

EXTRAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO), PRODUZIDO POR *Cupriavidus necator*, COM CARBONATO DE PROPILENO**Luci K. M. Quines^a, Jaciane L. Ienczak^b, Mélodi Schmidt^a, Kellen Zanfonato^a, Maria I. Rodrigues^c, Willibaldo Schmidell^a e Gláucia M. F. Aragão^{a,*}**^aDepartamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil^bLaboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 13083-970 Campinas – SP, Brasil^cFaculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 17/07/2014; aceito em 02/10/2014; publicado na web em 13/11/2014

EXTRACTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE), PRODUCED BY *Cupriavidus necator*, WITH PROPYLENE CARBONATE. The environmental impact of plastic waste has attracted worldwide attention. Amid the current context of increasing concern for the environment, biodegradable plastics have been widely studied as a replacement for synthetic plastics. Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is a biopolymer stored as an intracellular energy and reserve source in many microorganisms. Because it is an intracellular product, P(3HB) must be extracted from the cells at the end of the culture. The purpose of this study was to investigate the effect of extraction time, heating temperature, first standing time (after filtration and extraction), second standing time (after P(3HB) precipitation) and solvent amount, during the process of extracting P(3HB) from *Cupriavidus necator* DSM 545, using propylene carbonate as solvent. The extraction kinetic of P(3HB) with propylene carbonate from thermally treated biomass was evaluated at different temperatures. The physical properties of the P(3HB) obtained were also evaluated. In this case, P(3HB) obtained at optimal conditions of recovery (98%) and purity (99%) was used. Results showed that temperature was the most important factor in these responses for the range of values studied (110-150 °C).

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate); propylene carbonate; *Cupriavidus necator*.**INTRODUÇÃO**

Inseridos no contexto de preocupação crescente com o ambiente, plásticos biodegradáveis têm sido amplamente estudados, a fim de substituir os plásticos sintéticos.¹ O P(3HB), um material de reserva energética acumulado intracelularmente pelas bactérias produtoras, possui características mecânicas e termoplásticas próximas às do polipropileno e tem atraído cada vez mais atenção para aplicação como bioplástico devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de ser produzido a partir de matérias-primas renováveis.^{2,3}

Apesar das atraentes características do P(3HB), sua aplicabilidade é limitada devido ao seu elevado custo de produção. Por se tratar de um produto intracelular, o P(3HB) deve ser extraído das células ao término do cultivo. Estima-se que o impacto do custo de recuperação de P(3HB) no custo total do processo de produção possa representar mais de 50% do valor final do produto.⁴ Segundo Chen *et al.*,⁵ para potencializar a produção de P(3HB), é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e extração deste polímero, que possuam baixo custo e impacto ambiental reduzido, com a finalidade de torná-lo economicamente competitivo e, desta forma, potencializar sua aplicabilidade. Uma etapa de pré-tratamento da biomassa celular pode ser inserida no processo de extração e tem por finalidade desestabilizar e/ou romper a parede celular da bactéria e facilitar a ação do solvente no processo de extração, melhorando assim a recuperação do polímero extraído.⁶

Dentre os métodos utilizados nos processos de extração de P(3HB) pode-se mencionar: adição de solventes orgânicos, digestão química, digestão enzimática, métodos mecânicos, métodos combinados, como mecânico e químico, entre outros.⁷⁻¹⁰

A técnica de extração de P(3HB) com solventes orgânicos é a mais utilizada devido à sua simplicidade, baixa degradação do polímero extraído e elevada pureza do produto.² Porém, vários desses solventes orgânicos são tóxicos e altamente voláteis (por exemplo, clorofórmio), o que torna a sua utilização contraditória, uma vez que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica. Assim, a utilização de carbonato de propileno, como um solvente pouco agressivo, foi proposta na literatura por Lafferty e Heinzle.¹¹

O carbonato de propileno apresenta baixa toxicidade e possui alto ponto de ebulição, próximo a 240 °C, permitindo que, durante o processo de extração, ocorra baixo risco de perda por evaporação, podendo ainda ser reutilizado diversas vezes, minimizando assim os custos de produção de P(3HB).¹²

O objetivo deste trabalho foi selecionar as variáveis que influenciam no processo de extração de P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545, utilizando carbonato de propileno como solvente. Os resultados avaliados foram a porcentagem de recuperação de P(3HB) e sua pureza. Também se estudou a cinética de extração de P(3HB) com carbonato de propileno, a partir de biomassa tratada a diferentes temperaturas de aquecimento, assim como o efeito do processo de extração nas características térmicas e de massa molar do biopolímero recuperado.

PARTE EXPERIMENTAL**Biomassa**

A biomassa de *Cupriavidus necator* DSM 545 com P(3HB), utilizada neste estudo, foi produzida utilizando glicose/frutose como substrato. A estratégia utilizada no cultivo foi batelada alimentada, tendo como nutriente limitante o nitrogênio adicionado na forma de

*e-mail: glaucia@enq.ufsc.br

uréia. As fontes de nitrogênio e de carbono foram adicionadas de forma a se evitar a limitação destes nutrientes na fase de crescimento celular. O cultivo foi iniciado com 40 g L⁻¹ de glicose/frutose (S) e 2 g L⁻¹ de nitrogênio 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 realizaram-se pulsos de glicose/frutose para manter a concentração desses substratos acima de 15 g L⁻¹.

Tratamento térmico da biomassa

Após o término do cultivo de *C. necator*, elevou-se a temperatura da suspensão de biomassa para 95 °C durante 45 min, para inativar a enzima PHA depolimerase, responsável pela degradação do biopolímero, e desnaturar as proteínas e, conseqüentemente, desestabilizar a parede celular e facilitar a ação do solvente na solubilização do P(3HB).¹³ Posteriormente, a biomassa foi centrifugada a 2000 g por 15 min e lavada com água destilada, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado (células com P(3HB)) foi submetido à secagem a 65 °C por 24 h.

Extração de P(3HB)

Para a extração do polímero, foi utilizado o método baseado nos estudos de Lafferty e Heinsle¹¹ e Fiorese *et al.*,¹⁴ com modificações. A massa de células (11,5 g) foi suspensa em um volume de carbonato de propileno (Merck Schuchardt OHG[®] - pureza 99,7%) aquecido à determinada temperatura. Considerou-se como instante inicial de extração o momento em que se atingiu a temperatura desejada. Os experimentos foram realizados em rotaevaporador sob agitação constante de 120 rpm.

A suspensão (carbonato de propileno, debris celulares e P(3HB)) obtida após diferentes tempos de extração foi submetida à filtração a quente sob vácuo em aparato composto por kitassato, funil de porcelana, filtro de papel qualitativo com poro de 14 µm e diâmetro de 12,5 cm (Qualy[®]) e bomba a vácuo (J. B. Industries – DV 200N 250). Os sólidos retidos no filtro foram lavados com 30 mL de carbonato de propileno aquecido na mesma temperatura da extração. A solução permeada composta de P(3HB) dissolvido em solvente permaneceu em repouso por um determinado período de tempo (indicado como Tempo 1), à temperatura ambiente.

Após o tempo de repouso, água destilada foi adicionada em uma relação 4:1 (água:solvente) à solução para a precipitação do polímero, a fim de obter uma suspensão de P(3HB) precipitado em uma mistura de água e carbonato de propileno. Esta suspensão permaneceu sob agitação constante por um dado intervalo de tempo (indicado como Tempo 2), em agitador magnético. Posteriormente, a suspensão foi submetida a uma segunda filtração (mesmo aparato utilizado na primeira filtração) à temperatura ambiente, em filtro qualitativo de 14 µm e diâmetro de 12,5 cm (Qualy[®]). O material polimérico retido no filtro foi lavado com 100 mL de água destilada, sendo posteriormente o filtro contendo a massa polimérica disposto em estufa a 65 °C por 24 h para secagem.

Seleção das variáveis que influenciam a extração de P(3HB) por carbonato de propileno

Com o objetivo de definir as variáveis que influenciam no método de extração proposto, utilizou-se um delineamento experimental Plackett & Burman (PB)¹⁵ de 12 ensaios acrescidos de 3 pontos centrais. As variáveis de processo avaliadas neste trabalho foram: Tempo de repouso 1 e 2, temperatura de extração, volume de solvente da extração e tempo de extração. Os valores destas variáveis estudadas

nas condições de nível inferior (-1), nível superior (1) e ponto central (0) podem ser visualizadas na Tabela 1. Nos ensaios do delineamento PB foram utilizadas células com 34,5% de P(3HB). As variáveis respondidas analisadas foram porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação do polímero.

Tabela 1. Valores das variáveis tempo de extração, temperatura de aquecimento, tempo de repouso 1 (tempo após filtração e extração), tempo de repouso 2 (tempo após a precipitação do P(3HB)) e volume de solvente utilizadas no delineamento experimental Plackett & Burman de 12 ensaios (PB12), com triplicata do ponto central e seus respectivos níveis codificados para o estudo da extração do P(3HB)

Variável	-1	0	+1
Tempo de extração (min)	15	30	45
Temperatura de aquecimento (°C)	110	130	150
Tempo de repouso 1 (h)	12	18	24
Tempo de repouso 2 (h)	12	18	24
Volume de solvente (mL)	25	50	75

Cinética de extração com carbonato de propileno

Estudou-se a cinética de extração de P(3HB) com o solvente na temperatura de aquecimento de 130 e 150 °C. Para cada uma das temperaturas 4 ensaios foram realizados, com tempos de contato das células com o solvente de 5, 15, 30 e 45 min, empregando-se 11,5 g de células para 75 mL de solvente (relação células/solvente de 0,15 g mL⁻¹). A metodologia de extração utilizada foi de acordo com a descrita anteriormente, com os tempos de repouso 1 e 2, de 12 h cada, e volume de 200 mL de água destilada para lavagem do P(3HB) na segunda filtração.

Determinação de P(3HB)

A concentração de P(3HB) nas amostras de polímero extraído foi determinada por cromatografia gasosa (CG-90 equipado com uma coluna de sílica fundida, Supercowax-10 - 0,53 mm x 30 m, e detector de ionização de chama), conforme o método de metanólise.¹⁶

Para a determinação da porcentagem de pureza do P(3HB) extraído, utilizou-se a Equação 1.

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

na qual: $m_{P(3HB)}$ = massa de biopolímero detectada por cromatografia (g); m_i = massa total do polímero utilizada para a análise cromatográfica (g).

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

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

na qual: m_p = massa de P(3HB) puro (g) = $m_i \cdot pureza$; m_i = massa de P(3HB) obtido após a recuperação (g); m_i = massa total de P(3HB) nas células antes da extração.

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

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

A identificação do P(3HB) foi realizada pela caracterização

dos grupamentos funcionais do biopolímero extraído, por meio da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em equipamento Perkin Elmer Spectrum 100 IR, no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , pela técnica de refletância difusa.

Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a degradação térmica do biopolímero extraído, sendo possível obter a temperatura de início de degradação (T_i), a temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e a porcentagem de perda de massa do P(3HB) extraído.

A análise foi realizada em TGA-50 Shimadzu. As amostras foram aquecidas de 25 a 500 $^{\circ}\text{C}$ a uma velocidade de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas utilizando-se equipamento DSC-50 Shimadzu para caracterizar o biopolímero quanto à temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e grau de cristalinidade (X_c). A amostra foi aquecida sob atmosfera inerte (nitrogênio) de -30 $^{\circ}\text{C}$ a 200 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ no primeiro aquecimento e o segundo aquecimento foi realizado de -50 $^{\circ}\text{C}$ a 200 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A cristalinidade (X_c) do polímero foi determinada a partir da relação entre a entalpia de fusão da amostra (ΔH_m) e a entalpia de fusão de P(3HB) 100% cristalino, 142 J g^{-1} .¹⁷

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC foi realizada para a determinação da massa molar do P(3HB) extraído. O equipamento utilizado para a análise foi um HPLC Waters Instruments equipado com bomba isocrática, modelo 1515, detector por índice de refração, modelo 2414; temperatura do detector de 35 $^{\circ}\text{C}$, quatro colunas de permeação em gel Waters Styragel (7,8 x 300 mm) em THF ligadas em série com faixa de exclusão de 100 a 5000 (HR1), 500 a 20000 (HR2), 500 a 30000 (HR3), e 5000 a 500000 (HR4), temperatura da coluna de 40 $^{\circ}\text{C}$. Clorofórmio foi utilizado como solvente na fase móvel e o eluente da coluna foi o Tetraidrofurano (THF). Para a calibração do sistema,

foram utilizados padrões de poliestireno (PS) com massas molares de 400, 950, 2800, 6400, 17000, 43000, 110000 e 430000 Da. As amostras de P(3HB) foram diluídas na razão de 5 mg mL^{-1} de clorofórmio e mantidas em repouso durante 24 h para a total dissolução do polímero no solvente. O volume de injeção foi de 200 μL , sob fluxo de solvente constante de 1 mL min^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das variáveis que influenciam a extração de P(3HB) com carbonato de propileno

O principal objetivo do emprego da metodologia de Plackett & Burman (PB)¹⁵ foi avaliar o efeito das cinco variáveis dentro das faixas estudadas em relação às porcentagens de pureza e recuperação de P(3HB), de modo a maximizar a eficiência da extração deste polímero. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Observa-se que a pureza do P(3HB) variou de 60 a 82%, e a recuperação de 25 a 99%. Ainda de acordo com esses resultados, duas condições testadas para extração do P(3HB) se destacaram: os experimentos 5 e 6, nos quais foram utilizadas as combinações de 45 min de tempo de extração, 150 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura de aquecimento, tempos de repouso (1) e (2) entre 12 e 24 h e volume de solvente de 75 mL. Os experimentos 5 e 6 apresentaram 82% de pureza e recuperação de 99 e 98%, respectivamente. Os ensaios com temperatura de extração de 110 $^{\circ}\text{C}$ apresentaram pureza entre 61 e 75% e recuperação em torno de 25 e 33%. Segundo Lafferty e Heinzle,¹¹ valores de temperatura variando entre 100 e 120 $^{\circ}\text{C}$ em curtos tempos de extração promovem recuperação incompleta de P(3HB), o que foi confirmado com os resultados obtidos neste estudo.

A Tabela 3 apresenta os efeitos das variáveis sobre as respostas de pureza (%) e recuperação de P(3HB) (%) extraído utilizando carbonato de propileno como solvente, respectivamente.

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

Tabela 2. Condições dos ensaios da matriz de Plackett & Burman para o estudo das variáveis tempo de extração (textração) das células com o solvente, temperatura de aquecimento na extração (Taquec.) da mistura das células com o solvente, tempo de repouso 1 (Trep. 1) da mistura de P(3HB) com o solvente, tempo de repouso 2 (Trep. 2) da suspensão de polímero precipitado com água no solvente, volume de solvente (Vol solvente) e respostas porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação de P(3HB) (Recup.), consideradas como variável resposta, no delineamento experimental (PB)

Ensaio	textração (min)	Taquec. ($^{\circ}\text{C}$)	Trep. 1 (h)	Trep. 2 (h)	Vol solvente (mL)	Pureza (%)	Recup. (%)
1	+1	-1	+1	-1	-1	75	40
2	+1	+1	-1	+1	-1	81	74
3	-1	+1	+1	-1	+1	79	85
4	+1	-1	+1	+1	-1	62	33
5	+1	+1	-1	+1	+1	82	99
6	+1	+1	+1	-1	+1	82	98
7	-1	+1	+1	+1	-1	81	79
8	-1	-1	+1	+1	+1	69	26
9	-1	-1	-1	+1	+1	64	25
10	+1	-1	-1	-1	+1	65	27
11	-1	+1	-1	-1	-1	80	73
12	-1	-1	-1	-1	-1	61	26
13	0	0	0	0	0	77	81
14	0	0	0	0	0	80	86
15	0	0	0	0	0	81	87

Tabela 3. Análise dos efeitos das variáveis: tempo de extração, temperatura de aquecimento da mistura das células com o solvente, tempo de repouso 1 da mistura de P(3HB) com o solvente, tempo de repouso 2 da suspensão de polímero precipitado com água no solvente, volume de solvente, do processo de extração na porcentagem de pureza e recuperação do P(3HB)

	Pureza (%)		Recuperação (%)	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média	73,42	< 0,0001	57,11	< 0,0001
Curvatura	11,83	0,0440	55,02	0,0002
t extração	2,17	0,3568	9,82	0,0345
T aquec.	14,83	0,0002	54,97	<0,0001
Tempo repouso 1	2,50	0,2919	6,10	0,1532
Tempo repouso 2	-0,50	0,8271	-2,26	0,5752
Volume solvente	0,17	0,9419	5,96	0,1613

*p-valores < 0,05 são estatisticamente significativos a 95 % de confiança.

O aumento da temperatura de 110 para 150 °C aumenta significativamente a pureza do P(3HB). As outras variáveis não apresentaram nenhum impacto nesta resposta. Esta informação é muito importante, indicando que dentro das faixas estudadas estas podem ser fixadas nas condições de maior produtividade do processo (tempo de extração e de repouso 1 e 2 nas condições mínimas estudadas), resultando em economia devido à redução do tempo de processo.

Ao avaliar a influência das variáveis na porcentagem de recuperação de P(3HB), observa-se que, das cinco variáveis estudadas, apenas duas apresentaram valores de p menores que o nível de significância (0,05), mostrando influência significativa o tempo de extração e a temperatura de aquecimento sobre esta resposta.

Os tempos de repouso (1) e (2) da solução polimérica não apresentaram influência significativa, dentro da faixa estudada, nos resultados de extração de P(3HB).

A variável volume de solvente não apresentou influência neste estudo, entretanto, outros experimentos de extração realizados (dados não apresentados), utilizando o mesmo solvente, indicaram que quando as células contiverem elevada porcentagem de P(3HB) acumulado (superior a 60%), a relação solvente/P(3HB) poderá influenciar no processo de extração, logo o volume de solvente deverá ser fixado no nível superior, 75 mL, resultando em uma relação células/solvente de 0,15 g mL⁻¹.

O uso da metodologia estatística de DOE (*Design of Experiments*) por meio da matriz de Plackett & Burman é extremamente útil, permitindo que com apenas 12 ensaios de extração acrescidos de três pontos centrais seja possível promover condições de ensaio nas quais a recuperação de P(3HB) aumente de 25% para 98-99%. Além disso, é possível calcular o efeito individual de cada variável nas respostas desejadas e avaliar a repetibilidade do processo a partir dos ensaios 13, 14 e 15 (condições dos pontos centrais) pelo cálculo do erro puro. Ambas as respostas (Tabela 2) apresentam uma pequena variação nas condições dos pontos centrais.

Cinética de extração para validação dos resultados obtidos no Plackett & Burman

De acordo com a análise dos efeitos das variáveis avaliadas no processo de extração com carbonato de propileno, pode-se analisar que a curvatura apresentou o maior efeito estatisticamente significativo no processo, indicando que as respostas dos pontos centrais estão muito próximas dos valores máximos obtidos para recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno. A temperatura de aquecimento também apresentou elevado efeito estatisticamente significativo

(54,97) no processo de extração, mostrando a importância de se checar a influência desta variável neste processo. Desta forma, um novo DOE poderia ter sido realizado, porém as respostas obtidas no Plackett & Burman já atingiram o objetivo desejado de elevadas pureza e recuperação de P(3HB) na extração com carbonato de propileno a partir de biomassa tratada termicamente, não sendo necessária a realização de um outro planejamento experimental.

Para a validação do Plackett & Burman, cinéticas de extração de P(3HB) a partir de *C. necator* foram realizadas nas temperaturas do ponto central (130 °C) e da condição superior (150 °C), com o propósito de avaliar a influência da temperatura de aquecimento e do tempo de extração nas respostas de pureza e recuperação do biopolímero.

Os tempos de repouso (1) e (2) da solução polimérica não apresentaram influência significativa no processo de extração dentro da faixa estudada, sendo fixados na condição inferior: 12 h, com o objetivo de reduzir o tempo total do processo de extração. O volume de solvente utilizado, para cada extração, nos ensaios cinéticos foi de 75 mL, relação células/solvente de 0,15 g mL⁻¹.

A Figura 1 mostra os resultados de porcentagem de pureza e recuperação do P(3HB) nos testes cinéticos, a partir de biomassa de *C. necator* tratada termicamente, obtidos por extração com carbonato de propileno a 130 e 150 °C.

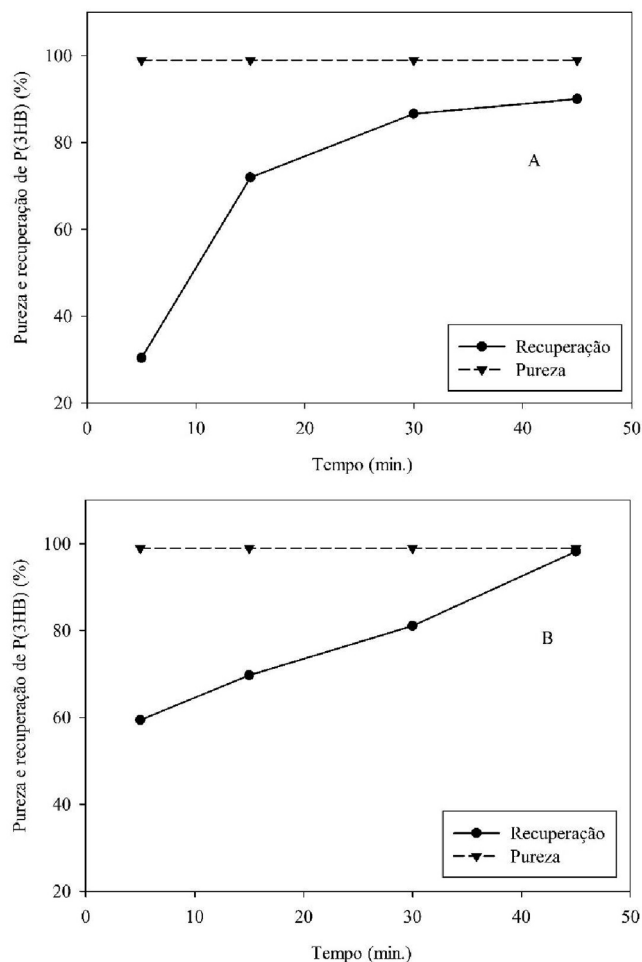


Figura 1. Porcentagens de recuperação e pureza de P(3HB), produzido por *C. necator*, obtidas nas cinéticas de recuperação com carbonato de propileno a 130 °C (A) e 150 °C (B) nos tempos de 5, 15, 30 e 45 min

Ao se comparar os resultados obtidos no estudo da cinética de extração em temperaturas diferentes, nota-se que não houve diferença entre as respostas de pureza obtidas, todas foram próximas a 99%.

Nem mesmo o menor tempo de extração (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, por meio da precipitação e lavagem do polímero com água destilada, de acordo com o método proposto.

A partir das cinéticas de extração, foi possível observar a influência do tempo de extração nos resultados de recuperação de P(3HB). Os resultados mostraram que, quanto maior o tempo de extração, maior a porcentagem de P(3HB) obtido. A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) foi obtida na extração realizada a 150 °C, com tempo de extração de 45 min, sendo esta de 98%.

Com a utilização da temperatura de extração de 130 °C, observou-se que a maior porcentagem de recuperação de P(3HB) foi obtida também na extração realizada com tempo de extração de 45 min (90%). Estes resultados demonstram também a influência da temperatura de extração nos resultados de recuperação do biopolímero pois, na extração a 130 °C, a recuperação de P(3HB) foi menor quando comparada à extração a 150 °C. Este fato pode ser devido à menor solubilidade do polímero no solvente nessa temperatura.

A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno encontrado por Lafferty e Heinzle,¹¹ a partir de células secas de *Azotobacter chroococcum* DSM 377, foi de 87%, com aquecimento a 140 °C e tempo de extração de 30 min. Fiorese *et al.*,¹⁴ utilizando carbonato de propileno como solvente para extração de P(3HB) produzido por *C. necator* na temperatura e tempo de extração de 130 °C e 30 min, obtiveram uma recuperação de 95% e pureza de 84%. Os resultados de pureza são inferiores aos obtidos no presente estudo. Além de se obter uma maior recuperação de P(3HB), com pureza superior, o método aqui proposto ainda apresenta vantagens em relação ao método desenvolvido por Fiorese *et al.*,¹⁴ pois utiliza a metade do volume de solvente para a mesma quantidade de biomassa e, nas etapas de precipitação e lavagem do P(3HB), a acetona utilizada por aqueles autores foi substituída por água no presente trabalho.

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

A amostra de P(3HB) utilizada para caracterização foi extraída com carbonato de propileno nas condições de processo em que as maiores porcentagens de pureza e recuperação foram obtidas, ou seja, extração a 150 °C por 45 min, obtendo-se um biopolímero com 99% de pureza.

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada para verificar a estrutura química do polímero, produzido por *C. necator* e extraído com carbonato de propileno, e para avaliar a influência do processo de extração proposto neste trabalho nas propriedades como cristalinidade e mobilidade da cadeia polimérica. A Figura 2 apresenta o espectro de FT-IR para o biopolímero extraído, onde picos característicos do P(3HB) podem ser observados.

Segundo Xu *et al.*¹⁸ e Pachekoski *et al.*,¹⁹ bandas em torno de 2928 e 2988 cm⁻¹ correspondem a deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H na cadeia de P(3HB). Na amostra analisada, estes valores foram de 2934 e 2976 cm⁻¹. Bandas em 1724 cm⁻¹

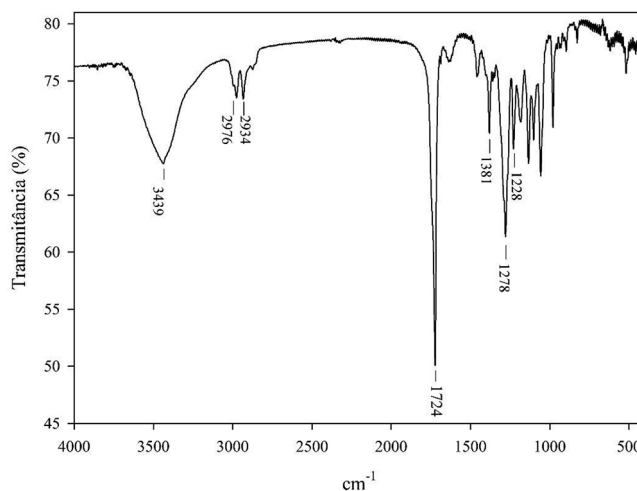


Figura 2. Espectro de FT-IR para o P(3HB) extraído de *Cupriavidus necator* utilizando carbonato de propileno, nas condições de extração a 150 °C durante 45 min

foram observadas e são atribuídas a deformações axiais da carbonila C=O e o alongamento simétrico e assimétrico do grupo C-O-C pode ser representado em bandas de absorção entre 1228-1278 cm⁻¹.^{20,21}

De acordo com Pachekoski *et al.*,¹⁹ a técnica FT-IR pode ser utilizada para determinar o grau de cristalização do P(3HB), por meio do monitoramento da deformação da carbonila C=O, região vibracional entre 1780 e 1700 cm⁻¹. Liao *et al.*²² afirmam que as alterações espectrais durante a cristalização do P(3HB) representam a banda da carbonila em 1740-1720 cm⁻¹, sendo que a fase amorfa está próxima a 1738 cm⁻¹ enquanto que a banda da fase cristalina está em torno de 1722 cm⁻¹. No presente estudo, um pico em 1724 cm⁻¹ foi observado, evidenciando a cristalinidade do P(3HB) extraído com a metodologia proposta.

O pico de deformação angular simétrica dos grupos CH₃ em 1381 cm⁻¹ foi observado e está de acordo com os picos descritos por Vogelsanger *et al.*²³ e Garcia²⁴ para o P(3HB). Uma banda em 3439 cm⁻¹ também foi observada, e pode ser devido à presença de umidade na amostra. Camargo *et al.*,²⁵ analisando biopolímero da PHB industrial (Serrana, SP), observaram um pico em 3443 cm⁻¹, o qual foi atribuído ao estiramento OH, indicando presença de umidade no material.

Com a análise de FT-IR foi possível confirmar o polímero extraído como sendo o P(3HB) e concluir que o processo de extração deste a partir de cultivo de *C. necator*, com carbonato de propileno, não causou alterações químicas drásticas em sua cadeia polimérica, pois os picos de absorção obtidos estão de acordo com os reportados na literatura para o espectro de P(3HB) puro.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de caracterização, obtidos a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), termogravimétrica (TGA) e cromatografia de permeação em gel (GPC) para o P(3HB) extraído com carbonato de propileno.

A temperatura de fusão do P(3HB) extraído foi de 162 °C. De acordo com Gomes e Bueno Neto,²⁶ a temperatura de fusão do P(3HB) está entre o intervalo de 174 – 180 °C. Esta característica de T_m do polímero extraído com carbonato de propileno inferior ao reportado na literatura confere ao biopolímero a vantagem de ser processado

Tabela 4. Características físicas do P(3HB), extraído de *Cupriavidus necator* com carbonato de propileno. Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m), porcentagem de cristalinidade (X_c), Temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}), porcentagem de perda de massa (PM), massa molar (M_w) e índice de polidispersão (IP)

T _g (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (J g ⁻¹)	X _c (%)	T _i (°C)	T _{pico} (°C)	PM (%)	M _w (kDa)	IP
1,03	162	86,2	60,7	287	312	97,8	155	1,87

a temperaturas mais baixas, reduzindo de forma substancial a sua degradação térmica.²⁷ A temperatura de transição vítrea (T_g), 1,03 °C, também foi inferior aos valores reportados na literatura para P(3HB) extraído de *C. necator* com carbonato de propileno, ou seja, de 4,9 °C.¹⁴ De acordo com Anderson e Dawes,²⁸ valores de T_g entre -5 e 5 °C caracterizam P(3HB). Segundo Lucas *et al.*,²⁹ quanto menor a temperatura de transição vítrea, mais flexível é o material.

Os grânulos de P(3HB) acumulados por bactérias apresentam característica amorfa, porém, quando extraídos formam estruturas cristalinas devido à liofilização ou secagem das células e por tratamentos utilizados para recuperação do biopolímero.³⁰ O grau de cristalinidade do biopolímero extraído de *C. necator* neste estudo foi de 60,7%, valor dentro do intervalo reportado na literatura para P(3HB), 55-80%.^{31,27} O grau de cristalinidade tem influência significativa sobre as propriedades mecânicas do biopolímero, pois o mesmo afeta a extensão das ligações secundárias intermoleculares, existentes nas regiões cristalinas.^{32,33}

A análise de TGA, além de determinar a temperatura de degradação polimérica, também é importante para caracterizar o grau de pureza de um polímero, pois a porcentagem de perda de massa representa a degradação total do material polimérico, sendo que a parte não degradada é referente a impurezas. Os valores da análise termogravimétrica demonstraram início de degradação em 287 °C e temperatura máxima de degradação de 312 °C com perda de massa de 98%, comprovando a elevada pureza do P(3HB) extraído com carbonato de propileno. Machado *et al.*³² obtiveram P(3HB) com T_i e T_{pico} de 225 e 300 °C, respectivamente, valores inferiores aos obtidos para o biopolímero extraído com carbonato de propileno neste estudo, o que indica que o biopolímero extraído apresenta maior estabilidade térmica do que o obtido pelos autores citados.

O biopolímero extraído com carbonato de propileno apresentou massa molar de $1,55 \times 10^5$ Da. Segundo Khanna e Srivastava,³⁴ a massa molar de P(3HB) produzido por bactérias é normalmente na faixa de $1,0 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^6$ Da, com polidispersão em torno de 2,0. O valor de massa molar (M_w) obtido neste estudo é inferior a outros citados na literatura ($7,4 \times 10^5$ Fiorese *et al.*,¹⁴ $6,3 \times 10^5$ Figueiredo *et al.*,³⁵ 2×10^5 Verlinden *et al.*³⁶) para P(3HB) produzido por *C. necator*. No entanto, é importante salientar que a massa molar de P(3HB) é definida durante sua produção e depende das variáveis de cultivo, isto é, estratégias de adição de nutrientes, modo de operação, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, nutriente limitante e fonte de carbono.^{35,37} O processo de extração de P(3HB) do interior das células apresenta elevado impacto nas propriedades moleculares do polímero, devido à possibilidade de degradação da massa molar.³⁴ Como no presente trabalho a biomassa de *C. necator* com P(3HB) foi submetida a tratamento térmico a 95 °C durante 45 min e posterior extração polimérica com solvente sob aquecimento a 150 °C durante 45 min, pode ter ocorrido degradação térmica das cadeias poliméricas do P(3HB). Segundo Canevarolo,³⁸ as cadeias de um polímero podem ser rompidas, com aquecimento a altas temperaturas, formando outras de tamanho menor, com conseqüente mudança na estrutura química e redução da massa molar.

O índice de polidispersão foi de 1,87, valor inferior ao obtido por Fiorese *et al.*,¹⁴ que obtiveram 3,1 para o P(3HB) extraído com carbonato de propileno, sob outras condições de extração. A polidispersividade de um polímero caracteriza a homogeneidade da distribuição do tamanho médio das cadeias poliméricas, quanto mais próximo de 1, mais homogênea é a cadeia. Polímeros lineares como o P(3HB) geralmente apresentam uma polidispersão estreita, e se o valor for próximo a dois é chamado de distribuição “mais provável”.³⁸

A caracterização térmica e o conhecimento da massa molar do P(3HB), uma vez extraído, determina a adequação deste polímero para futuras aplicações, pois estas características conferem a ele grau de elasticidade, resistência e degradação.

CONCLUSÃO

Com os estudos realizados é possível concluir que a variável temperatura de aquecimento influencia a pureza e recuperação do polímero, sendo que a variável tempo de extração influencia a recuperação do P(3HB) de *Cupriavidus necator* com carbonato de propileno.

As análises cinéticas de extração de P(3HB) a partir de biomassa tratada termicamente mostram que quanto maior o tempo de extração maior a porcentagem de P(3HB) obtida. A porcentagem de pureza do polímero não é influenciada pelos diferentes tempos e temperaturas de extração dentro das faixas estudadas.

A recuperação (98%) e pureza (99%) mais elevadas foram obtidas com a temperatura de extração de 150 °C, tempo de extração de 45 min e relação células/solvente de 0,15 g mL⁻¹. Sob estas condições o P(3HB) recuperado apresentou massa molar de 155 kDa, com índice de polidispersão de 1,87. As propriedades térmicas do P(3HB) extraído com carbonato de propileno foram: temperatura de transição vítrea de 1,03 °C, temperatura de fusão de 162 °C, entalpia de fusão de 86,2 J g⁻¹, cristalinidade de 60,7%, temperatura de início de degradação 287 °C e perda de massa de 97,8%.

Com o método de extração aqui proposto foi possível obter uma elevada recuperação de P(3HB), a partir de *C. necator*, com elevada pureza e propriedades físicas semelhantes às reportadas na literatura para P(3HB), utilizando-se um solvente ambientalmente mais indicado.

REFERÊNCIAS

- Manangan, T.; Shawaphun, S.; *ScienceAsia* **2010**, *36*, 199.
- Gumel, A. M.; Annuar, M. S. M.; Chisti, Y.; *J. Polym. Environ.* **2013**, *21*, 580.
- Bengtsson, S.; Pisco, A. R.; Johansson, P.; Lemos, P. C.; Reis, M. A. M.; *J. Biotechnol.* **2010**, *147*, 172.
- Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Rocha, R. C. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1732.
- Chen, Y.; Yang, H.; Zhou, Q.; Chen, J.; Gu, G.; *Process. Biochem.* **2001**, *36*, 501.
- Jacquel, N.; Lo, C. W.; Wei, Y. H.; Wu, H. S.; Wang, S. S.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 15.
- Riedel, S. L.; Brigham, C. J.; Budde, C. F.; Bader, J.; Rha, C.; Stahl, U.; Sinskey, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *110*, 461.
- Yang, Y. H.; Brigham, C.; Willis, L.; Rha, C. K.; Sinskey, A.; *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 937.
- Neves, A.; Müller, J.; *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 1575.
- Ghatnekar, M. S.; Pai, J. S.; Ganesh, M.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 444.
- Lafferty, R. M.; Heinsle, E.; *US Pat. 4,140,741* **1979**.
- Mcchalicher, C. W. J.; Srienc, F.; Rouse, D. P.; *Am. Inst. Chem. Eng.* **2009**, *56*, 1616.
- Kapritchkoff, F. M.; Bonomi, A.; Miranda, E. A.; Pradella, J. G. C.; Maiorano, A. E.; Zuccolo, M.; Schmidell, W.; *XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
- Fiorese, M. L.; Freitas, F.; Pais, J.; Ramos, A. M.; Aragão, G. M. F.; Reis, M. A. M.; *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 454.
- Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos*, 1ª ed., Casa do Pão: Campinas, 2005.
- Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *54*, 1977.
- Tsuji, H.; Ikada, Y.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *60*, 2367.
- Xu, J.; Guo, B. H.; Yang, R.; Wu, Q.; Chen, G. Q.; Zhang, Z. M.; *Polymer* **2002**, *43*, 6893.

19. Pachekoskia, W. M.; Dalmolina, C.; Agnelli, J. A. M.; *Materials Research* **2013**, *16*, 327.
20. Galego, N.; Rozsa C.; Sánchez R.; Fung J.; Vázquez A.; Tomás, J. S.; *Polym. Test.* **2000**, *19*, 485.
21. Hong, K.; Sun, S.; Tian, W.; Chen, G. Q.; Huang, W.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 523.
22. Liao, Q.; Noda, I.; Frank, C. W.; *Polymer* **2009**, *50*, 6139.
23. Vogelsanger, N.; Formolo, M. C.; Pezzin, A. P. T.; Schneider, A. L. S.; Furlan, S. A.; Bernardo, H. P.; Pezzin, S. H.; Pires, A. T. N.; Duek, E. A. R.; *Materials Research* **2002**, *6*, 359.
24. Garcia, M. C. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2006.
25. Camargo, F. A.; Innocentini-Mei, L. H.; Lemes, A. P.; Morães, S. G.; Duran, N.; *J. Compos. Mater.* **2012**, *46*, 417.
26. Gomes, J. G. C.; Bueno Neto, C. L.; *Rev. Bras. Eng. Quim.* **1997**, *17*, 24.
27. Grigull, V. H.; Silva, D. D.; Garcia, M. C. F.; Furlan, S. A.; Pezzin, A. P. T.; Schneider, A. L. S.; Aragão, G. M. F.; *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 223.
28. Anderson, A. J.; Dawes, E. A.; *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
29. Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E.; *Caracterização de Polímeros*, E-papers: Rio de Janeiro, 2001.
30. Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Lee, S. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 34.
31. Holmes, P. A.; Lim, G. B.; *US Pat. 4,910,145* **1990**.
32. Machado, M. L. C.; Pereira, N. C.; Miranda, L. F.; Terence, M. C.; *Polímeros* **2010**, *20*, 65.
33. Callister Jr., W. D.; *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, 5ª ed., Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 2002.
34. Khanna, S.; Srivastava, A. K.; *Process Biochem.* **2004**, *40*, 607.
35. Figueiredo, T. V. B.; Campos, M. I.; Sousa, L. S.; Silva, J. R.; Druzian, J. I.; *Quim. Nova* **2014**, *15*, 1.
36. Verlinden, R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. K.; Williams, C. D.; Piotrowska-Seget, Z.; Radecka, I. K.; *AMB Express* **2011**, *1*, 10.
37. Taidi, B.; Mansfield, D. A.; Anderson, A. J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129*, 201.
38. Canevarolo, S. V.; *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, 1ª ed., Artliber: São Paulo, 2003.