

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
CAMPUS DE ERECHIM
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PALOMA TRUCCOLO REATO

RECUPERAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) PRODUZIDO POR
***Bacillus megaterium* ATCC 14581 VIA EXTRAÇÃO QUÍMICA**
E POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

ERECHIM – RS
2020

PALOMA TRUCCOLO REATO

**RECUPERAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) PRODUZIDO POR
Bacillus megaterium ATCC 14581 VIA EXTRAÇÃO QUÍMICA
E POR FLUIDO SUPERCRÍTICO**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do grau de Engenheiro Químico,
Departamento das Engenharias e Ciência
da Computação da Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –
URI Erechim.**

**Orientador(s): Prof^ª. Dr^a. Eunice Valduga
Prof. Dr. Alexander Junges**

ERECHIM – RS

2020

PALOMA TRUCCOLO REATO

**RECUPERAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) PRODUZIDO POR
Bacillus megaterium ATCC 14581 VIA EXTRAÇÃO QUÍMICA
E POR FLUIDO SUPERCRÍTICO**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do grau de Engenheiro
Químico/Alimentos, Departamento das
Engenharias e Ciências da Computação
da Universidade Regional Integrada do
Alto Uruguai e das Missões – Campus de
Erechim.**

Erechim, 04 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eunice Valduga
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Alexander Junges
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof^a. Dr^a. Juliana Steffens
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Dedico ao meu pai Sergio, à minha mãe Ivana e à minha irmã Talissa, por todo o apoio, incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Ivana, por ter me ensinado valores sublimes os quais moldaram o meu caráter, assim como a encarar com determinação as adversidades da minha trajetória, tornando tudo mais leve e gratificante.

Agradeço ao meu pai, Sergio, por compartilhar gostos e manias, me ensinar algo novo todos os dias, bem como a ter humildade e entender que são os detalhes que fazem a diferença.

Agradeço à minha irmã, Talissa, por compartilhar a vida comigo me dando a certeza de que nunca vou estar sozinha, você é fundamental para mim.

Agradeço aos meus familiares os quais acompanham meu crescimento pessoal desde que nasci e, agora, vibram com minhas conquistas profissionais, especialmente à Nelisa e ao Claudionor.

Agradeço à URI – Campus de Erechim, por toda estrutura física e profissional fornecida não só durante a minha graduação, mas também na minha formação básica.

Agradeço a todos os professores que contribuíram na minha formação, vocês são pessoas incríveis com intelectos invejáveis, tenho sorte de conhecer e poder contar com pessoas como vocês.

Agradeço à minha orientadora, Eunice Valduga, por ter sido impecável durante toda a minha graduação e por ter me passado tanto do seu conhecimento.

Agradeço ao meu co-orientador, Alexander Junges, pelo companheirismo e por todos os ensinamentos, não só técnicos, de forma descontraída e amena.

Agradeço à banca examinadora pela disposição e interesse no meu trabalho, a contribuição de vocês é importante e integralmente positiva.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, não teria concluído com sucesso tantos projetos sem vocês, especialmente ao Bruno, à Letícia, à Rosicler e à Sandy.

Agradeço à minha amiga, Fernanda, por ser minha grande aliada e conselheira, sua importância na minha vida é imensurável, não imagino meus dias sem compartilhar tudo com você.

Não podemos aguardar que os tempos se modifiquem e nós nos modifiquemos junto, por uma revolução que chegue e nos leve em sua marcha. Nós mesmos somos o futuro. Nós somos a revolução.

(Beatrice Bruteau)

RESUMO

Atualmente são produzidas mais de 250 milhões de toneladas/ano de plástico derivado do petróleo no mundo. O manejo e descarte inadequado, assim como a corrente crise mundial fomentada pela exacerbada demanda destes produtos, têm feito com que o consumo desenfreado de plástico seja alvo de debates internacionais, desencadeando inúmeras pesquisas que visam buscar produtos alternativos que correspondam aos atributos do plástico, mas que sejam menos agressivos ao meio ambiente. Nesse sentido, os biopolímeros têm recebido grande atenção pelo fato de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis, o que não é o caso da fonte do petróleo, fazendo com que ele esteja se tornando escasso e progressivamente caro. Sendo assim, neste trabalho foi realizada a extração e recuperação, química e por fluido supercrítico empregando CO₂ e co-solventes (etanol, propanol e isopropanol), do polihidroxibutirato (P(3HB)) produzido por *Bacillus megaterium* ATCC - 14581 em biorreator batelada simples empregando substratos agro-industriais (água de parboilização de arroz, efluente da lavagem de drageadeiras da indústria de balas e solução de micronutrientes). A extração química apresentou a melhor resposta, uma taxa média de recuperação de 81,57%, seguida pela extração por fluido supercrítico utilizando CO₂ e propanol como co-solvente resultou em uma recuperação média de 75,18%. A extração por fluido supercrítico apresenta vantagens, principalmente, por ser considerada uma tecnologia limpa a qual não gera resíduos e utiliza uma quantidade reduzida de solvente quando comparada ao método convencional.

Palavras Chaves: Polihidroxibutirato. Extração. Fluido supercrítico.

ABSTRACT

More than 250 million tons per year of petroleum-based plastics are currently produced in the world. The inadequate handling and disposal, as well as the current global crisis fueled by the exacerbated demand for these products, have made the unrestrained consumption of plastic a target of international debates, triggering numerous researches that seek to find alternative products that correspond to the attributes of plastic, but that are less aggressive to the environment. In this sense, biopolymers have received great attention due to the fact that they are produced from renewable raw materials, which is not the case with the oil source, causing it to become scarce and progressively expensive. Thus, in this work, chemical and supercritical fluid extraction using CO₂ and co-solvents (ethanol, propanol and isopropanol) of polyhydroxybutrate (P(3HB)) produced by *Bacillus megaterium* ATCC - 14581 in a simple batch bioreactor using agro-industrial substrates (rice parboiling water, effluent from the candy industry and micronutrient solution) was carried out. Chemical extraction showed the best response, an average recovery rate of 81.57%, followed by extraction by supercritical fluid using CO₂ and propanol as a co-solvent resulted in an average recovery of 75.18%. Extraction by supercritical fluid has advantages, mainly because it is considered a clean technology that does not generate residues and uses a reduced amount of solvent when compared to the conventional method.

KEYWORDS: Polyhydroxybutrate. Extraction. Supercritical fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aplicações na medicina e na indústria do PHA	16
Figura 2 – Diagrama de fases do dióxido de carbono em função da temperatura e pressão	21
Figura 3 – Diagrama do sistema de extração por fluido supercrítico. V-1, V-2, V-3 e V-4: válvula macrométrica de agulha; V-5: válvula micrométrica de agulha; R-1: cilindro de CO ₂ ; R-2: reservatório de co-solvente; R-3: coletor do extrato; P-1: bomba de seringa; P-2: bomba do co-solvente; E-1 vaso de extração; B-1, B-2: banho termostaticado; T-1: termopar; M-1: manômetro	25
Figura 4 – Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis temperatura e pressão na recuperação do biopolímero por CO ₂ supercrítico empregando isopropanol como co-solvente.....	31
Figura 5 – Recuperação cumulativa do P(3HB) durante o período de tratamento por CO ₂ supercrítico utilizando etanol como co-solvente	33
Figura 6 – Recuperação cumulativa do P(3HB) durante o período de tratamento por CO ₂ supercrítico utilizando propanol como co-solvente	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio mineral	24
Tabela 2 – Composição da solução de micronutrientes	24
Tabela 3 – Recuperação química do P(3HB)	28
Tabela 4 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores reais e codificados) e respostas em termos de massa de P(3HB) e porcentagem de P(3HB) utilizando iso-propanol como co-solvente.....	30
Tabela 5 – Recuperação do P(3HB) via extração por fluido supercrítico utilizando etanol como co-solvente	32
Tabela 6 – Recuperação do P(3HB) via extração por fluido supercrítico utilizando propanol como co-solvente	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1.	Polímeros biodegradáveis	15
2.1.1.	Polihidroxialcanoatos (PHAs)	15
2.1.2.	Polihidroxibutirato (P(3HB))	17
2.2.	Uso de substratos agro-industriais na síntese de P(3HB).....	17
2.3.	Sistemas de bioprodução de P(3HB)	18
2.3.1.	Sistema de bioprodução em biorreator batelada simples	19
2.3.2.	Fatores que afetam a bioprodução de P(3HB)	19
2.4.	Métodos de extração e recuperação de P(3HB).....	20
2.4.1.	Extração por fluido supercrítico	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.	Micro-organismo	23
3.2.	Bioprodução de P(3HB) em biorreator batelada simples.....	23
3.3.	Recuperação do P(3HB)	24
3.3.1.	Recuperação via extração química.....	24
3.3.2.	Recuperação por fluido supercrítico	25
3.4.	Quantificação de P(3HB)	26
3.5.	Avaliação estatística.....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Recuperação do P(3HB) via extração química.....	28
4.2.	Recuperação do P(3HB) por fluido supercrítico	29
5.	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

O advento do plástico revolucionou o *modus operandi* sob o qual, até aquele momento, o mundo era conduzido. O surgimento deste material se deu no início do século XX, mas foi somente após a Segunda Guerra Mundial que seu uso deixou de ser exclusivamente militar e passou a ser ecumênico (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). De acordo com Haider *et al.* (2019), são produzidas mais de 250 milhões de toneladas/ano de plástico no mundo, sendo que a produção de poliolefinas é predominante.

O consumo desenfreado de plástico é uma pauta que vem ganhando força em debates internacionais, tendo como motivação a corrente crise mundial fomentada pela exacerbada demanda destes produtos, assim como, pelo seu manejo e descarte inadequado (SILVA, 2019). Os polímeros sintéticos são altamente resistentes e duráveis, o que geralmente é vantajoso conforme sua aplicação. Contudo, quando o descarte é inapropriado, essas características fazem com que eles se acumulem na natureza por décadas. Para exemplificar, uma garrafa de polietileno tereftalato (PET), leva de 27 a 93 anos para se decompor em um ambiente com umidade relativa de 100% (HAIDER *et al.*, 2019).

De acordo com a *World Wide Fund for Nature* (WWF, 2019), cerca de metade do plástico que polui o mundo hoje foi desenvolvido após os anos 2000 e, mesmo se tratando de um problema recente, 75% de todo o plástico produzido na história já foi descartado. Em consequência da má gestão destes resíduos, pondera-se que um terço do total está inserido na natureza como poluição terrestre, de água doce ou marinha. A estimativa é de que até 2030 a poluição por plástico dobre, sendo os oceanos os mais afetados, permanecendo neles mais de nove milhões de toneladas métricas ao ano, considerando que o consumo dos produtos é maior que a capacidade de tratamento dos resíduos.

Segundo dados do Banco Mundial (2018), o Brasil produz 11,3 milhões de toneladas de lixo plástico por ano, fazendo com que ocupe a 4ª posição no *ranking* mundial. Deste total, apenas 1,28% é efetivamente reciclado, sendo um dos menores índices da pesquisa e estando muito abaixo da média global, a qual é de 9%. Sendo assim, 7,7 milhões de toneladas de plástico são destinadas aos aterros sanitários e outras 2,4 milhões de toneladas são descartadas a céu aberto sem qualquer tipo de tratamento.

Uma alternativa para diminuir o impacto ambiental causado pelo descarte inapropriado dos plásticos petroquímicos é a substituição por materiais menos agressivos ao meio ambiente, como os polímeros biodegradáveis (MARINHO *et al.*, 2018). Uma possibilidade é o uso dos polihidroxialcanoatos (PHAs), os quais são uma classe de poliésteres sintetizados por diversos micro-organismos que atuam como reserva energética das células. Dentre os PHAs, o polihidroxibutirato (P(3HB)) foi o primeiro a ser descoberto e tem grande potencial de substituição do plástico convencional, porém, seu elevado custo de processamento ainda é uma obstrução (HASSEMER, 2016).

Os PHAs são amplamente explorados por apresentarem propriedades diferenciadas, alta biodegradabilidade e natureza renovável. Um estudo realizado por Essel e Carus (2012) demonstraram que a produção de 1 kg de PHA, quando comparada a produção desta mesma quantidade de plástico derivado do petróleo, pode evitar a emissão de 2 kg de dióxido de carbono (CO₂). As fontes de matéria orgânica utilizadas na produção comercial de PHAs apresentam um valor muito expressivo do processo, portanto, estes custos devem ser reduzidos para que se torne uma alternativa viável e possível de ser aplicada em larga escala (RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2018).

O P(3HB) é um dos PHAs de maior expressividade na representação destes polímeros. Na década de 1970, empresas sediadas na Inglaterra passaram a investir em pesquisas direcionadas a tornar rentável a produção e extração de P(3HB) de culturas bacterianas, empregando açúcares de plantas como fonte de nutrientes. Além, de provar ser possível produzir o polímero a partir de materiais renováveis, estes estudos verificaram que algumas das suas propriedades eram semelhantes às do polipropileno (PP). Em decorrência destes resultados, a síntese biológica de P(3HB) passou a ser um dos principais focos dos estudos relacionados ao material (HASSEMER, 2016).

A extração de compostos de fontes naturais é a aplicação de maior interesse no que tange a extração por fluido supercrítico. Esse método de extração apresenta inúmeras vantagens quando relacionada aos métodos convencionais: é um processo flexível devido a possibilidade de manipular o solvente, elimina o resíduo gerado por solventes orgânicos, assim como a etapa de pós-processamento dos extratos para a eliminação de solventes, a qual é a mais cara de todo o processo (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Além disso, mais que uma tecnologia promissora na extração de

compostos, a aplicação de fluidos supercríticos tem se mostrado eficiente na purificação de polímeros já extraídos (DALY *et al.*, 2018).

Iniciativas como a eliminação de sacolas plásticas, ações para limpeza de praias, as proibições do uso de microesferas em cosméticos, assim como do uso de canudos plásticos, entre outros, fazem parte de campanhas locais e de diligências mais complexas, como o pedido de “guerra” contra o plástico da Organização das Nações Unidas (ONU) em 2018. É ingenuidade crer na substituição completa do plástico petroquímico por um material sustentável, contudo, todo avanço é promissor. Neste contexto, a utilização de polímeros naturais biodegradáveis é uma alternativa que têm apresentado êxito quando aplicada e, sobretudo, é uma possibilidade profícua de proteger os recursos que ainda estão disponíveis e de recuperar os que já foram depreciados.

1 1. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral extrair e recuperar polihidroxibutirato (P(3HB)) produzido por *Bacillus megaterium* ATCC -14581. Os objetivos podem ainda ser delineados na forma de objetivos específicos: produzir P(3HB) em biorreator batelada simples, empregando substratos agro-industriais de baixo custo, como a água de parboilização de arroz (APA) e o efluente da lavagem de drageadeiras da indústria de balas (EIB); avaliar os efeitos da pressão, da temperatura e do co-solvente na extração e recuperação de P(3HB) via extração por fluido supercrítico, empregando dióxido de carbono (CO₂) como fluido pressurizado e, por fim, estudar os efeitos de diferentes técnicas de extração e recuperação de P(3HB), associada a extração por fluido supercrítico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Este item apresenta aspectos da literatura relacionados aos polímeros biodegradáveis, destacando os PHAs e, dentre eles, o P(3HB). Destacando, principalmente, a utilização de substratos agroindustriais na síntese de P(3HB), os sistemas de bioprodução e os fatores que os afetam, além dos métodos de extração e recuperação, salientando o uso da extração por fluido supercrítico para esse fim.

2.1. Polímeros biodegradáveis

Uma vez que a utilização de materiais alternativos ao plástico se tornou uma necessidade, os estudos relacionados a este tema se expandem cada vez mais. Os biopolímeros têm recebido grande atenção pelo fato de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis. Fatores ambientais e socioeconômicos são as principais razões do interesse nestes polímeros, pois a extração e refino de petróleo gera um enorme impacto ambiental, além de, por não se tratar de uma fonte renovável, estar se tornando escasso e progressivamente caro. A fim de melhorar as propriedades físicas e químicas do polímero, diferentes *blendes*, compósitos e nanocompósitos vêm sendo desenvolvidos e testados, fazendo com que o processamento e a aplicação se tornem viáveis (BRITO; AGRAWAL; ARAÚJO, 2011).

Os polímeros biodegradáveis são classificados em: agropolímeros, os quais têm como matéria-prima amido, quitina, proteína, entre outros, e poliésteres biodegradáveis, tratando-se dos polihidroxialcanoatos, ácido polilático, etc (AZEVEDO; ALMEIDA; SANTOS, 2017). É esperada estabilidade deste polímero durante o processamento e uso, isto é, que a degradação ocorra somente após o descarte. Para garantir o desempenho adequado, aditivos como estabilizantes térmicos e UV, cargas minerais e vegetais, nanocargas, agentes de cura e de enxertia, auxiliares de processamento (plastificantes e lubrificantes), entre outros, são utilizados (MARINHO, 2018).

2.1.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros granulares sintetizados como reserva energética intracelular por mais de 90 gêneros de micro-organismos e

algumas plantas. Na literatura são conhecidos mais de 150 monômeros que podem compor os polímeros, tornando possível a copolimerização em diferentes compostos, gerando uma grande diversidade de PHAs com propriedades distintas e, portanto, com várias aplicações. Os PHAs são poliésteres que podem apresentar características termoplásticas ou elastoméricas (HASSEMER, 2016; RAZA; ABID; BANAT, 2018).

As propriedades dos PHAs dependem dos monômeros que constituem o polímero, contudo, de forma geral, são insolúveis em água, tem boa resistência a ataques hidrolíticos e a UV, são biocompatíveis, se comportam como materiais piezoelétricos e afundam na água, o que facilita a biodegradação anaeróbica. Além disso, o PHA apresenta moléculas quirais e sua decomposição é basicamente influenciada por três fatores, o tipo e composição do polímero, as condições do ambiente em que está inserido e pelo micro-organismo que o produziu (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

As bactérias produtoras de PHA se dividem em dois grupos de acordo com as condições a que devem ser submetidas para que a síntese ocorra. Enquanto, um grupo necessita a limitação de um nutriente essencial (N, P, S, Mg, O₂) para produzir o polímero a partir de um excesso de carbono, o outro é capaz de acumular naturalmente grandes quantidades de PHA durante a fase de crescimento (GARCÍA *et al.*, 2013).

Na Figura 1, estão apresentadas algumas aplicações do PHA na medicina e na indústria.

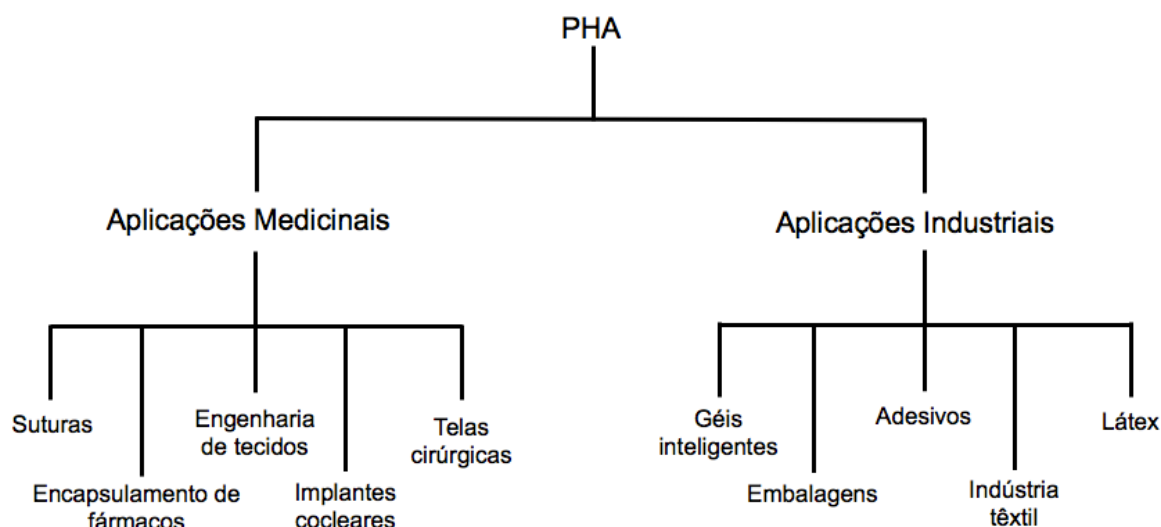


Figura 1. Aplicações na medicina e na indústria do PHA (PAKALAPATI, 2018).

2.1.2. Polihidroxibutirato (P(3HB))

O polihidroxibutirato (P(3HB)) é parte do grupo dos PHAs de cadeia curta (monômeros de 4 a 5 átomos de carbono) desenvolvido e patenteado pela *Imperial Chemical Industrie* em 1981. É um poliéster termoplástico, isto é, pode ser moldado em filmes para aplicações diversas. Produzido através de via bacteriana, apresenta boa resistência a umidade, é excelente barreira de gases e suas propriedades físicas se aproximam das do polipropileno. Contudo, são frágeis e apresentam uma elevada degradação a partir de 200°C (ALBUQUERQUE, 2019; LOBO, 2018; RAZA; ABID; BANAT, 2018).

O P(3HB) sólido é um material semicristalino, cujo grau de cristalinidade varia entre 60 e 90%. Essa característica é responsável por todas propriedades físicas e mecânicas do polímero, como, por exemplo, ser muito rígido e quebradiço. Quanto a sua massa molar, está na faixa de 10.000 a 3.000.000 g/mol quando produzido por bactérias (ALBUQUERQUE, 2019).

Por se tratar de um material biocompatível, o P(3HB) tem grande potencial para aplicações médico-veterinárias, como encapsulação de fármacos para liberação controlada, suturas e suportes de culturas de tecido para implantes. Além disso, é utilizado na agricultura, marinha, embalagens de alimentos, produtos de higiene pessoal, entre outros (ALBUQUERQUE, 2019).

O P(3HB) foi identificado na bactéria *Bacillus megaterium* pela primeira vez em 1925 pelo cientista francês Lemoigne (RAZA; ABID; BANAT, 2018). O polímero é sintetizado quando há carbono disponível no meio de cultura, mas a bactéria se encontra com algum nutriente como nitrogênio, fósforo, oxigênio limitado. Nessas circunstâncias, o P(3HB) é produzido e armazenado pela célula como reserva energética (BORGES, 2017).

2.2. Uso de substratos agro-industriais na síntese de P(3HB)

O desenvolvimento de novas formas de utilizar subprodutos e/ou coprodutos oriundos da cadeia produtiva da agricultura ou da indústria auxilia no aumento do equilíbrio entre produção e meio ambiente. O milho e o arroz são um dos grãos mais consumidos mundialmente, constituindo uma das principais bases da alimentação humana. Existem ainda diversos processos que alteram os grãos de forma a gerar

diferentes produtos, estes processos, no entanto acabam gerando subprodutos que não são consumidos ou utilizados pela indústria. Um dos principais processos é a moagem úmida do milho que gera como subproduto a água de maceração de milho (AMM) (ARAÚJO *et al.*, 2015).

A água de maceração de milho (AMM) é um coproduto do processo de maceração desse grão em água visando alterar suas propriedades pela remoção de compostos solúveis. Sendo assim, a água utilizada no processo adere grande parte desses elementos solúveis, o que faz com que ela seja rica em vitaminas, amoníacos e minerais, contendo 50% (m/m) de sólidos e pH ácido entre 3,7 – 4,7 (SIGMA-ALDRICH, 2010). Colet *et al.* (2017) e Urnau (2018) utilizaram, entre outros coprodutos, a AMM na bioprodução de carotenoides em sistema semi-contínuo por *Sporidiobolus salmonicolor* e obtiveram um aumento de 54% no rendimento do processo, quando comparado ao realizado com substratos tradicionais.

Outro coproduto de grande aplicabilidade em processos biotecnológicos é a água de parboilização de arroz (APA). O processo de parboilização consiste na imersão do grão em água, a qual deve atingir temperatura superior a 58°C para que o amido seja gelatinizado e retrogradado. A APA é, portanto, rica em fósforo e nitrogênio (proporção de N/F de 2 a 5), apresenta baixa viscosidade, pH ácido e coloração que varia entre o amarelo claro e o castanho (ABIAP, 2013).

A indústria de doces e balas também gera um efluente de interesse para a biotecnologia. Em razão da alta demanda química e bioquímica de O₂, além do grande volume de efluente gerado, o tratamento adequado é um processo que requer um grande investimento financeiro por parte das indústrias. Por ser rico em açúcares e gorduras, ele pode provocar impactos negativos ao meio ambiente quando descartado de forma inadequada. (MAQBOOL *et al.*, 2017; PAPADAKI *et al.*, 2018). Portanto, o desenvolvimento de novas aplicações dos coprodutos da indústria alimentícia é um grande aliado no aumento do equilíbrio entre produção e meio ambiente (NDUBUISI EZEJIOFOR; ENEBAKU; OGUEKE, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2015).

2.3. Sistemas de bioprodução de P(3HB)

Grande parte dos processos biotecnológicos têm sido conduzidos em frascos agitados, porém, quando há interesse de aplicação em larga escala, é conveniente realizar ensaios em biorreatores, considerando que eles representam adequadamente

a realidade industrial (MANOWATTANA *et al.*, 2018). Sendo assim, diversos sistemas podem ser empregados, como: descontínuo (batelada), semi-contínuo, descontínuo alimentado (batelada alimentada) ou contínuo. Estes processos são os mais seguros em relação a contaminação, porém podem apresentar baixos rendimentos devido a possíveis inibições por substrato ou produção de compostos secundários (SCHMIDELL *et al.*, 2001; LUNA-FLORES *et al.*, 2010).

2.3.1. Sistema de bioprodução em biorreator batelada simples

Em um sistema descontínuo, o mosto esterilizado no fermentador é inoculado com o micro-organismo de interesse estudado e incubado de modo que o processo ocorra sob condições controladas. O reator permanece lacrado durante todo o processo e nada além de oxigênio (no caso de processos aeróbicos), ácido ou base (controle de pH) e antiespumante são adicionados. Por fim, descarrega-se a dorna e o meio fermentado é conduzido para os tratamentos finais (URNAU, 2018).

Os sistemas em biorreator batelada simples apresentam baixos riscos de contaminação, elevada flexibilidade de operação, permitem a realização de fases sucessivas no mesmo recipiente, assim como, um controle rigoroso das condições para garantir a estabilidade genética do micro-organismo (SCHMIDELL *et al.*, 2001; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

2.3.2. Fatores que afetam a bioprodução de P(3HB)

Diferentes tipos de PHAs podem ser produzidos por diferentes tipos de micro-organismos, sejam eles procariontes ou eucariontes (RAZA; ABID; BANAT, 2018). Quanto a utilização do *Bacillus megaterium* como produtor de P(3HB), diversos estudos já foram realizados utilizando substratos distintos. Dhangdhariya *et al.* (2015) cultivaram uma cepa marinha de *B. megaterium* (JK4h) em caldo *Difco Sporulation Medium* (DSM) em estufa rotatória, buscando otimizar o meio de cultura para promover o maior acúmulo possível de polímero. O grupo suplementou o meio com peptona, extrato de levedura e glicose e os melhores resultados foram para as concentrações de $0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, $0,075 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ e $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, respectivamente. Neste ensaio, o acúmulo de biomassa foi de $0,06 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ($0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) com uma concentração de P(3HB) de 55,97%.

Obruca *et al.* (2011) cultivaram *B. megaterium* CCM 2037 utilizando soro de leite com concentração de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose e testaram o meio com e sem suplementação mineral, sendo que a produção de P(3HB) aumentou quase 10 vezes com a adição do meio mineral. Foi verificado que as concentrações de amônio, fósforo e magnésio não apresentaram influência significativa no acúmulo de biomassa e de P(3HB) e que o fator pressão osmótica acabou inibindo o crescimento celular. Sendo assim, uma diluição foi realizada no soro de leite até concentração de $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e nestas condições houve a produção de $2,51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomassa e 31,4% de P(3HB).

Os mesmos autores (OBRUCA *et al.*, 2010), ainda, adicionaram peróxido de hidrogênio e etanol no início da fase estacionária como agentes promotores de estresse. A adição de 1% de etanol aumentou a concentração de P(3HB) em 41%, quando comparado ao controle. Este aumento na síntese do polímero é justificado pelo metabolismo de oxidação do etanol que produz a Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), uma das moléculas necessárias para o metabolismo de acúmulo de P(3HB).

2.4. Métodos de extração e recuperação de P(3HB)

Por se tratar de um polímero intracelular é necessário aplicar um método adequado para remover o P(3HB) do interior da célula. Na literatura são citados alguns métodos de separação como, por exemplo, extração com solvente, rompimento celular por ação mecânica, digestão da biomassa, tecnologia ultrassom, extração supercrítica, entre outros (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

A extração por solvente é o método mais usual por ser simples e rápido. Envolve, basicamente, duas etapas: a modificação da permeabilidade da membrana celular da célula através de um solvente (clorofórmio, dicloreto, alguns álcoois, ésteres, cetonas), permitindo a solubilização do polímero, seguida por uma precipitação em composto não solvente (água ou etanol) (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011).

Na digestão celular, seja por agentes químicos ou por enzimas, o material celular (proteínas, lipídios, carboidratos) é digerido, enquanto os grânulos do polímero permanecem. No processo enzimático, as enzimas (fosfolipases, proteases e lecitinas) atacam e degradam a membrana celular, já no ácido, agentes surfactantes

são utilizados, como detergentes e hipoclorito de sódio (KESSLER et al., 2001; POSADA; NARANJO; LOPEZ; et al., 2011).

Outros métodos recentemente descritos na literatura são a tecnologia de ultrassom e a extração por fluido supercrítico. A tecnologia de ultrassom, a qual permite aumentar a taxa de transferência de massa do sistema, e, pode ser aplicada em conjunto com a extração por solvente, auxiliando na permeabilidade dele entre a membrana das células (KOSSEVA; RUSBANDI, 2018). Já o uso de tecnologia supercrítica, tem se tornado atraente para a indústria devido principalmente a sua atoxicidade, grande potencial de recuperação, possibilitando a obtenção de um produto com alto grau de pureza (DALY et al., 2018; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

2.4.1. Extração por fluido supercrítico

Na tecnologia supercrítica os principais fluidos puros aplicados neste processo são CO₂, amônia e metanol, dentre os quais ensaios com CO₂ apresentam a maior eficiência na extração de lipídeos e demais compostos hidrofóbicos. O diagrama de fases do CO₂ em função da temperatura e da pressão está apresentado na Figura 2, sendo possível observar que o ponto crítico desse gás se dá em temperatura igual a 31,06 °C e a pressão 73,83 bar. Dentre as vantagens do uso do CO₂ supercrítico em relação a solventes orgânicos, destacam-se a sua não toxicidade, o baixo custo, as condições críticas relativamente seguras e fáceis de alcançar, além de ser inerte e não inflamável (RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN, 2002).

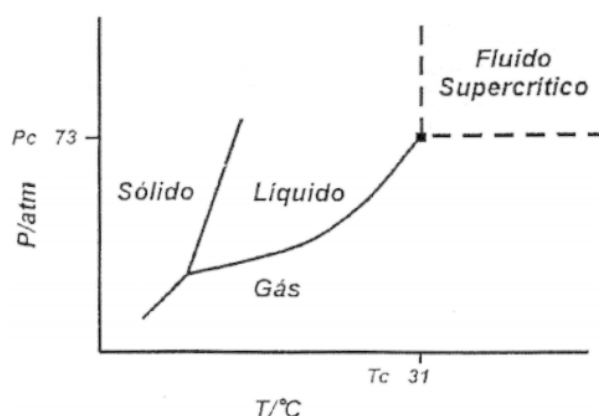


Figura 2. Diagrama de fases do dióxido de carbono em função da temperatura e pressão (CARRILHO, TAVARES e LANÇAS, 2001).

Khosravi-Darani *et al.* (2003) testaram a solubilidade do P(3HB) em CO₂ supercrítico variando a pressão entre 122 e 355 bar e a temperatura entre 34,85 e 74,85 °C. O estudo demonstrou que a solubilidade do polímero aumentou conforme o aumento da pressão em temperatura constante, sendo que a influência da pressão na solubilidade foi maior em temperaturas mais altas, o que está de acordo com a literatura, isto é, a densidade de um fluido supercrítico deve aumentar a fim de melhorar a eficiência da extração pelo aumento da sua solubilidade. Em outro estudo desenvolvido por Khosravi-Darani *et al.* (2004), utilizando CO₂ a 200 bar e 30°C juntamente com NaOH 4% (m/m), foi possível extrair 81% do total de P(3HB) produzido por células de *Cupriavidus necator*. Os autores apontaram o NaOH como fator auxiliar no rompimento da parede da célula e no arraste do polímero para o meio.

Daly *et al.* (2018), tendo em vista a remoção de resíduo de óleo vegetal para a aplicação de P(3HB) na área biomédica, realizaram ensaios utilizando CO₂ supercrítico a 150 bar e 50°C como solvente. Aplicando apenas CO₂ supercrítico, foram removidos 73% dos contaminantes, enquanto que ao adicionar etanol como co-solvente, a taxa de remoção passou a ser igual a 93%. A extração supercrítica possibilita a obtenção de um produto com alto grau de pureza, alcançando valores entre 86 e 99%. Portanto, é pertinente como essa tecnologia pode ser aplicada não apenas na extração de PHAs, mas também na purificação de polímeros já extraídos (KESSLER *et al.*, 2001; HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; REDEL *et al.*, 2013; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

Khosravi-Darani *et al.* (2004) avaliaram as variáveis que afetam a ruptura celular do processo de recuperação supercrítica de P(3HB) de células de *Ralstonia eutropha*. Foram estudados entre outros parâmetros: pressão de trabalho (200 a 300 bar), temperatura (25 a 35 °C) e liberação de pressão supercrítica de CO₂ (1 a 3 vezes). As condições ótimas para rompimento celular usando CO₂ supercrítico foram 200 bar, 30 °C e 1% (v/v) de tolueno como co-solvente com pressão liberada duas vezes. A recuperação de P(3HB) foi determinada por cromatografia gasosa e o rendimento foi de 81,64%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo

A bactéria utilizada nos ensaios foi a *Bacillus megaterium* ATCC 14581, a qual foi adquirida da Fundação André Tosello e se manteve armazenada em ultra freezer (MDF-U3086S, Sanyo Electric Co., Japão) a -80 ± 2 °C, em solução crioprotetora (20% glicerol), até o momento de sua utilização.

3.2. Bioprodução de P(3HB) em biorreator batelada simples

Os ensaios em biorreator batelada simples foram conduzidos em biorreator (Biostat B, B. Braun Biotech International Co., Alemanha) com volume total correspondente a 2 L e volume de trabalho de 1 L. O frasco foi acoplado a uma unidade de controle que permitiu o monitoramento da velocidade de agitação e temperatura do meio de cultura. A aeração do sistema foi realizada utilizando ar ambiente bombeado via compressor (Inalar Compact, NS, Brasil). O tempo de bioprodução foi mantido fixo (32 h), assim como a temperatura (30°C), por meio da circulação de água pelas paredes externas do fermentador, aeração (4 vvm) e agitação mecânica (500 rpm), conforme metodologia previamente definida por Hassemer (2019) em ensaios de maximização da bioprodução de P(3HB).

Na bioprodução foram empregados dois coprodutos da agroindústria de alimentos nas respectivas quantidades: 600 mL de efluente da lavagem de drageadeiras da indústria de balas (EIB), adquirido em uma indústria de balas e doces da região do Alto Uruguai do estado do Rio Grande do Sul, e 400 mL da Água de Parboilização de Arroz (APA), cedida pela Indústria Nelson Wendt (Pelotas, Rio Grande do Sul), totalizando 1 L. Além disso, este meio foi enriquecido com uma solução de micronutrientes cujas concentrações estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição do meio mineral.

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
Na ₂ HPO ₄	3,6
KH ₂ PO ₄	1,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Ácido Cítrico	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,008
Sol. Micronutrientes*	1

*Unidade de medida: mL·L⁻¹

Tabela 2. Composição da solução de micronutrientes.

Composto	Concentração (mg·L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	30
NiSO ₄ ·7H ₂ O	30
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10

3.3. Recuperação do P(3HB)

A fins de comparação, foram utilizados dois métodos de recuperação do biopolímero, sendo o primeiro convencional via extração química e o segundo um método alternativo, ainda pouco explorado, a extração por fluido supercrítico.

3.3.1. Recuperação via extração química

A metodologia empregada para realizar a recuperação química do P(3HB) foi proposta por Faccin (2012) e Hassemer (2016). Para tal, 0,01 a 0,04 g de biomassa seca foram pesadas em tubos de ensaio com rolha e tampa de rosca. Foi adicionado 2 mL de 1,2- dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (20% HCl) e 200 µL de controle interno (50 mL de n-propanol com 2 g de ácido benzoico). Em seguida, os tubos foram aquecidos até 80°C por 3 h em banho termostatizado (521/30 Nova Ética, Brasil) com agitação em intervalos de 20 min para otimizar a permeação dos solventes. Os tubos foram mantidos em repouso até atingirem 25 °C e receberam 4 mL de água destilada. Por fim, foram agitados para que os solventes fossem separados e o extrato foi quantificado via cromatografia gasosa.

3.3.2. Recuperação por fluido supercrítico

A recuperação de P(3HB) foi realizada via extração por fluido supercrítico, empregando dióxido de carbono (CO_2) como fluido pressurizado e 3 co-solventes: isopropanol, etanol e propanol. O sistema de extração supercrítica foi constituído por uma bomba de CO_2 de alta pressão (260D Syringe pump, Teledyne, Estados Unidos), uma bomba de deslocamento positivo destinada à adição do co-solvente (Lab Alliance Série III, Estados Unidos), um banho termostaticado (TE 184, Tecnal, Brasil) e um vaso de extração encamisado com volume igual a 145 cm^3 (diâmetro interno de 2,45 cm e comprimento de 30,7 cm). A temperatura de extração foi controlada a partir de um banho termostaticado (MA-184, Marconi, Brasil). As válvulas, manômetro, termopar e indicadores de temperatura e pressão também estão presentes na unidade. O sistema está apresentado na Figura 3.

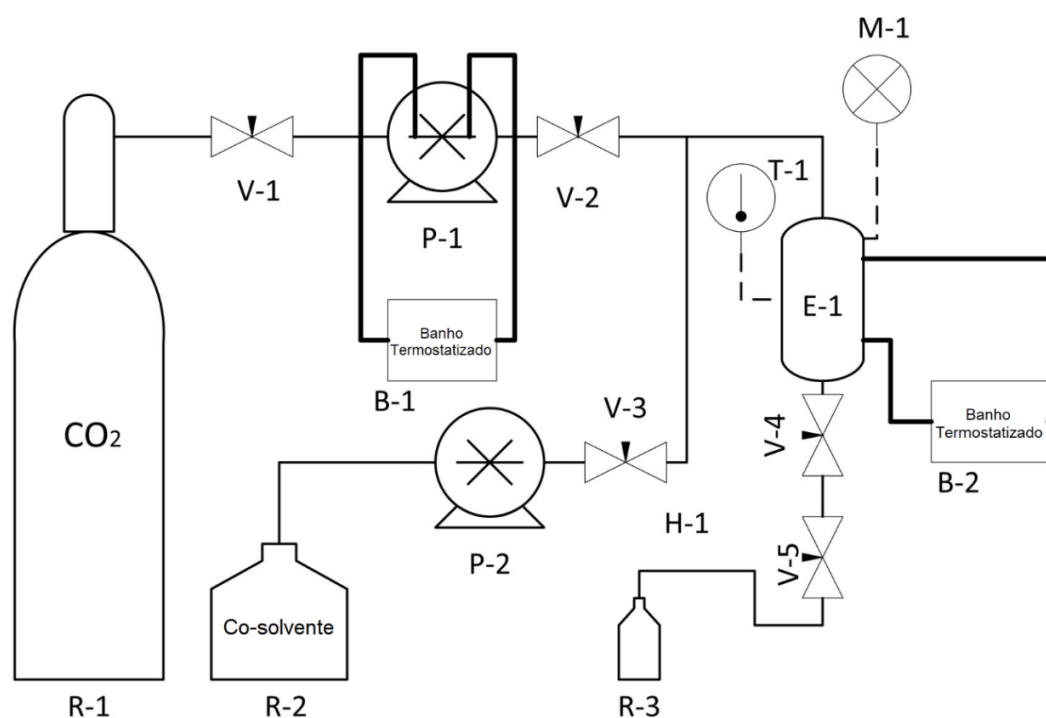


Figura 3. Diagrama do sistema de extração por fluido supercrítico. V-1, V-2, V-3 e V-4: válvula macrométrica de agulha; V-5: válvula micrométrica de agulha; R-1: cilindro de CO_2 ; R-2: reservatório de co-solvente; R-3: coletor do extrato; P-1: bomba de seringa; P-2: bomba do co-solvente; E-1 vaso de extração; B-1, B-2: banho termostaticado; T-1: termopar; M-1: manômetro (adaptado de SANTOS *et al.*, 2017).

Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares visando avaliar a cinética de recuperação do polímero e tempos de extração de 5 a 60 min, sendo os ensaios conduzidos segundo metodologia proposta por Daly *et al.* (2018), com adaptações. A extração consistiu na adição de aproximadamente 2 g de biomassa no cilindro de extração e 50 mL de diferentes co-solventes (Tratamento 1 – iso-propanol, Tratamento 2 – etanol e Tratamento 3 – propanol). Em seguida, foi injetado dióxido de carbono (CO₂) no sistema até a pressão de trabalho desejada ser atingida. Assim que a pressão passava a ser estável, o sistema era aquecido gradativamente até atingir a temperatura de trabalho. Com a temperatura estabilizada, foi realizada uma recuperação global, sendo que o extrato recuperado foi seco em estufa a vácuo (Q819V2, Quimis, Brasil) para a remoção do solvente residual. Por fim, o extrato bruto foi resuspendido em 2 mL de 1,2-dicloroetano contendo 200 µL de controle interno (50 mL de etanol ou iso-propanol com 2 g de ácido benzoico) e quantificado via cromatografia gasosa.

Ainda, foram realizados experimentos cinéticos (5 a 60 min) empregando etanol (Tratamento 2) e propanol (Tratamento 3) como co-solventes, fixando-se a pressão de 150 bar e a temperatura de 50°C (Daly *et al.*, 2018) e iso-propanol (Tratamento 1), com ensaios variando-se a pressão de 40 a 150 bar e a temperatura de 40 a 60°C, empregando metodologia de planejamento de experimentos (Delineamento Composto Central Rotacional - Planejamento fatorial completo 2²).

3.4. Quantificação de P(3HB)

A quantificação de P(3HB) foi realizada seguindo metodologia descrita por Hassemer (2016), utilizando cromatógrafo gasoso (CG-2010, Shimadzu, Japão) equipado de amostrador e injetor automático (AOC-20i e AOC-20s, respectivamente) e detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio (N₂) com vazão de 2 mL L⁻¹. A coluna utilizada foi a Rtx-Wax (30 cm x 0,25 mm) com temperatura inicial de 120°C e aumento de 10°C por minuto até 190°C. As temperaturas do injetor e do detector permaneceram em 250°C ao longo da corrida.

Para cada experimento foi utilizada uma curva de calibração (0,005 a 0,040 g) com P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich), a fim de diminuir a margem de erro levando em conta as possíveis variações na temperatura do processo.

3.5. Avaliação estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância – ANOVA, seguido pela diferença da média pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, com auxílio do software Statistica, versão 5.0. Especificamente, os resultados do Tratamento 1, no qual avaliou-se o efeito da temperatura e da pressão na recuperação do biopolímero via extração por fluido supercrítico foram tratados pela metodologia de planejamento de experimentos, a nível de 95% de confiança, com auxílio do software Statistica, versão 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados dos ensaios realizados contrapondo a recuperação do P(3HB) via extração química com o método não convencional por fluido supercrítico.

4.1. Recuperação do P(3HB) via extração química

A recuperação química global do biopolímero foi realizada em triplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Os ensaios foram realizados em diferentes bateladas simples em biorreator utilizando resíduos agroindustriais e verifica-se que a recuperação média variou de 65,58% a 81,57%. A resposta de P(3HB) em gramas foi dada pela multiplicação entre a razão da área do produto (%) e a área do padrão (%) pelo coeficiente angular da curva padrão do P(3HB), o qual foi igual a 0,0308.

Tabela 3. Recuperação química do P(3HB).

Ensaio	Massa de Amostra (g)	Área do Produto (%)	Área do Padrão (%)	$\frac{\text{Área Prod. (\%)}}{\text{Área Padrão (\%)}}$	P(3HB) (g)	P(3HB)* (%)
1	0,0393	506871,80	605757,20	0,84	0,0258	65,58 ^b ± 3,28
2	0,0382	341839,80	338595,70	1,01	0,0311	81,40 ^a ± 4,07
3	0,0407	390213,20	362028,30	1,08	0,0332	81,57 ^a ± 4,89

*média ± desvio padrão seguido de letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 95% de confiança (Teste de Tukey).

Os ensaios 2 e 3 não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e foram os que apresentaram as maiores taxas de recuperação média do biopolímero de 81,40% e 81,57%, respectivamente. A variação de aproximadamente 15% em relação ao Ensaio 1 pode estar vinculada a incerteza da composição dos resíduos agroindustriais os quais compõe o meio de cultura, isto é, a variação de quantidade de substratos presentes no meio implica diretamente na quantidade de biomassa resultante. Por ser a síntese do biopolímero intracelular e associado ao crescimento celular, onde há mais biomassa, há consequente maior produção do biopolímero.

4.2. Recuperação do P(3HB) por fluido supercrítico

Os efeitos da pressão e da temperatura na recuperação do biopolímero via extração por fluido supercrítico foram avaliados utilizando iso-propanol como co-solvente. A matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores reais e codificados) está apresentada na Tabela 4, assim como as respostas em termos de massa de P(3HB) e porcentagem de P(3HB). A resposta de P(3HB) em gramas foi dada pela multiplicação entre a razão da área do produto (%) e a área do padrão (%) pelo coeficiente angular da curva padrão do P(3HB), o qual foi igual a 0,0204.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores reais e codificados) e respostas em termos de massa de P(3HB) e porcentagem de P(3HB) utilizando iso-propanol como co-solvente.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas				
	X ₁	X ₂	Massa de amostra (g)	Área do Produto (%)	Área do Padrão (%)	Área Prod. (%) Área Padrão (%)	PHB (g)	PHB (%)
1	-1 (90)	-1 (40)	2,0034	2875640,8	5251882,1	0,55	0,0112	6,48
2	1 (140)	-1 (40)	2,0078	1711061,7	5240741,7	0,33	0,0067	4,13
3	-1 (90)	1 (60)	2,0047	3408970,3	4942396,2	0,69	0,0141	5,80
4	1 (140)	1 (60)	2,0031	3782860,4	5247164,8	0,72	0,0147	6,18
5	-1,41 (79,75)	0 (50)	2,0070	2614084,8	5557255,7	0,47	0,0096	5,17
6	1,41 (150,25)	0 (50)	2,0070	389501,9	5593703,2	0,07	0,0014	1,42
7	0 (115)	-1,41 (35,9)	2,0010	2409260,8	5200658,7	0,46	0,0095	4,59
8	0 (115)	1,41 (64,1)	2,0043	3230751,3	4597979,7	0,70	0,0143	5,78
9	0 (115)	0 (50)	2,0020	404587,5	5243688,2	0,08	0,0016	3,54
10	0 (115)	0 (50)	2,0051	2793952,1	5460122,8	0,51	0,0104	5,04
11	0 (115)	0 (50)	2,0058	2404642,7	4928881,5	0,49	0,0100	4,61

* X₁ = pressão (bar) e X₂ = temperatura (°C); Variáveis independentes fixas: quantidade de célula (2 g)

As maiores recuperações do biopolímero ocorreram nos ensaios 1 e 4, seguidos dos ensaios 3 e 8, com valores compreendidos na faixa de 5,77 a 6,48%, sendo que a maior recuperação foi em pressão igual a 90 bar e temperatura de 40°C. Os resultados foram tratados estatisticamente e podem ser melhor visualizados na Figura 4, pelo Gráfico de Pareto o qual apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas na recuperação do biopolímero, empregando iso-propanol como co-solvente.

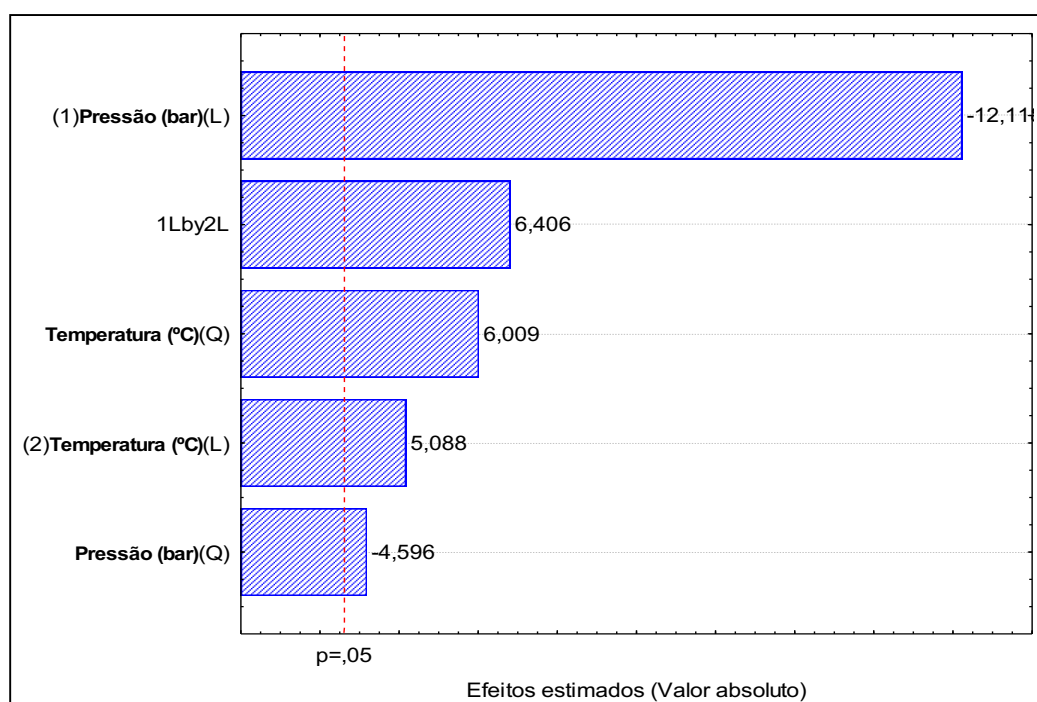


Figura 4. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis temperatura e pressão na recuperação do biopolímero por CO₂ supercrítico empregando iso-propanol como co-solvente.

De acordo com a Figura 4, verifica-se que a temperatura e a interação temperatura e pressão apresentam efeitos positivos na recuperação do P(3HB), demonstrando que nesse caso há maior permeabilização do solvente na célula. Embora o efeito associado da pressão e da temperatura tenha sido verificado, ao comparar os resultados com os apresentados pela Tabela 3 (recuperação via extração química), observa-se que ao utilizar o método alternativo a recuperação foi aproximadamente 75% inferior, assim como quando comparado a estudos relatados na literatura com biopolímeros sintetizados por outros microrganismos, como, por exemplo, no estudo realizado por Khosravi-Darani *et al.* (2004), utilizando CO₂ a 200

bar e 30°C juntamente com NaOH 4% (m/m), no qual a resposta de recuperação foi de 81% do total de P(3HB) produzido por células de *Cupriavidus necator*.

Uma possível explicação para o fato de que a melhor resposta obtida (6,48%) tenha sido em 90 bar, isto é, uma das pressões mais baixas utilizadas no estudo, é que a membrana citoplasmática da célula se rompe mais rapidamente que a parede celular em altas pressões, o que faz com que o material intracelular se difunda, a parede celular encolha e, portanto, a eficiência da ruptura celular seja menor. Além disso, foi visto que manter a temperatura próxima da temperatura supercrítica do CO₂ irá provocar uma alteração máxima no volume do gás quando ele for injetado, causando mais perturbação na parede celular das células (Khosravi-Darani *et al.*, 2004).

Em função que ao utilizar o co-solvente isopropanol as recuperações foram consideradas baixas (máximo de 6,48%), na sequência realizaram-se experimentos cinéticos (5 a 60 min) empregando etanol e propanol como co-solventes, fixando-se a pressão de 150 bar e a temperatura de 50°C (Daly *et al.*, 2018). As Tabelas 5 e 6 e Figuras 5 e 6 apresentam os resultados da recuperação do biopolímero em diferentes tempos de tratamento e a taxa de recuperação cumulativa, quando empregou-se como co-solvente o etanol (Tratamento 2) e propanol (Tratamento 3), respectivamente.

Tabela 5. Recuperação do P(3HB) via extração por fluido supercrítico utilizando etanol como co-solvente.

Tempo * (min)	Extrato (g)	Área do Produto (%)	Área do Padrão (%)	Área Prod. (%) Área Padrão (%)	PHB (g)	PHB (%)
5	0,065	204433,80	1695176,80	0,1206	$2,40 \times 10^{-6}$	3,37
10	0,027	14929,30	1801080,70	0,0083	$1,00 \times 10^{-4}$	6,26
15	0,019	5928,00	1886497,70	0,0031	$6,41 \times 10^{-5}$	37,85
20	0,011	3381,20	3066761,50	0,0011	$2,25 \times 10^{-5}$	2,04
30	0,023	4461,50	1960989,90	0,0023	$4,64 \times 10^{-5}$	2,02
45	0,034	6856,10	1843108,80	0,0037	$7,59 \times 10^{-5}$	2,23
60	0,026	3736,30	1696195,30	0,0022	$4,49 \times 10^{-5}$	1,73

*Variáveis fixas: Célula (2 g); pressão (150 bar); temperatura (50 °C)

Tabela 6. Recuperação do P(3HB) via extração por fluido supercrítico utilizando propanol como co-solvente.*

Tempo (min)	Extrato (g)	Área do Produto (%)	Área do Padrão (%)	$\frac{\text{Área Prod. (\%)}}{\text{Área Padrão (\%)}}$	P(3HB) (g)	P(3HB) (%)
5	0,001	14229,0	1290751,8	0,0105	0,0002	21,35
10	0,002	14145,1	1351509,7	0,0253	0,0005	25,77
15	0,003	38659,7	1530030,8	0,0073	0,0001	4,98
20	0,005	9076,4	1238984,1	0,0071	0,0001	2,91
30	0,010	12146,8	1705844,3	0,0011	0,0000	0,23
45	0,002	1544,3	1354269,2	0,0146	0,0003	14,90
60	0,003	18574,2	1271542,3	0,0086	0,0002	5,85

*Variáveis fixas: Célula (2 g); pressão (150 bar); temperatura (50 °C)

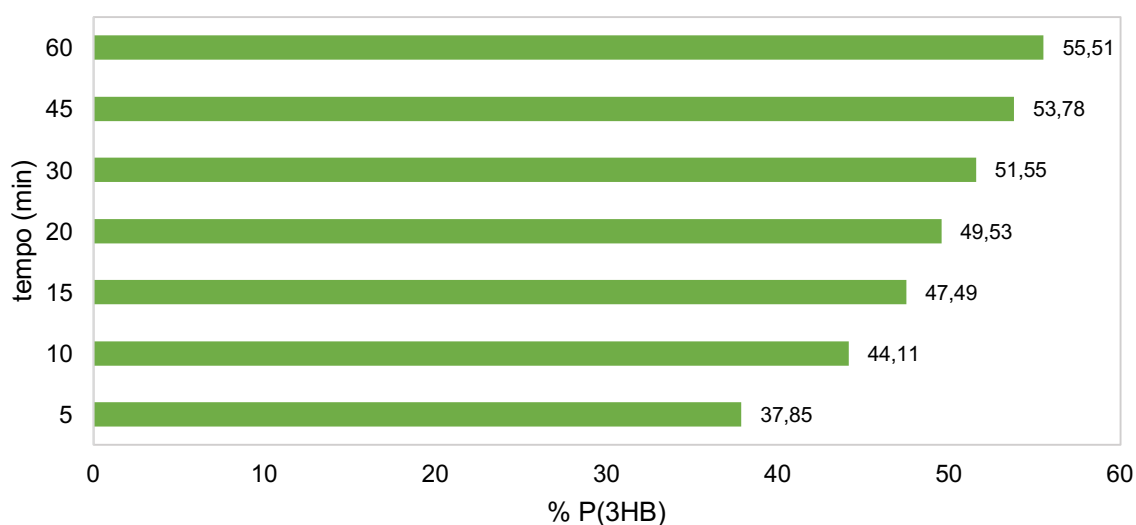


Figura 5. Recuperação cumulativa do P(3HB) durante o período de tratamento por CO₂ supercrítico utilizando etanol como co-solvente.

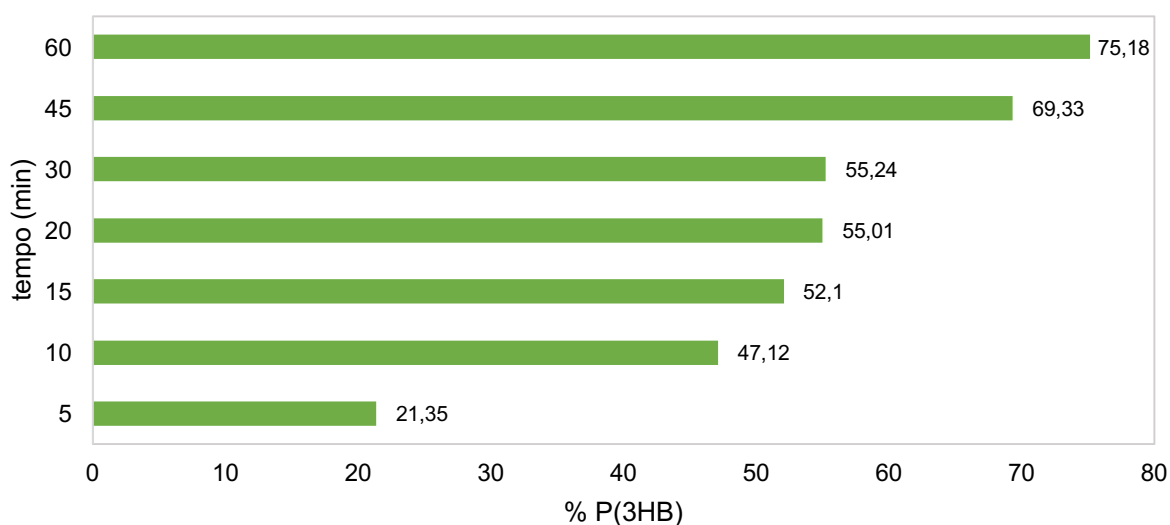


Figura 6. Recuperação cumulativa do P(3HB) durante o período de tratamento por CO₂ supercrítico utilizando propanol como co-solvente.

Em ambos os tratamentos (Tabela 5 e 6), as maiores recuperações de P(3HB) foram em até 15 min, sendo que ao utilizar o etanol como co-solvente (Figura 5), havia uma recuperação cumulativa média de 55,51%, enquanto que ao utilizar propanol (Figura 6) a recuperação cumulativa foi de 75,18% do do biopolímero, com 15 min de tratamento. Na Tabela 6 e Figura 6 há um incremento na recuperação do biopolímero com 45 e 60 min, o que pode ser explicado pela maior permeabilização da célula conforme o aumento do tempo de contato, facilitando a recuperação do residual do polímero.

Um estudo apresentado por Khosravi-Darani *et al.* (2004) utilizando tolueno como co-solvente alcançou 81,64% de recuperação do biopolímero produzido por células de *Ralstonia eutropha*. Já Daly *et al.* (2018) atingiu valores de pureza de P(3HB) compreendidos em uma faixa de 86 a 99% utilizando, da mesma forma, extração por fluido supercrítico.

Ao comparar os resultados (Tabela 6 e Figura 6) com os relatados na literatura, verifica-se que os resultados obtidos neste estudo ainda são inconclusivos. Os resultados indicam ser o propanol o co-solvente promissor e sugere-se que pré-tratamentos de permeabilização da célula sejam realizados, como exemplo empregando uma mistura de dicloroetano e n-propanol acidificado (Hassemer, 2016) e/ou NaOH 4% (Khosravi-Darani *et al.*, 2004), isolados ou associados ao sistema ultrassônico e/ou outros tratamentos como a maceração celular com nitrogênio líquido

(Valduga *et al.*, 2008), para posterior aplicação da extração por CO₂ supercrítico, visando a maximização da recuperação do biopolímero. Para mais, a pressão e a temperatura são fatores que também interferem na recuperação do biopolímero, portanto, avaliar como a variação desses parâmetros interfere na recuperação do biopolímero seria de grande interesse a fim de otimizar o processo.

O fato do P(3HB) ser um biopolímero intracelular e, portanto, sua recuperação depende do fator de permeabilidade celular. Caso haja uma restrição no rompimento da parede celular das células envolvidas no processo, a extração e/ou recuperação do biopolímero é menor, ou seja, residual de polímero fica retido na célula e esta massa celular é descartada. Alguns fatores associados à não permeabilização celular são relatados, como tempo de contato, utilização do solvente apropriado, quantidade de área superficial exposta, entre outros (HARRISON, 1991).

5. CONCLUSÃO

A extração química foi a metodologia que apresentou os melhores rendimentos de recuperação do P(3HB), atingindo uma resposta máxima de 81,57%. Quanto ao uso da tecnologia supercrítica, o uso de propanol como co-solvente proporcionou a melhor resposta de recuperação, sendo a recuperação cumulativa de 75,18%.

Apesar desse estudo ainda ser inconclusivo, a extração por fluido supercrítico. poderá ser uma alternativa na extração e recuperação de polímeros produzidos por microrganismos, além disso é considerada uma tecnologia limpa e ambientalmente amigável, o que é de grande interesse pelas indústrias e pela sociedade como um todo. Porém, essa tecnologia ainda é muito dispendiosa, o que limita sua aplicação em escala industrial, contudo, otimizar processos sustentáveis é algo que se deve buscar constantemente, pois assim é possível garantir que tanto a geração presente como as futuras poderão satisfazer as suas necessidades, assim como é um meio de proteger os recursos naturais ainda disponíveis e recuperar os que já foram explorados.

REFERÊNCIAS

- ABIAP. **O que diferencia o arroz branco do arroz parboilizado?** 2013. Disponível em: <http://www.abiap.com.br/site-pt/content/informativos/detalhe.php?informativo_id=94>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- ALBUQUERQUE, Rodrigo Melo Bezerra de. **Desenvolvimento de uma blenda biodegradável à base de celulose bacteriana (CB) e polihidroxibutirato (PHB) para aplicação como embalagem ativa para alimentos.** 2019. 131 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2019.
- ARAÚJO, Raphael De et al. Aproveitamento Da Água De Maceração De Milho Para Produção De Compostos Bioativos Por *Aspergillus Niger*. **E-xacta**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 15–29, 2015.
- AZEVEDO, Alexandre Reis; ALMEIDA, Victor Miranda; SANTOS, Suzana Arleno Souza. Síntese de bioplásticos feitos com polímeros naturais: uma alternativa para a gestão ambiental. **Conhecimento & Diversidade**, v. 9, n. 19, p. 59-70, 2018.
- British Broadcasting Corporation. **Submarino encontra plástico no ponto mais profundo dos oceanos.** Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-48261879>>. Acesso em 05 de jun. de 2020.
- BORGES, Fernanda. **Avaliação do desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli(3-hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium*.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- BRITO, G. F. *et al.* Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista eletrônica de materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
- CARRILHO, Emanuel; TAVARES, Maria Cecília H.; LANÇAS, Fernando M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química nova**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.
- COLET, Rosicler *et al.* Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 268– 274, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.015>>

CUPPINI, Mônica et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw salmon with supercritical CO₂ using experimental design. **Food Sci. Technol**, v. 36, supl. 1, July, p. 8-11, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-457x.0038>>.

DALY, Sean Ryan et al. A green process for the purification of biodegradable poly (β -hydroxybutyrate). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, p. 84-90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.007>>.

DHANGDHARIYA, Jaykishan H. et al. Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. **International journal of biological macromolecules**, v. 76, p. 254-261, 2015.

FACCIN, D. J. L. **Avaliações das condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2012.

GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda et al. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 29, n. 1, p. 77-115, 2013.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

HAIDER, Tobias P. et al. Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 1, p. 50-62, 2019.

HARRISON, Susan TL. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology advances**, v. 9, n. 2, p. 217-240, 1991.

HASSEMER, Guilherme de Souza. **Produção de P(3HB) Por *Bacillus megaterium* Utilizando Permeado de Soro de Leite**. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

HASSEMER, Guilherme de Souza. **Produção de polihidroxibutirato (P(HB)) por *bacillus megaterium* ATCC 14581 empregando coprodutos da agroindústria e recuperação do polímero via tecnologia supercrítica**. Qualificação de projeto (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

HEJAZI, Parisa; VASHEGHANI-FARAHANI, Ebrahim; YAMINI, Yadollah. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly (β -hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 5, p. 1519-1523, 2003.

KAZA, Silpa *et al.* **What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050**. World Bank Publications, 2018.

KESSLER, B. *et al.* Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. In: **Biopolyesters**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 159-182.

KHOSRAVI-DARANI, Kianoush *et al.* Solubility of poly (β -hydroxybutyrate) in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 48, n. 4, p. 860-863, 2003.

KHOSRAVI-DARANI, Kianoosh *et al.* Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly (R-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 6, p. 1757-1765, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1021/bp0498037>>

KOSSEVA, Maria R.; RUSBANDI, Edy. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 762-778, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>>

KUMAR, Prasun *et al.* Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>>

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **eXPRESS Polymer Letters**, v. 5, n. 7, 2011.

LOBO, A. M. M. S. **Desenvolvimento de Produtos com Novos Materiais Poliméricos Biodegradáveis**. 2018. 166 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Instituto Superior De Engenharia De Lisboa, Área Departamental de Engenharia Mecânica, Lisboa, 2018.

LUNA-FLORES, C.H.; RAMÍREZ-CORDOVA, J.J.; PELAYO-ORTIZ, C.; FEMAT, R.; HERRERA-LÓPEZ, E.J. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 131–136, 2010.

MANOWATTANA, A.; TECHAPUN, C.; WATANABE, M.; CHAYASO, T.
Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, p. 59-66, 2018.

MAQBOOL, Farhana et al. Confectionary wastewater treatment through upflow microbial fuel cell. **Desalination and Water Treatment**, [s. l.], v. 99, n. May, p. 248–254, 2017. Disponível em:
<http://www.deswater.com/DWT_abstracts/vol_99/99_2017_248.pdf>

MARINHO, Vithória Alexandre Duarte *et al.* Aditivação e Biodegradação de Compósitos PHB/Babaçu. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, p. 37-41, 2018.

MATA-GÓMEZ, L.C.; MONTANEZ, J.C.; MÉNDEZ-SAVALA, A.; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial cell factories**, v.13, p. 13-23, 2014.

NDUBUISI EZEJIOFOR, Tobias I.; ENEBAKU, Uchechi E.; OGUEKE, Chika. Waste to Wealth-Value Recovery from Agro- food Processing Wastes Using Biotechnology: A Review. **British Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 418–481, 2014. Disponível em:
<http://www.journalrepository.org/media/journals/BBJ_11/2014/Mar/Ezejiofor442013BBJ7017_1.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.

OBRUCA, Stanislav *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 947-953, 2011.

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

PAKALAPATI, Harshini *et al.* Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 126, n. 3, p. 282-292, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>>.

PAPADAKI, Aikaterini et al. Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 267, n. April, p. 311–318, 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241830912X>>

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.

RIEDEL, Sebastian L. *et al.* Recovery of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 461-470, 2013.

RODRIGUEZ-PEREZ, Santiago *et al.* Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. **Journal of environmental management**, v. 205, p. 215-230, 2018.

RAZA, Zulfiqar Ali; ABID, Sharjeel; BANAT, Ibrahim M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 45-56, 2018.

SANTOS, Ênio R. M. *et al.* Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.019>>

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: **Editora Blücher**, v. 2, 2001.

SIGMA-ALDRICH. **Corn steep liquor**. 2010. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4648?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

SILVA, Jéssica Rayanne Bezerra da. **Redução do consumo e sustentabilidade: um estudo do comportamento de redução do consumo de plásticos descartáveis**. 2019. 23 f. Monografia (Graduação em Administração). Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, 2019.

SUAREZ, Carlos Alberto Galeano *et al.* Assessment of the Metabolism of Different Strains of *Bacillus megaterium*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 485–490, 2012.

URNAU, Letícia. **Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Carotenoides por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em Biorreator Batelada Simples e Alimentada**. 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2018.

WESTON, Johanna N. J.; CARRILLO-BARRAGAN, Priscila; LINLEY, Thomas D.; REID, William D. K.; JAMIESON, ALAN J. New species of *Eurythenes* from hadal

depths of the Mariana Trench, Pacific Ocean (Crustacea: Amphipoda). **Zootaxa**, v. 1, p. 163-181, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4748.1.9>>.

WORLD WIDE FUND FOR NATURE. **Solucionar a Poluição Plástica:** Transparência e Responsabilização. Genebra: Dalberg, 2019.