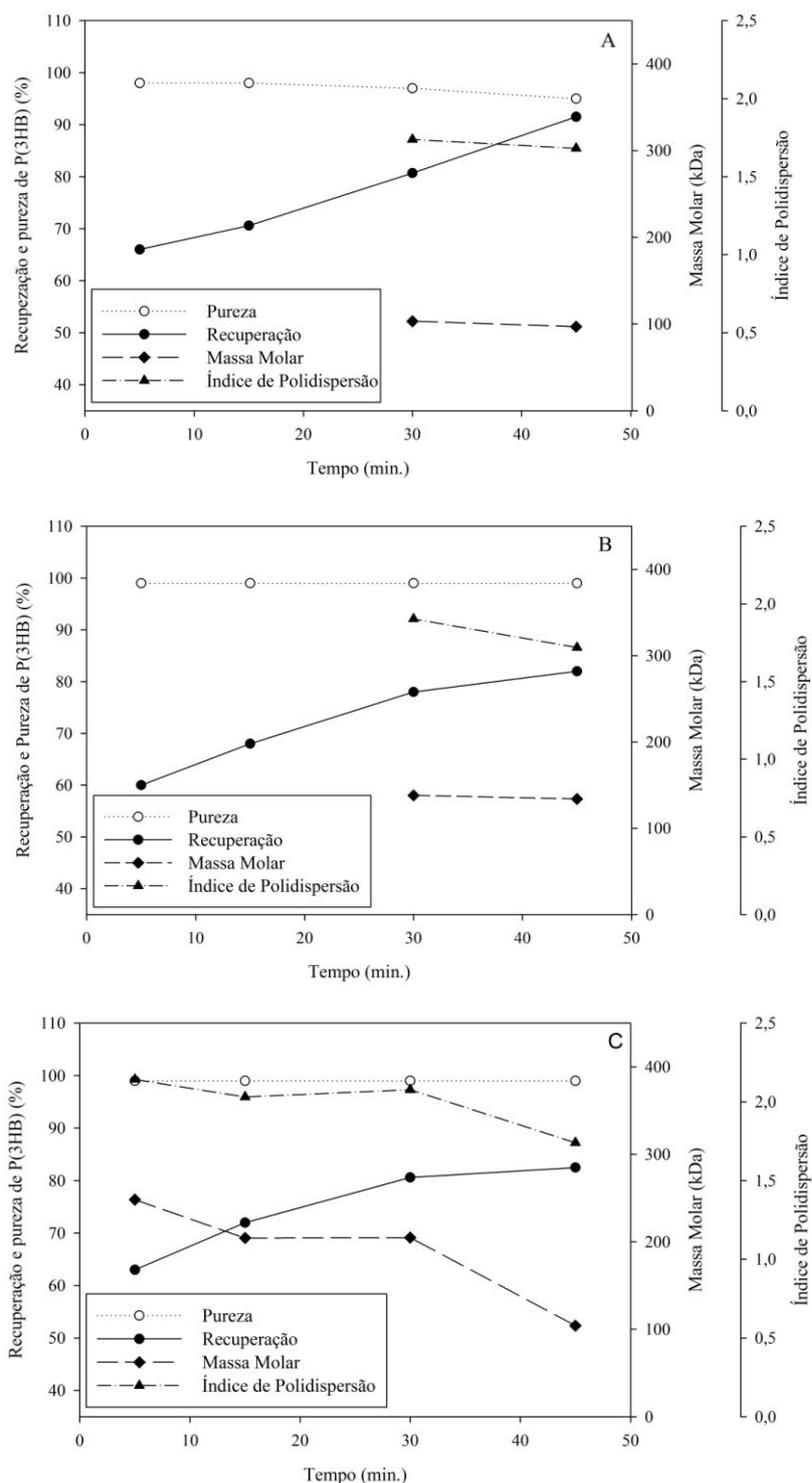


Figura 1 - Resultados de recuperação, pureza, massa molar e índice de polidispersão das extrações de P(3HB) com carbonato de propileno a partir de células de *C. necator*. Figura 1A - Cinética de recuperação a 150 °C de células pré-tratadas com ultrassom; Figura 1B - Cinética de recuperação a 130 °C de células pré-tratadas com ultrassom, Figura 1C - Cinética de recuperação a 150 °C de células sem pré-tratamento.

Ao comparar os resultados obtidos no estudo da cinética de extração provenientes de células sem pré-tratamento (Figura 1C) e pré-tratadas com ultrassom, Figura 1A (temperatura de extração de 150 °C) e Figura 1B (temperatura de extração de 130 °C), nota-se que não houve diferença entre as respostas de pureza obtidas, pois todas foram próximas a 99 %. Nem mesmo o menor tempo de contato (células/solvente) e a temperatura de extração implicaram em uma mudança relevante na pureza do biopolímero. Estes resultados de alta pureza observados na Figura 1 se devem à alta solubilidade do P(3HB) no carbonato de propileno e à facilidade de separação do polímero do solvente, através da precipitação e lavagem do polímero com água destilada de acordo com o método proposto por Quines (2010).

Através das cinéticas de extração, foi possível observar a influência do tempo de contato das células com o solvente nos resultados de recuperação de P(3HB). Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de extração maior a porcentagem de P(3HB) obtido (dentro da faixa estudada). A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) foi obtida na extração de células pré-tratadas com ultrassom, realizada a 150 °C, com tempo de 45 min, sendo esta de 92 %. A extração realizada à mesma temperatura, a partir de células sem pré-tratamento e tempo de contato de 45 min, apresentou recuperação de 82 % (m/m).

Com a utilização da temperatura de extração de 130 °C e pré-tratamento da biomassa com ultrassom, observou-se que a maior porcentagem de recuperação de P(3HB) foi obtida na extração realizada com tempo de 45 min (82 %). Este resultado, comparado à extração a 150 °C demonstra a influência da temperatura de extração nos resultados de recuperação de biopolímero. Este fato pode ser devido à menor solubilidade do polímero no solvente nessa temperatura.

Fiorese *et al.* (2009), utilizando carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB), obtiveram os melhores resultados de percentual de pureza (84 %) e de recuperação (95 %) para o polímero na condição de 130 °C por 30 min com pré-tratamento térmico da biomassa. Quines (2010) realizou extração de P(3HB) com aquecimento de 150 °C por 45 min, sem pré-tratamento da biomassa e obteve recuperação de 40 % de polímero com pureza de 60 %. Lafferty e Heinzle (1979) obtiveram recuperação, a partir de células secas de *Azotobacter chroococcum* DSM 377, de 87 %, na temperatura de 140 °C e tempo de contato de 30 min. Porém, a pureza do polímero não foi avaliada. Através dos resultados obtidos pelos autores citados é evidente a importância do pré-tratamento celular nos resultados de extração de P(3HB) para a obtenção de rendimentos de processo mais elevados e um produto com elevada pureza.

A Figura 1C apresenta a cinética de avaliação da massa molar do P(3HB) extraído com carbonato de propileno a 150 °C de células sem pré-tratamento. Pode-se observar que no intervalo entre 5 e 45 min teve-se uma redução da massa molar de 42 %. Os resultados de massa molar obtidos a partir dos estudos cinéticos confirmaram as observações feitas por Mcchalicher *et al.* (2009) e Fiorese *et al.* (2009), que observaram uma redução da massa molar de P(3HB) durante o processo de extração com carbonato de propileno. Esta degradação da massa molar do P(3HB),

neste método, deve-se à quebra das cadeias poliméricas, em função do aquecimento da mistura da suspensão celular com o solvente a temperaturas superiores a 120 °C (Lafferty e Heinzle, 1979).

Segundo Khanna e Srivastava (2005), a massa molar de P(3HB) produzido por bactérias se encontra normalmente entre $1,0 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^6$ Da, com polidispersão em torno de 2,0. Nos três estudos cinéticos realizados (Figura 1A, 1B e 1C), foi possível obter polímeros com valores de massa molar superiores a $9,6 \times 10^4$ Da e índices de polidispersão entre 1,7 e 2, que são valores inferiores ao obtido por Fiorese *et al.* (2009), que obtiveram 3,1 para o P(3HB) extraído com carbonato de propileno, sob outras condições de extração.

Na análise dos valores de massa molar das cinéticas de recuperação de P(3HB) a partir de biomassa pré-tratada com ultrassom (Figura 1A e 1B), pode-se observar que a temperatura de extração influenciou na degradação da massa molar do polímero recuperado, uma vez que, na extração a 130 °C por 30 min, o polímero obtido apresentou massa molar de $1,38 \times 10^5$ Da, enquanto um incremento na temperatura de extração (150 °C) causou uma redução na massa molar do polímero extraído para $1,03 \times 10^5$ Da.

Embora a extração de P(3HB) na temperatura de 130 °C tenha apresentado menor degradabilidade da massa molar, quando comparada à temperatura de 150 °C, esta apresentou uma porcentagem de recuperação inferior. Desta forma, é de grande interesse o desenvolvimento de um processo de extração deste polímero em que elevadas porcentagens de recuperação e pureza possam ser obtidas com a preservação da massa molar, pois esta característica é de extrema importância, uma vez que afeta diretamente a resistência mecânica do polímero, a velocidade de biodegradação e, conseqüentemente, a sua futura aplicabilidade (Montoro *et al.*, 2010).

Frente ao exposto, a extração de P(3HB) a 150 °C por 45 min, com carbonato de propileno a partir de células tratadas com ultrassom, apresentou os resultados mais elevados de percentual de recuperação e pureza e uma redução na massa molar de 27 %, em relação à massa molar do polímero extraído a 130 °C por 45 min. Por outro lado, como o conhecimento da massa molar do P(3HB), uma vez extraído, é de grande relevância para o direcionamento e adequação deste polímero para futuras aplicações.

Como mencionado anteriormente, as biomassas utilizadas nas cinéticas de recuperação são provenientes de cultivos diferentes, deste modo não se deve comparar a massa molar dos polímeros extraídos de células sem pré-tratamento com os obtidos de biomassa pré-tratada com ultrassom.

4. CONCLUSÃO

As extrações de P(3HB) a partir de biomassa pré-tratada com ultrassom utilizando carbonato de propileno apresentaram os melhores resultados de recuperação na temperatura de 150 °C, comparado a 130 °C. Porém, nesta temperatura, a degradação da massa molar do polímero foi inferior ao valor obtido para o polímero extraído a 150 °C. O tempo de contato das células com o solvente influenciou nos resultados de recuperação e de degradação da massa molar de P(3HB). Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de extração, maior a porcentagem de P(3HB) obtido (dentro da faixa estudada). A porcentagem de pureza do polímero não foi influenciada pelos diferentes tempos e temperaturas de extração realizadas, tanto com o pré-tratamento com ultrassom da biomassa, como sem pré-tratamento.

O pré-tratamento com ultrassom da biomassa mostrou-se eficaz nos resultados de pureza e recuperação de P(3HB) no processo de extração, pois com a combinação de ultrassom e solvente de baixa toxicidade, carbonato de propileno, obteve-se uma elevada recuperação (92%) de polímero com elevada pureza (99 %).

5. REFERÊNCIAS

- ANIS, S. N. S.; NURHEZREEN, M. I.; SUDESH, K.; AMIRUL, A. A. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. *USM2. Sep. Purif. Technol.*, v. 102, p. 111–117, 2013.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microb.*, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- FIORESE, M. L.; FREITAS, F.; PAIS, J.; RAMOS, A. M.; ARAGÃO, G. M. F.; REIS, M.A.M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Eng. Life Sci.*, v. 9, n. 6, p. 454–461, 2009.
- IENCZAK, J. L.; QUINES, L. K.; MELO, A. A.; BRANDELLERO, M.; MENDES, C. R.; W. SCHMIDELL, W; ARAGÃO, G. M. F. High cell density strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator*. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 28, n. 04, p. 585 – 596, 2011.
- JACQUEL, N.; LO, C. W.; WEI, Y. H.; WU, H. S.; WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.*, v.39, p. 15-37, 2008.
- 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. *Biochem. Eng. J.*, v. 27, p.197-203, 2005.
- 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. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 1-14, 1996.
- MCCHALICHER, C. W.J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. *Am. Inst. Chem. Eng.*, v. 56, n. 6, p. 1616-1625, 2009.
- MONTORO, S. R.; SHIGUE, C. Y.; SORDI, M. L. T.; SANTOS, A. M.; RÉ, M. L. Estudo cinético de redução de massa molar do Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV). *Polim. Cienc. Tecnol.*, v. 20, n. 1, p. 19 – 24, 2010.
- QUINES, L. K. M. Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos* – Orientador: G. M. F. Aragão. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
- SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Quím. Nova.*, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.