



Área: Engenharia de Alimentos

RECUPERAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO POR *Bacillus megaterium* EMPREGANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E CO-SOLVENTES

Paloma Truccolo Reato¹, Rafaela Nery de Melo¹, Bruno Fischer¹, Guilherme de Souza Hassemer¹, Yen-Han Lin², Eunice Valduga¹, Alexander Junges^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Erechim, RS

*E-mail: junges@uricer.edu.br

²Departamento de Engenharia Química, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, SK S7 N 5A9, Canadá

RESUMO – Uma possível alternativa no combate ao acúmulo de plástico e seus resíduos é a produção de biopolímeros como os polihidroxianoatos (PHAs). Entre os PHAs, poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é um dos mais estudados, devido à sua aplicabilidade em uma grande gama de processos variados. Assim, o objetivo do presente estudo visou avaliar o potencial de extração do biopolímero do interior das células empregando dióxido de carbono (CO₂) supercrítico e como co-solventes, etanol e propanol. As condições de operação foram a pressão de 150 bar e temperatura de 50°C. Os resultados obtidos na recuperação com etanol ao final do processo foram de 55,51%, enquanto que o tratamento com propanol apresentou uma taxa de recuperação de 75,18% do biopolímero. A recuperação do polímero sob tecnologia supercrítica é uma alternativa na extração e recuperação de polímeros produzidos por microrganismos.

Palavras-chave: Polihidroxianoatos, P(3HB), Co-solvente, Etanol, Propanol.

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos plásticos para substituir papel ou vidro, tornou-se algo corriqueiro na sociedade moderna. Contudo, a durabilidade dos plásticos se torna um problema após o descarte dos mesmos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; FERNANDES, 2013; PAKALAPATI *et al.*, 2018). Uma possível alternativa é a produção de biopolímeros, dentre os quais os polihidroxianoatos (PHAs) podem ser citados. Os PHAs são poliésteres sintetizados por microrganismos como reserva energética. Estes compostos permanecem armazenados no interior das células e podem ser consumidos quando o microrganismo é submetido a situações de estresse. Em razão disto, os PHAs são completamente biodegradáveis, sendo consumidos por diversas bactérias presentes no solo e na água. Além disso, as propriedades mecânicas dos PHAs se assemelham as de vários polímeros convencionais (ISRANI; SHIVAKUMAR, 2013; LIN; CHEN, 2017; MOHAPATRA *et al.*, 2017).

O uso da tecnologia supercrítica tem se tornado atraente para a indústria devido a sua atoxicidade, e potencial de recuperação. Solvente mais comumente utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), sendo que o mesmo apresenta uma grande eficiência na extração de lipídeos e demais compostos hidrofóbicos. Existem diversas formas de conduzir o processo de recuperação supercrítica. A extração de compostos naturais é o foco de maior interesse no que se refere a extração por fluido supercrítico. Esta técnica de extração apresenta diversas vantagens quando comparada aos métodos convencionais, sendo que dentre elas podemos citar o fato de ser um processo flexível, devido a possibilidade de manipulação das propriedades do solvente. Além disso, o uso da tecnologia supercrítica reduz a quantidade de resíduos gerados por solventes orgânicos durante o processo. Além disso, o uso da tecnologia supercrítica reduz a quantidade de resíduos gerados para a eliminação de solventes, sendo que a remoção de solventes das amostras como sendo a etapa mais dispendiosa do processo. 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).

Outro ponto interessante em relação a tecnologia supercrítica é o potencial de aplicação não apenas na extração dos PHAs, mas também na purificação de polímeros já extraídos, uma vez que a extração supercrítica permite obter um produto com alto grau de pureza, obtendo em alguns casos polímeros com de 86 a 99 % de pureza (KESSLER *et al.*, 2001; HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; RIEDEL *et al.*, 2013; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018). Assim, o objetivo do presente estudo visou avaliar o potencial de extração do biopolímero P(3HB) do interior das células (*Bacillus megaterium* ATCC 14581) empregando dióxido de carbono (CO₂) supercrítico e como co-solventes, etanol e propanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS



A recuperação de P(3HB), por CO₂ supercrítico com emprego de propanol e etanol como co-solventes foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por Daly *et al.* (2018). Para isto, 2 g de biomassa seca foram adicionadas ao cilindro de extração, juntamente com 50 mL de co-solvente. Na sequência, CO₂ foi adicionado ao sistema até ele atingir a pressão de 150 bar. Após a estabilização da pressão, iniciou-se o aquecimento do sistema até a temperatura de 50°C. Com pressão e temperatura estabilizadas, ocorreu o processo de recuperação do polímero. O extrato obtido foi seco em estufa a vácuo para a remoção de resíduos de solvente. Por fim, o extrato bruto foi resuspenso em 2 mL de 1,2-dicloroetano contendo 200 µL de controle interno (50 mL de *n*-propanol com 2 g de ácido benzoico) e quantificado via cromatografia gasosa.

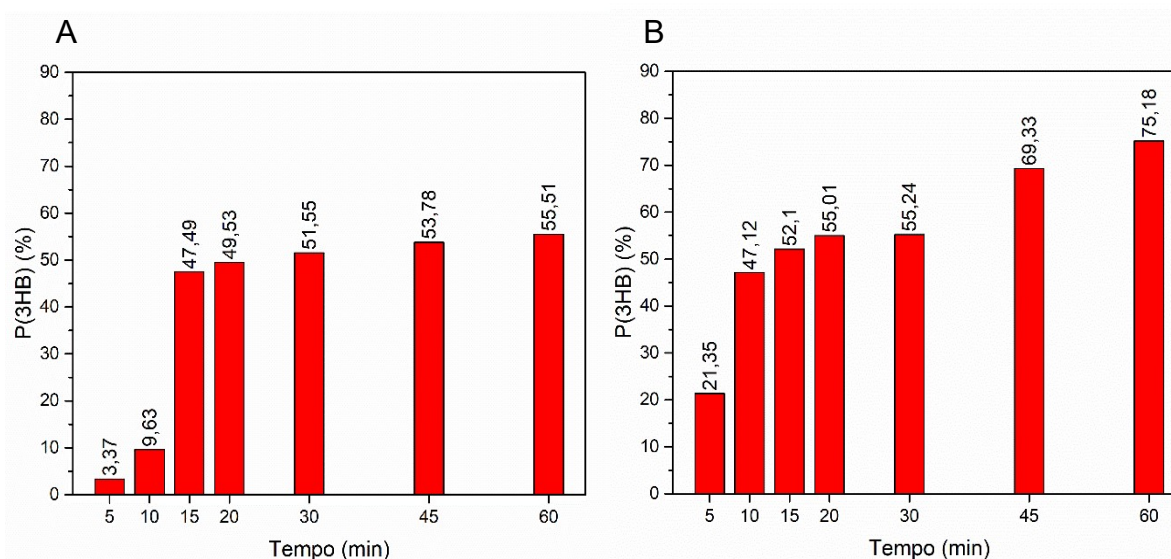
Para a quantificação de P(3HB) foi utilizado um cromatógrafo gasoso com amostrador e injetor automático e detector de ionização de chama (FID), utilizando N₂ com vazão de 2 mL·L⁻¹ como gás de arraste, seguindo metodologia proposta por Faccin *et al.* (2013) com modificações. A coluna utilizada foi Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm) com uma temperatura inicial de 120°C com aumento de 10°C por minuto até 190°C. A temperatura do injetor e do detector permanecem em 250°C ao longo da corrida. Para cada experimento foi utilizada uma curva de calibração (de 0,005 g a 0,040 g) com P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich) a fim de diminuir a margem de erro decorrente de possíveis variações na temperatura do processo de extração.

Os resultados de recuperação foram expressos em rendimento acumulativo (N = 3) de P(3HB) em função do tempo de extração (60 min).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1 apresenta os resultados da cinética de recuperação do biopolímero utilizando CO₂ supercrítico e como co-solventes etanol e propanol, nas condições de 150 bar e 50 °C, respectivamente.

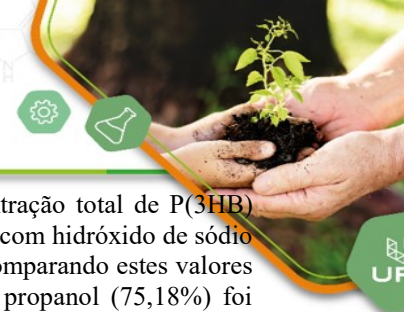
Figura 1 – Recuperação acumulativa de P(3HB) por CO₂ supercrítico utilizando etanol (A) e propanol (B) como co-solventes.



Observando a Figura 1, nota-se que ao se utilizar etanol (A), a recuperação acumulativa máxima obtida em 60 min foi de 55,51%, enquanto que o tratamento com propanol (B) foi de 75,18%. Daly *et al.* (2018) avaliaram a recuperação de P(3HB) previamente extraído via tecnologia supercrítica utilizando CO₂ (150 bar e 50 °C). Os autores foram capazes de obter uma taxa de recuperação de 73% sem utilizar nenhum co-solvente, sendo que ao se empregar etanol em conjunto com CO₂, a eficiência do processo chegou a 93%.

Os resultados obtidos Daly *et al.* (2018) se contrastam com os valores encontrados ao longo do presente estudo, contudo, o principal motivo para esta diferença significativa entre processos realizados sob as mesmas condições está na amostra analisada. Daly *et al.* (2018) utilizaram P(3HB) bruto, previamente extraído como amostra, buscando apenas a purificação do produto. Isto corrobora a hipótese de que a baixa eficiência do processo se dá devido a inabilidade do processo supercrítico romper completamente a membrana celular do *B. megaterium*, dificultando o arraste das moléculas de polímero pelo CO₂, já que as mesmas apresentam um alto peso molecular, podendo chegar a pesar até 1500 kDa (KHOSRAVI-DARANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2004; DARANI; MOZAFARI, 2010; DEMIRDÖĞEN *et al.*, 2018).

Khosravi-Darani & Vasheghani-Farahani (2004) avaliaram a recuperação de P(3HB) de células de *Ralstonia eutropha* por CO₂ supercrítico utilizando condições de 200 bar de pressão, 40°C e metanol como co-solvente.



O processo teve duração de 100 min e permitiu a recuperação de 59,2% a 68,3% da concentração total de P(3HB) presente na amostra. Os autores, no entanto, também realizaram um pré-tratamento da biomassa com hidróxido de sódio em concentrações variando de 0,2% a 0,8%, de modo a auxiliar na ruptura da parede celular. Comparando estes valores com os dados obtidos no presente estudo, nota-se que a taxa de recuperação ao se utilizar propanol (75,18%) foi superior aos valores encontrados por Khosravi-Darani & Vasheghani-Farahani (2004) (máximo de 68,3%), mesmo sem o tratamento prévio das amostras.

4 CONCLUSÃO

A recuperação do biopolímero P(3HB) produzido por *B. megaterium* empregando CO₂ supercrítico e propanol como co-solvente apresentou maior rendimento de extração (75,18%) em relação ao etanol (55,51% como co-solvente).

A tecnologia supercrítica poderá ser uma alternativa na extração e recuperação de polímeros produzidos por microrganismos, em relação as técnicas convencionais, além disso é considerada uma tecnologia limpa.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim e a CAPES.

6 REFERÊNCIAS

- DALY, Sean Ryan; FATHI, Ali; BAHRAMIAN, Bahareh; MANAVITEHRANI, Iman; MCCLURE, Dale D.; VALTCHEV, Peter; SCHINDELER, Aaron; DEGHANI, Fariba; KAVANAGH, John M. A green process for the purification of biodegradable poly(β -hydroxybutyrate). **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 135, n. January, p. 84–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.007>>
- DARANI, Kianoush Khosravi; MOZAFARI, Mohammad Reza. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review. **Journal of Biochemical Technology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 144–152, 2010.
- DEMIRDÖĞEN, Ruken Esra; EMEN, Fatih Mehmet; OCAKOGLU, Kasim; MURUGAN, Paramasivam; SUDESH, Kumar; AVŞAR, Göktürk. Green Nanotechnology for Synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanoparticles for sustained bortezomib release using supercritical CO₂ assisted particle formation combined with electrodeposition. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 436–445, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017316409>>. Acesso em: 29 jun. 2018.
- FACCIN, Débora Jung Luvizetto; RECH, Rosane; SECCHI, Argimiro Resende; CARDOZO, Nilo Sérgio Medeiros; AYUB, Marco Antônio Záchia. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 420–425, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511313000433>>
- FERNANDES, Ilizandra A. **Estudo da Imobilização de Lipases Utilizando Poli-Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato (Phbv) e Poliuretano (Pu) Como Suportes**. 2013. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, [s. l.], 2013.
- HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology progress**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1519–23, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14524714>>. Acesso em: 18 fev. 2016.
- ISRANI, Neetu; SHIVAKUMAR, Srividya. Combinatorial screening of hydrolytic enzyme/s and PHA producing *Bacillus* Spp., for cost effective production of PHAS. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 934–945, 2013.
- KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. **Biopolyesters**, [s. l.], 2001. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-40021-4_5>. Acesso em: 29 nov. 2015.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.
- KHOSRAVI-DARANI, Kianoush; VASHEGHANI-FARAHANI, Ebrahim. Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly (R -hydroxybutyrate) Recovery. [s. l.], 2004.
- KOSSEVA, Maria R.; RUSBANDI, Edy. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 762–778, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>>
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- LIN, Yong-Yang; CHEN, Po Ting. Development of polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Bacillus subtilis* with combination of PHB-associated genes derived from *Ralstonia eutropha* and *Bacillus megaterium*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 79, p. 110–115, 2017. Disponível em:



11° SIAL

Simpósio de Alimentos 2021

ISSN 2236-0409
v. 11 (2021)

Produção de alimentos, saudabilidade
e sustentabilidade ambiental

24, 25 e 26
de março de 2021



<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107017300846>>. Acesso em: 29 jun. 2018.

MOHAPATRA, Swati; MAITY, Sudipta; DASH, HIRAK Ranjan; DAS, Surajit; PATTNAIK, Swati; RATH, Chandi Charan; SAMANTARAY, Deviprasad. Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 12, p. 206–213, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580817301309>>. Acesso em: 29 jun. 2018.

PAKALAPATI, Harshini; CHANG, Chih-kai; SHOW, Pau Loke; ARUMUGASAMY, Senthil Kumar; LAN, John Chi-wei. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. In Press, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>>

RIEDEL, Sebastian L.; BRIGHAM, Christopher J.; BUDDE, Charles F.; BADER, Johannes; RHA, Chokyun; STAHL, Ulf; SINSKEY, Anthony J. Recovery of Poly (3-Hydroxybutyrate- co -3- Hydroxyhexanoate) From Ralstonia eutropha Cultures With Non-Halogenated Solvents. [s. l.], v. 110, n. 2, p. 461–470, 2013.