



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Recuperação de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Priestia megaterium* utilizando cloreto de 1-hexadecilimidazólio

Autor: Luca Araujo Frangipani

Orientadores: Prof^a. Dr^a Débora Jung Luvizetto Faccin

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Porto Alegre, março 2023

Autor: Luca Araujo Frangipani

Recuperação de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por
Priestia megaterium utilizando
cloreto de 1-hexadecilimidazólio

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química*

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Líliliana Amaral Feris, UFRGS

Me. Igor Luiz Gonçalves Pereira, UFRGS

Porto Alegre

2023

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Débora, Nilo e Henri, pela paciência, pela oportunidade de trabalhar com algo novo e instigante e pelos ensinamentos e correções que permitiram o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos meus pais, Márcio e Marta, pelo apoio incondicional ao longo do caminho trilhado.

E à minha namorada, Carolina, por estar sempre ao meu lado.

RESUMO

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis que apresentam potencial para serem aplicados em substituição a polímeros de origem petroquímica por possuírem características térmicas e mecânicas semelhantes a estes. O poli(3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] é um dos PHAs mais estudados por sua versatilidade de produção e aplicação. Esse polímero é produzido por algumas espécies bacterianas e, então, pode ser recuperado do interstício celular por métodos mecânicos, químicos ou biológicos. Destaca-se, dentre estes, a utilização de solventes orgânicos por ser o mais utilizado. O principal destes solventes é o clorofórmio, que é tóxico e nocivo ao meio ambiente; sendo, portanto, de grande importância a busca de alternativas mais sustentáveis e menos prejudiciais. Neste contexto, líquidos iônicos (LIs), que são sais que se apresentam líquidos a temperaturas de 100 °C ou menores e apresentam características que possibilitam a solubilização de uma série de compostos, surgem como uma alternativa para a obtenção deste biopolímero do interior das células. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar o desempenho do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio na recuperação de P(3HB) do interior de células da espécie Gram-positiva *Priestia megaterium*. Para tanto, primeiramente, realizou-se a validação de um método para a quantificação do biopolímero, baseado na digestão do P(3HB) com ácido sulfúrico concentrado e análise do ácido crotônico gerado por HPLC. Em sequência, realizou-se um teste para verificar uma possível interação entre as soluções de LI de concentrações 1 mg/mL e 100 mg/mL e nas temperaturas de 30, 60 e 90 °C com amostras de biopolímero puro adquirido comercialmente. Enfim, um teste de contato entre 0,1 g de células de *P. megaterium* e 1 mL de soluções de LI com concentrações de 1, 10 e 100 mg/mL foi realizado nas temperaturas de 30 °C e 60 °C a fim de avaliar a capacidade de recuperação do biopolímero do interior das células bacterianas, bem como a pureza do produto obtido desta maneira. A partir dos experimentos, foi possível constatar uma boa resposta do método de quantificação do P(3HB) a partir do HPLC, sendo os resultados obtidos próximos àqueles alcançados a partir de outras metodologias. Além disso, os resultados de contato entre as soluções de LI e o biopolímero puro apresentaram a possibilidade de coprecipitação do LI juntamente ao P(3HB), se apresentando como uma fonte de impurezas para o biopolímero recuperado. Para os testes de contato das soluções de LI com as células bacterianas obteve-se o melhor desempenho para a solução menos concentrada na menor temperatura, na qual a pureza média entre as amostras obtida foi de 56,4 % e a recuperação de 91,4 %.

Palavras-chave: Biopolímero, Poli(3-hidroxi-butirato), Bactéria Gram-positiva, *Priestia megaterium*, Líquido iônico.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polyesters that have the potential to be applied to replace polymers of petrochemical origin because they have thermal and mechanical characteristics similar to these. Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is one of the most studied PHAs due to its production and application versatility. This polymer is produced by some bacterial species and then can be recovered from the cell interstitium by mechanical, chemical or biological methods. Among these, the use of organic solvents stands out because it is the most used. Chief among these solvents is chloroform, which is toxic and harmful to the environment, therefore the search for more sustainable and less harmful alternatives is of great importance. In this context, ionic liquids (ILs), which are salts that are liquid at temperatures of 100 °C or lower and have characteristics that enable the solubilization of a series of compounds, emerge as an alternative for obtaining this biopolymer from inside cells. The objective of the present work was to evaluate the performance of LI 1-hexadecylimidazolium chloride in the recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from the interior of cells of the Gram-positive species *Priestia megaterium*. To do so, first, the validation of the method for the quantification of the biopolymer was carried out, based on the digestion of P(3HB) with concentrated sulfuric acid and analysis of the crotonic acid generated by HPLC. In sequence, a test was carried out to verify a possible interaction between the IL solutions of concentrations 1 mg/mL and 100 mg/mL and at temperatures of 30, 60 and 90 °C with samples of pure biopolymer purchased commercially. Finally, a contact test between 0.1 g of *P. megaterium* cells and 1 mL of IL solutions with concentrations of 1, 10 and 100 mg/mL was performed at temperatures of 30 °C and 60 °C in order to evaluate the recovery capacity of the biopolymer inside the bacterial cells, as well as the purity of the product obtained in this way. From the experiments, it was possible to verify a good response of the method of quantification of P(3HB) from the HPLC, being the results obtained close to those reached from other methodologies. In addition, the contact results between the IL solutions and the pure biopolymer showed the possibility of IL co-precipitation together with P(3HB), presenting itself as a source of impurities for the recovered biopolymer. For contact tests of IL solutions with bacterial cells, the best performance was obtained for the less concentrated solution at the lowest temperature, in which the average purity between the samples obtained was 56.4% and the recovery was 91.4 %.

Keywords: *Biopolymer, Poly(3-hydroxybutyrate), Gram-positive bacterium, Priestia megaterium, Ionic liquid.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Classificação dos biopolímeros de acordo com a sua origem e com a sua biodegradabilidade.....	3
Figura 2.2 Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos.	4
Figura 2.3 Rota metabólica de síntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) no interior das células.	4
Figura 2.4 Imagem em microscopia eletrônica de transmissão apresentando os grânulos de acúmulo de P(3HB) no interior de células de <i>Priestia megaterium</i>	6
Figura 2.5 Estrutura da parede celular apresentada pelos dois principais grupos de bactérias. À esquerda, Gram-positivas e, à direita, Gram-negativas.....	7
Figura 2.6 Esquema dos principais métodos de recuperação de P(3HB) presentes na literatura.....	9
Figura 2.7 Representação dos cátions (à esquerda) e dos ânions (à direita) mais comumente empregados para a composição de Lis.	11
Figura 3.1 Aparato experimental para contato P(3HB) comercial – solução LI.	16
Figura 3.2 Diagrama exemplificando o processo experimental para as amostras de contato P(3HB) – LI ou biomassa – LI.....	16
Figura 4.1 Cromatogramas obtidos para quantificação de ácido crotônico: (a) a partir de P(3HB) comercial; (b) a partir de células bacterianas de <i>Priestia megaterium</i>	18
Figura 4.2 Curva de calibração construída a partir de quantidades conhecidas de P(3HB) comercial, descritas na Seção 3.2.....	18
Figura 4.3 Purezas obtidas para cada amostra após contato entre biomassa e as soluções de LI testadas. Em a), para os contatos à 30 °C e, em b) para os contatos à 60 °C.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Comparação das diferentes características físicas entre alguns biopolímeros e polímeros petroquímicos.	5
Tabela 3.1 Composição do meio mineral utilizado no cultivo celular.	13
Tabela 3.2 Composição da solução de micronutrientes adicionada ao meio de cultura.	14
Tabela 3.3 Massas pesadas em miligramas para cada amostra com P(3HB) comercial em duplicata.	15
Tabela 4.1 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 30 °C.	19
Tabela 4.2 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 60 °C.	19
Tabela 4.3 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 90 °C.	20
Tabela 4.4 Diferença de massas entre o início e o final do processo para cada uma das 6 amostras nas temperaturas de 30 e 60 °C.	21
Tabela 4.5 Valores de recuperação obtidos para cada ponto experimental nas temperaturas de 30 e 60 °C, sendo mf a massa em gramas obtida após a recuperação, mP a massa em gramas de P(3HB) puro e ml a massa de P(3HB) original contida nas células.	23

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Biopolímeros	3
2.2	Poli-(hidroxialcanoatos)	3
2.3	Produção de P(3HB) por microrganismos	6
2.4	Quantificação de P(3HB)	8
2.5	Recuperação do biopolímero	8
2.6	Líquidos Iônicos	10
2.7	Considerações finais	13
3	Materiais e Métodos	13
3.1	Cultivo Celular	13
3.2	Testes iniciais para determinação de P(3HB)	15
3.3	Testes de interação P(3HB) x líquido iônico	15
3.4	Testes de recuperação de P(3HB) de células bacterianas	17
4	Resultados e Discussão	17
4.1	Testes iniciais para determinação de P(3HB)	17
4.2	Testes de interação P(3HB) x líquido iônico	19
4.3	Testes de recuperação de P(3HB) de células bacterianas	21
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	24
	REFERÊNCIAS	26

1 Introdução

A produção anual de plásticos é maior que 380 milhões de toneladas e cresce a uma taxa de aproximadamente 4% ao ano (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Uma quantidade significativa dos resíduos plásticos gerados tem como destino os oceanos e mais de 80% do lixo marinho se compõe destes materiais (LEBRETON e colaboradores, 2017). Desse modo, existe uma crescente preocupação envolvendo o impacto ambiental de resíduos plásticos, que motiva uma transição para uma “economia de plástico circular”, na qual o uso de fontes não renováveis e a geração de resíduos é minimizada. (ROSENBOOM; LANGER; TRAVERSO, 2022).

Visando o atingir este objetivo, ademais da necessidade de maior incentivo para a atividade da reciclagem, surge a possibilidade da utilização de polímeros biodegradáveis derivados de fontes renováveis em substituição aos materiais derivados do petróleo. Estes polímeros são comumente utilizados na manufatura de itens descartáveis, como embalagens, mas possuem um real potencial de aplicação na medicina e em outros campos de maior complexidade (CHEN; PATEL, 2012; KENRY; LIU, 2018).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) estão entre os biopolímeros que despertam um grande interesse devido a sua biodegradabilidade, sendo o poli-3-hidroxi-butirato, P(3HB), o mais amplamente estudado, por suas propriedades mecânicas semelhantes às de polímeros convencionais, como o polipropileno (BAIDURAH; KOBAYASHI, 2022). Devido ao fato de ser produzido no interior de corpos de inclusão em determinados microrganismos, o processo de obtenção do P(3HB) é complexo e, portanto, possui o alto custo como limitante para seu uso comercial. Um dos fatores relevantes neste custo elevado é o substrato utilizado para o cultivo celular, sendo importante a busca por fontes de carbono mais acessíveis e capazes de garantir uma produção viável de biopolímero e de espécies produtoras que garantam vantagens industriais sobre as mais usualmente utilizadas (JANGRA e colaboradores, 2018). Além disso, um outro fator de grande impacto financeiro é o custo de recuperação do biopolímero produzido.

Dentre os microrganismos produtores, se destacam as bactérias, tanto as Gram-negativas, quanto as Gram-positivas. A parede celular das primeiras é composta de apenas algumas camadas de peptidoglicano, enquanto a das Gram-positivas é composta por uma camada espessa deste composto. Ainda, apenas nas bactérias Gram-negativas pode ser encontrada a presença de lipopolissacarídeos (LPSs), composto com potencial alergênico aos humanos (REITH; MAYER, 2011; WANG e colaboradores, 2010). A espécie bacteriana *Priestia megaterium* (anteriormente classificada como *Bacillus megaterium*) é uma Gram-positiva e, assim, possui uma camada mais espessa de peptidoglicano, que a torna mais resistente a pressões externas e, portanto, vantajosa do ponto de vista de uso em escala industrial se comparada às espécies Gram-negativas. Além disso, é uma espécie osmotolerante, capaz de se desenvolver a partir de fontes de carbono variadas e de acumular quantidades consideráveis de polímero em sua estrutura interna (BORGES e colaboradores, 2017).

Para a recuperação do biopolímero do interior das células bacterianas, destacam-se os métodos químicos, mecânicos e biológicos. Dentre estes, o método químico a partir da

utilização de solventes halogenados é o mais utilizado, por ser capaz de extrair o P(3HB) intracelular com alta rendimento e pureza (JACQUEL e colaboradores, 2008). Entretanto, de modo geral, estes solventes são nocivos à saúde e possuem um grande potencial poluidor. Deste modo, a busca por expandir o campo de utilização do P(3HB) deve passar pelo desenvolvimento de novas alternativas tecnológicas para as etapas de recuperação e purificação do biopolímero, com menor impacto sobre a saúde e o meio ambiente.

Em busca da redução da utilização de solventes orgânicos, surge a alternativa dos líquidos iônicos (LIs), que são sais caracterizados por se apresentarem no estado líquido a temperaturas próximas de 100 °C (EHSAN KIANFAR; SAJJAD MAFI, 2020) e por apresentarem uma natureza que acarreta na solubilização de uma série de compostos, como alguns biopolímeros e proteínas (DUBEY e colaboradores, 2018). Existem diversas linhas de estudo que buscam avaliar a toxicidade de soluções de LIs para com células de microrganismos, com possíveis aplicações na farmacologia, biomedicina e nanotecnologia (BENEDETTO; BALLONE, 2018). Contudo, embora existam alguns estudos que buscaram elucidar melhor este aspecto, pouco ainda é conhecido a respeito da utilização de LIs com o objetivo de recuperar P(3HB) do interior de células bacterianas e menos ainda a partir de bactérias Gram-positivas, o qual justifica o desenvolvimento de estudos que visem elucidar e otimizar este processo para futura aplicação industrial.

Desse modo, o objetivo principal do trabalho foi avaliar o desempenho do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio na recuperação de poli(3-hidroxi-butirato) do interior de células da espécie Gram-positiva *Priestia megaterium*.

Além disso, com o propósito de atingir o objetivo principal, foram definidos alguns objetivos específicos, como segue:

1. Estabelecer um método para a quantificação de poli(3-hidroxi-butirato);
2. Avaliar o efeito da concentração do cloreto de 1-hexadecilimidazólio e da temperatura sobre poli(3-hidroxi-butirato) adquirido comercialmente;
3. Verificar a influência da temperatura e da concentração de LI na recuperação e purificação do biopolímero do interior de célula de *P. megaterium*.

A estrutura do trabalho conta com 5 capítulos ademais deste introdutório. O Capítulo 2 apresenta uma breve revisão bibliográfica acerca dos temas que serão abordados ao longo do texto, como biopolímeros, produção e recuperação de P(3HB) e líquidos iônicos. O Capítulo 3 descreve a metodologia utilizada nos experimentos realizados. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e as discussões acerca destes. O Capítulo 5 fornece as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros.

2 Revisão Bibliográfica

No presente tópico, serão abordados alguns temas considerados fundamentais para a compreensão e o desenvolvimento do trabalho, dentre os quais estão: biopolímeros, polihidroxialcanoatos (PHAs) e microrganismos produtores de PHAs. Além disso, também se fará uma breve revisão acerca dos diversos métodos de recuperação de P(3HB), apontando vantagens e desvantagens dos processos e com enfoque especial no método de recuperação com líquidos iônicos (LIs).

2.1 Biopolímeros

Biopolímeros são macromoléculas orgânicas presentes em fontes naturais, formadas por unidades que se repetem. Estes compostos são, na maioria das vezes, biodegradáveis e podem ser biocompatíveis, tornando-os vantajosos para diversas aplicações (BARANWAL e colaboradores, 2022). Por sua vez, os materiais biodegradáveis são aqueles capazes de serem decompostos por bactérias, fungos ou algas (LUCAS e colaboradores, 2008). A partir da descrição anterior, os biopolímeros podem ser subdivididos segundo o diagrama da Figura 2.1. Biopolímeros como a policaprolactona (PCL) possuem origem petroquímica, porém são biodegradáveis; biopolímeros como o polietileno renovável (PE) são obtidos a partir de monômeros sintetizados a partir de fontes vegetais, porém apresentam perfil de degradabilidade semelhante ao de polímeros convencionais. Já os polímeros presentes na intersecção entre os dois grupos são biodegradáveis e se diferem por serem obtidos via biossíntese, seja por ação de plantas ou de microrganismos produtores (CARVALHO E ROSA, 2016).

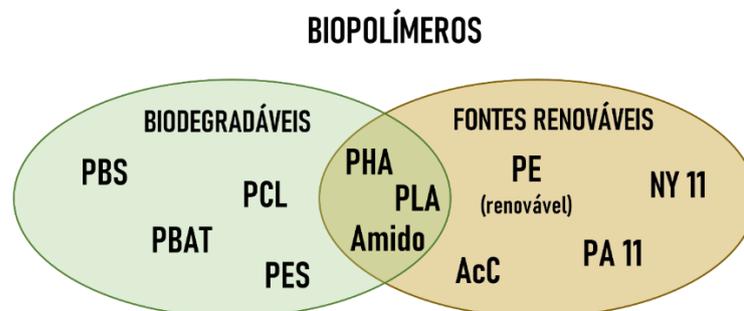


Figura 2.1 Classificação dos biopolímeros de acordo com a sua origem e com a sua biodegradabilidade. (Adaptada de MANALI SHAH, 2021).

Dentre os diversos biopolímeros apresentados, destacam-se aqueles que são ao mesmo tempo biodegradáveis e originários de fontes renováveis, como é o caso dos PHAs. Estes, devido a sua biocompatibilidade, possuem um amplo potencial de aplicabilidade em diversas indústrias, por exemplo, no setor biomédico, na engenharia de tecidos, no microencapsulamento de fármacos, fabricação de próteses, entre outros (RAZA e colaboradores, 2018).

2.2 Poli-(hidroxialcanoatos)

PHAs são poliésteres formados por vários hidróxiácidos sintetizados tanto por bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas. Já existem estudos de mais de 90 gêneros de bactérias identificados como produtores de PHAs, tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose. A estrutura química geral deste grupo de biopolímeros é mostrada na Figura 2.2.

Os diferentes radicais (R) e número de unidades CH₂ que são possíveis de estarem presentes na estrutura do monômero dão origem a uma diversidade de biopolímeros com características distintas, tornando este grupo bastante versátil (RAZA e colaboradores, 2018; VALAPPIL e colaboradores, 2007).

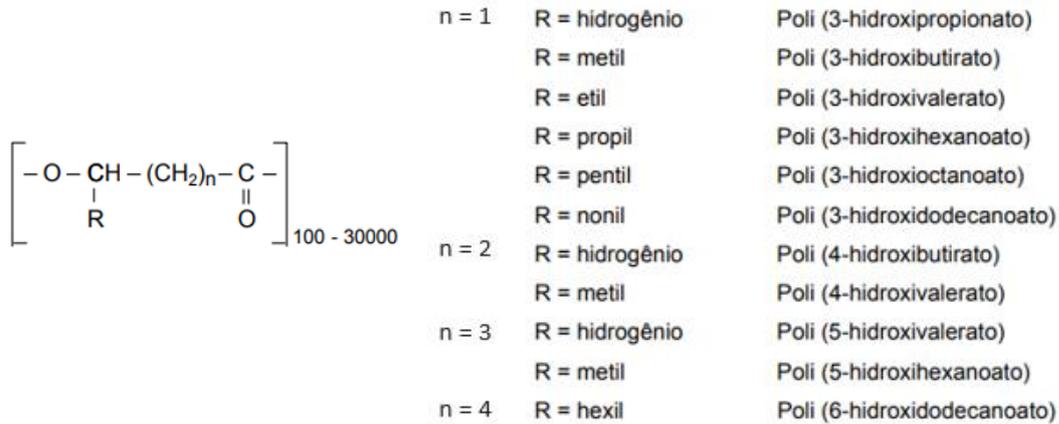


Figura 2.2 Estrutura geral dos polihidroxi alcenoatos. (Adaptada de LEE, 1996).

A síntese destes poliésteres ocorre majoritariamente nos casos em que há limitação de algum nutriente no meio, como oxigênio, nitrogênio, magnésio, porém existe a disponibilidade de carbono. Nestas circunstâncias, o biopolímero é sintetizado e armazenado na forma de grânulos envoltos por camada fosfolipídica no meio intracelular (WANG e colaboradores, 1997).

A via metabólica de síntese dos PHAs no interior das células bacterianas pode ser vista de forma simplificada na Figura 2.3. Este processo se dá basicamente a partir de duas etapas: a formação de hidroxiacil-CoAs (HA-CoAs) a partir da glicose ou de ácidos graxos e a posterior polimerização deste em cadeias de PHAs. Este último processo é regido pela PHA sintase, enzima que possui uma especificidade grande para com vários HA-CoAs, com destaque para o 3-hidroxiacil-CoAs (3HA-CoAs).

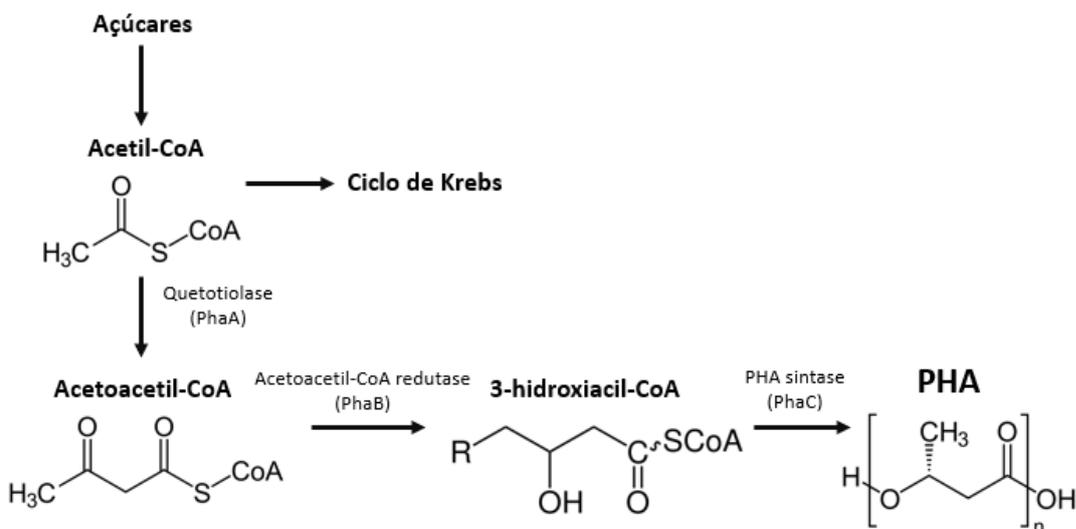


Figura 2.3 Rota metabólica de síntese de polihidroxi alcenoatos (PHAs) no interior das células. (Adaptado de VERLINDEN, 2007).

De modo geral, há um enorme interesse no estudo destes biopolímeros, pois estes podem originar materiais com características e propriedades semelhantes a plásticos de origem petroquímica. Sendo assim, biopolímeros como o poli(3-hidroxiacetato), o poli(3-hidroxiacetato-co-hidroxiacetato), o poli(4-hidroxiacetato), entre outros são considerados uma alternativa para a gradual substituição de plásticos não biodegradáveis, originados de combustíveis fósseis (LEE & PARK, 2005). Para fins comparativos, na Tabela 2.1 está apresentada uma tabela de propriedades relevantes de biopolímeros e polímeros petroquímicos.

Tabela 2.1 Comparação das diferentes características físicas entre alguns biopolímeros e polímeros petroquímicos. (Adaptado de ANJUM e colaboradores, 2016)

Polímero	Conteúdo de copolímero	Módulo de Young [Gpa]	Resistência à tração [Mpa]	Elongação na ruptura [%]	Temperatura de fusão [°C]	Temperatura de transição vítrea [°C]
P(3HB)		3,5 - 4	40	3 - 8	173 - 180	5 - 9
P(4HB)		149	104	1000	53	-50
P(3HB-co-3HV)	(3 mol% 3HV)	2,9	38	na	170	na
	(9 mol% 3HV)	1,9	37	na	162	na
	(14 mol% 3HV)	1,5	35	na	150	na
	(20 mol% 3HV)	1,2	32	na	145	-1
	(25 mol% 3HV)	0,7	30	na	137	na
P(3HB-co-4HV)	(3 mol% 4HB)	na	28	45	166	na
	(10 mol% 4HB)	na	24	242	159	na
	(16 mol% 4HB)	na	26	444	130	-7
	(64 mol% 4HB)	30	17	591	50	-35
	(90 mol% 4HB)	100	65	1080	50	-42
Polipropileno		1,0 - 1,7	29,3 - 38,6	500 - 900	170 - 176	-10
HDPE		0,4 - 1,0	17,9 - 33,1	12 - 700	112 - 132	-80
LDPE		0,05 - 0,1	15,2 - 78,6	150 - 600	88 - 130	-36
PS		3,0 - 3,1	50	3 - 4	80 - 110	21
Polietileno-tereftalato		2,2	56	7300	262	3400

Dentre os diversos PHAs, o poli(3-hidroxiacetato), P(3HB), é o mais comum. Foi o primeiro PHA a ser descoberto e é também o mais estudado e bem caracterizado. Sua descoberta foi realizada por Lemoigne (1926), que também foi o pioneiro na descrição de um método analítico para a sua caracterização (RODRÍGUEZ-CONTRERAS e colaboradores, 2013; THEO e colaboradores, 2005).

Este biopolímero é acumulado como uma inclusão membranosa nas células bacterianas, podendo alcançar até 80% do peso seco celular (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). A estrutura e organização destas inclusões pode ser observada na Figura 2.5. Uma grande vantagem deste biopolímero é que apresenta valores de módulo de Young e resistência à tração semelhantes aos do polipropileno, como pode ser verificar na Figura 2.4. Em contrapartida, a sua capacidade de alongação até a ruptura é restrita, o que acaba por restringir o seu uso para algumas possíveis aplicações, como no uso em embalagens (SUDESH e colaboradores, 2000). Além disso, a baixa estabilidade térmica apresentada pelo P(3HB) é um desafio para a sua aplicação industrial, pois diminui a capacidade de processamento deste através de operações comuns da indústria de polímeros (BORGES, 2017).

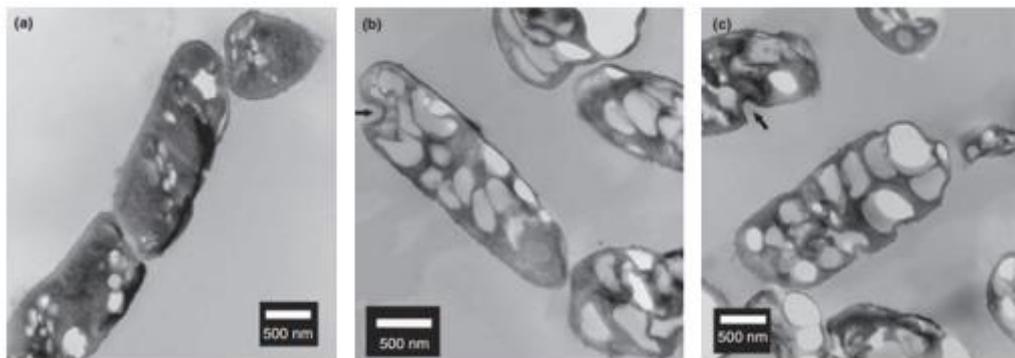


Figura 2.4 Imagem em microscopia eletrônica de transmissão apresentando os grânulos de acúmulo de P(3HB) no interior de células de *Priestia megaterium*. (Adaptada de RODRÍGUEZ-CONTRERAS e colaboradores, 2013).

Apesar destas desvantagens citadas, diversos estudos têm buscado contornar estes empecilhos. Um caso bastante relevante é a produção do Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)], formado pela incorporação do monômero 3-hidroxi-valerato no P(3HB). Este biopolímero, por sua vez, apresenta menor cristalinidade e, portanto, menor rigidez e fragilidade, sendo estas propriedades diretamente influenciadas pela razão entre os dois monômeros (WONG; BHUBALAN; AMIRUL, 2022). Além disto, a utilização comercial do P(3HB) apresenta um empecilho financeiro, já que a sua produção e purificação através dos métodos convencionais é bastante custosa se comparada àquela dos plásticos petroquímicos convencionais. Desse modo, atualmente, se busca a redução do custo de produção do P(3HB) a partir de estratégias como o desenvolvimento de cepas bacterianas com maior eficiência, além da otimização do processo fermentativo e do processo de recuperação intracelular do produto, com a busca de novas alternativas mais sustentáveis econômica e ambientalmente (GETACHEW; WOLDESENBET, 2016).

2.3 Produção de P(3HB) por microrganismos

Ao longo dos anos, já foram relatadas mais de 300 espécies capazes de produzir o P(3HB); entretanto, nem todos estes microrganismos são capazes de armazenar uma quantidade suficiente de biopolímero para aplicação em uma maior escala (LEE, 1996). Um outro aspecto importante é a complexidade do substrato requerido pelas espécies para a viabilização da produção do biopolímero; enquanto algumas espécies requerem substratos de alto valor agregado, outras são capazes de sintetizar o P(3HB) em meios consideravelmente mais simples, que resultam na diminuição do custo de produção. Alguns substratos de menor custo importantes de serem citados são o soro de leite (BORGES e colaboradores, 2017), o glicerol advindo do biodiesel (NARANJO e colaboradores, 2013) e o melaço de cana-de-açúcar (KULPREECHA e colaboradores, 2009).

Apesar de tanto espécies Gram-positivas quanto espécies Gram-negativas serem capazes de produzir P(3HB), até o presente a maioria dos esforços no campo científico e industrial piloto são realizados a partir de espécies Gram-negativas (LUCIANO, 2022). Alguns destaques importantes de serem citados são as espécies *Cupriavidus necator* (POVOLO e colaboradores, 2010), *Escherichia coli* recombinante (LEE; CHOI, 1998), *Azohydromonas lata* (WANG e colaboradores, 1997) e espécies do gênero *Methylobacterium* (MOKHTARI-HOSSEINI e colaboradores, 2009). No entanto, bactérias Gram-positivas vêm ganhando crescente interesse no campo da produção de biopolímeros (MORADALI; REHM, 2020). Espécies do

gênero *Priestia*, com especial atenção às espécies *Priestia cereus* e *Priestia megaterium* (ANDLER e colaboradores, 2021; ISRANI; THAPA; SHIVAKUMAR, 2018) são os maiores representantes deste campo de estudo, sendo que estas espécies anteriormente pertenciam ao gênero *Bacillus* e foram reclassificadas a partir do trabalho de Gupta e colaboradores (2020). Ademais de possuir uma alta taxa de crescimento se comparado a outras bactérias, estas espécies também se destacam por apresentarem grande capacidade de produzir P(3HB) utilizando meios de fontes de carbono relativamente simples e pouco dispendiosos (KHIYAMI; AL-FADUAL; BAHKLIA, 2011). Andler e colaboradores (2021) investigaram o crescimento celular e o acúmulo de P(3HB) em *Priestia cereus* a partir de substrato de cascas de uva, atingindo uma concentração massa/massa máxima de 18,79% do bioplímero. Naranjo e colaboradores (2013) avaliaram a utilização de glicerol e glicose como substratos para o meio de cultura, obtendo um rendimento de aproximadamente 60% de massa de biopolímero. Já Kulprecha e colaboradores (2009) obtiveram resultados promissores de produção de P(3HB) utilizando o melaço (produto intermediário da produção de açúcar) como substrato rico em carbono, atingindo valores próximos a 55% em massa de biopolímero.

As diferenças entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com relação às características de sua parede celular têm efeito direto nos processos de produção P(3HB) por estes microrganismos, podendo ser associados com algumas de suas vantagens e desvantagens nesta aplicação. As principais diferenças estruturais entre os dois grandes grupos bacterianos podem ser observadas na Figura 2.6.

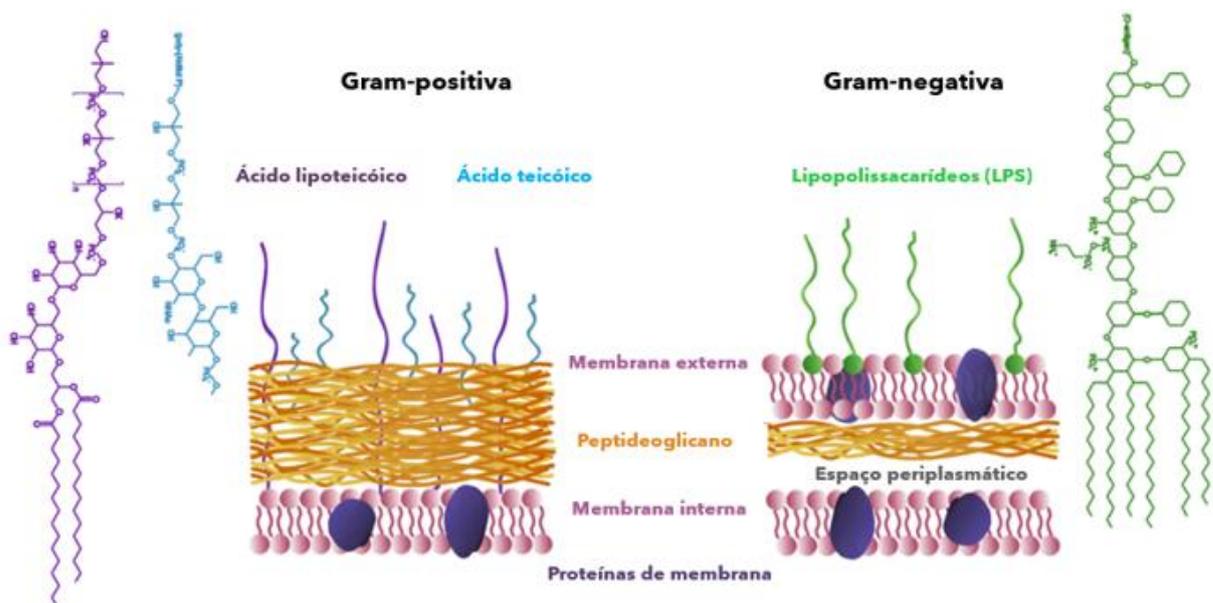


Figura 2.5 Estrutura da parede celular apresentada pelos dois principais grupos de bactérias. À esquerda, Gram-positivas e, à direita, Gram-negativas. (Adaptada de PAJERSKI e colaboradores, 2019).

A parede celular de bactérias Gram-negativas é formada por três principais camadas, a membrana externa, a camada de peptidoglicana e a membrana citoplasmática, ou interna. As duas membranas delimitam um espaço denominado periplasma, sendo que a característica mais marcante das bactérias Gram-negativas é a presença da membrana externa, já que ela não está presente nas Gram-positivas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A membrana externa

se caracteriza por ser uma membrana lipídica e por ter a sua parte periférica composta por glicolípídeos, principalmente lipopolissacarídeos (LPSs) (KRUYT; KAMIO; NIKAIDO, 1972), que agem como endotoxinas e podem gerar reações imunológicas nos organismos (GAHLAWAT; KUMAR SONI, 2019). Isto constitui uma desvantagem na produção de P(3HB) a partir de espécies Gram-negativas, visto que os LPSs podem ser recuperados junto ao polímero na etapa de purificação.

Para o grupo das Gram-positivas, a ausência da proteção celular adicional fornecida pela membrana externa é compensada por um envoltório de peptídeoglicano muito mais proeminente. Esta camada é formada basicamente por duas longas cadeias poliméricas aniônicas: as moléculas de ácido teicóico e de ácido lipoteicóico. Em conjunto, estes compostos podem perfazer 60% da massa da parede celular de Gram-positivas, garantindo-lhes uma ampla proteção mecânica contra adversidades externas. Isto acarreta vantagens e desvantagens do ponto de vista industrial (SILHAVY e colaboradores, 2010; NEUHAUS & BADDILEY, 2003), gerando maior flexibilidade na etapa de produção e maior dificuldade na etapa de recuperação do polímero.

Assim, alguns aspectos que sustentam a utilização do *Priestia megaterium* como organismo produtor de P(3HB) neste trabalho são justamente o fato de se tratar de uma espécie Gram-positiva e a sua alta capacidade de acúmulo de biopolímero, mesmo com a utilização de meios mais simples para o crescimento celular.

2.4 Quantificação de P(3HB)

A quantificação do P(3HB) presente em uma determinada amostra é um aspecto fundamental quando se considera o desenvolvimento ou o monitoramento de métodos para produção e recuperação deste polímero a partir de microrganismos. Existem alguns métodos descritos na literatura para a quantificação de P(3HB). Riss e Mai (1988) propuseram um método baseado na hidrólise e na transesterificação de P(3HB) com propanol e ácido clorídrico (propanólise), seguido da quantificação por cromatografia gasosa (GC) para análise dos ésteres resultantes. Alternativamente, um método semelhante é utilizado, porém com a alcoólise sendo conduzida a partir de metanol (BRANDL e colaboradores, 1988). Métodos baseados em espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) também podem ser utilizadas para este fim (JÜTTNER, R.; LAFFERTY, R., 1975). Ainda, um método baseado na quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi descrito por Karr (1982). Este método se fundamenta na quebra das cadeias de P(3HB) em ácido crotônico a partir da ação do ácido sulfúrico a temperaturas próximas aos 100 °C. Este último método possui a vantagem de ser mais simples em relação aos outros por utilizar apenas o ácido sulfúrico para a quebra, uma substância que possui baixa pressão de vapor e, assim, torna o protocolo de análise mais simples.

2.5 Recuperação do biopolímero

A obtenção do P(3HB) se baseia em duas etapas principais, o cultivo celular e a separação entre a biomassa e o polímero (denominada recuperação), sendo que esta última etapa é extremamente importante pois pode acarretar alterações nas propriedades do produto, além de poder perfazer mais de 50% do custo de produção (MADKOUR e colaboradores, 2013; LÓPEZ-ABELAIRAS e colaboradores, 2015). Dentre os métodos utilizados nos processos para recuperação de PHAs podem ser citados: extração sólido-líquido com solventes orgânicos, tais

como clorofórmio (MACAGNAN e colaboradores, 2017), carbonato de propileno (QUINES e colaboradores, 2017) e acetato de etila (ALFANO e colaboradores, 2021); digestão química, com substâncias como dodecil sulfato de sódio (SDS) e hipoclorito de sódio (MARUDKLA e colaboradores, 2018); digestão biológica com enzimas (KAPRITCHKOFF e colaboradores, 2006); aplicação de métodos mecânicos como homogeneizador de alta pressão, moinhos, ultrassom (MELIH TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998); entre outros. A Figura 2.7 apresenta um esquema destes principais métodos atuais para a obtenção do biopolímero e suas classificações quanto aos seus princípios de ação.

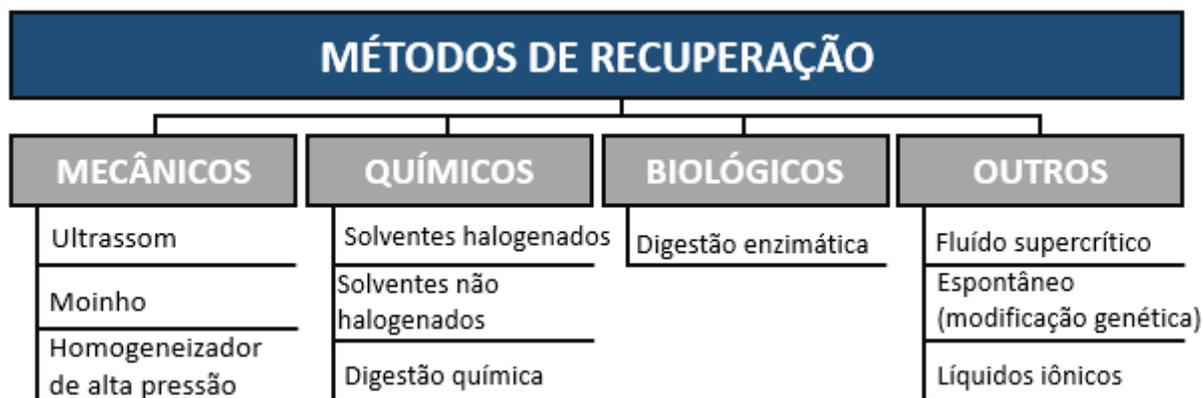


Figura 2.6 Esquema dos principais métodos de recuperação de P(3HB) presentes na literatura. (Adaptado de BISSACOT, 2018).

O método de extração por solventes (químico) é o mais utilizado industrialmente, principalmente pela alta pureza do polímero obtido neste caso (BORGES e colaboradores, 2017; JACQUEL e colaboradores, 2008), além da facilidade e baixo custo de sua aplicação em comparação com os demais métodos mais estabelecidos em larga escala (GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2013). Valappil e colaboradores (2007) buscaram recuperar P(3HB) por extração com solvente da bactéria Gram-positiva *Priestia cereus*, obtendo o melhor resultado (pureza de 99%) na extração com clorofórmio utilizando *soxhlet*. Seguindo um procedimento semelhante, Correa e colaboradores (2014) aplicaram a extração com clorofórmio para *P. megaterium*, obtendo 100% de recuperação e de pureza do biopolímero.

Ainda no campo dos solventes orgânicos, esforços vêm sendo feitos para utilização de solventes não halogenados na extração. Quines e colaboradores (2017) obtiveram, a partir da utilização de carbonato de propileno, valores médios de recuperação e pureza de P(3HB) de, respectivamente, 75,0% e 94,6%; além disso, foi possível se recuperar 80% do solvente utilizado após o processo de extração. Alfano e colaboradores (2021) testaram o potencial do acetato de etila na recuperação do biopolímero, atingindo resultados de 96% de recuperação e 93% de pureza do biopolímero.

Na recuperação a partir de digestão química da parede celular bacteriana, o maior desafio é o de garantir a não alteração do biopolímero pela atividade excessiva do digestor. Marudkla e colaboradores (2018) chegaram a resultados promissores utilizando hipoclorito de sódio como agente digestor, atingindo uma recuperação do P(3HB) de 73,42% e uma pureza de 91,50% e também utilizando o SDS – recuperação de 71,07% e pureza de 90%. Entretanto, uma desvantagem apresentada nesta técnica foi a diminuição da capacidade de digestão celular pelo aumento da relação biomassa seca e volume de solução utilizada.

A técnica de digestão enzimática para recuperação do P(3HB) vem ganhando mais interesse científico nos últimos anos. Algumas enzimas são capazes de interagir com a parede celular bacteriana, desintegrando-a, mas sem modificar a estrutura do biopolímero recuperado, em função de suas seletividades para com os substratos com os quais interage. Kapritchkoff e colaboradores (2006) estudaram o potencial de seis enzimas na digestão de células de *C. necator*. A enzima utilizada que apresentou os melhores resultados foi a pancreatina, com um percentual de polímero recuperado de 90,3% e pureza de 62,2%.

Os métodos mecânicos de recuperação são amplamente utilizados em diversos processos, como na recuperação de proteínas intracelulares (JACQUEL e colaboradores, 2008). Além disso, o tratamento mecânico prévio da biomassa pode melhorar a etapa de solubilização do biopolímero ao fragilizar ou romper a parede celular, uma vez que diminui a resistência à transferência de massa, facilitando o contato solvente-polímero (BORGES e colaboradores, 2017). Melih Tamer e colaboradores (1998) realizaram testes de recuperação de P(3HB) em células de *Alcaligenes latus*, utilizando técnicas de homogeneização de alta pressão e moinho de bolas. O desempenho do homogeneizador foi dependente da concentração, sendo melhor quanto maior o nível de biomassa no meio. Ainda, o moinho apresentou um desempenho superior, indicando que esta técnica é mais aplicável em uma escala industrial, com a ressalva de que as esferas utilizadas apresentam um tamanho diminuto (425 – 600 µm).

Ainda, constam na literatura outros métodos capazes de atingir níveis satisfatórios de extração e de apresentar vantagens em relação aos métodos atuais, sejam elas ambientais ou monetárias. Hejazi e colaboradores (2003) estudaram o potencial de fluidos supercríticos, atingindo 89% de recuperação a partir de um método de extração utilizando dióxido de carbono (CO₂) à pressão de 200 atm e 40 °C. Uma outra técnica de recuperação de PHB que vêm ganhando mais atenção nos últimos tempos é a partir de líquidos iônicos e, devido à importância desta metodologia para este trabalho, ela será abordada na sequência, em um tópico específico.

2.6 Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (LIs) são espécies compostas por um cátion orgânico e por um ânion de característica orgânica ou inorgânica e possuem diversas propriedades interessantes, que geram potencial de utilização nos mais diversos campos (HALLETT; WELTON, 2011). Apesar de suas primeiras manipulações no início do século XX (WALTON, 1914; HURLEY & WEIR, 1951), somente a partir da década de 1980 estes compostos começaram a atrair uma atenção maior da comunidade científica. Uma das famílias mais comuns de LIs é baseada no cátion imidazólio e foi descoberta em 1982 por John Wilkes (WELTON, 2018). Na Figura 2.7 é possível observar alguns dos cátions e dos ânions mais comumente utilizados na síntese e aplicação de LIs.

Muitos estudos vêm sendo publicados a respeito da toxicidade dos LIs e as possibilidades de aplicação desta característica. Foi demonstrado que esta toxicidade depende em grande parte dos cátions e menos dos ânions formadores do LI (STOLTE e colaboradores, 2006) e diversos estudos demonstraram a correlação entre a toxicidade do LI e o grau de lipofilicidade da cadeia catiônica (RANKE e colaboradores, 2007; VRANEŠ e colaboradores, 2019), sugerindo dano à membrana celular como um potencial mecanismo de ação (KUMARI e colaboradores, 2020). Desse modo, toxicidade de LIs para com ambos os grupos bacterianos, Gram-negativas e Gram-positivas, foi observada em muitos casos e associada à similaridade das suas estruturas moleculares com detergentes, pesticidas e alguns antibióticos (CARSON e colaboradores, 2009; GANAPATHI; GANESAN, 2017; O'TOOLE e colaboradores, 2012).

Neste sentido, diversos estudos dispuseram esforços buscando mostrar o potencial de LIs na ruptura do envoltório celular bacteriano. Docherty e colaboradores (2005) testaram a capacidade de LIs baseados em imidazólio e piridínio em romper a estrutura da parede celular de diversas espécies bacterianas clinicamente relevantes, tendo chegado a resultados promissores de degradação de biofilmes especialmente para o brometo de 1-octil-3-metilpiridínio (OMPyrBr) e o brometo de 1-metil-3-octilimidazólio (OMImBr), com tempo de contato células - LI de 5 a 15 minutos. De todas as espécies bacterianas testadas, o maior impacto foi observado sobre a Gram-positiva *B. subtilis*. Seguindo a mesma linha, Martzy e colaboradores (2019) testaram as capacidades dos LIs acetato de 1-etil 3-metilimidazólio e hexanoato de colina para a lise celular de quatro espécies Gram-positivas e quatro espécies Gram-negativas, comparando-as à lise por solventes orgânicos e por ação enzimática; sendo que, para as espécies Gram-positivas *S. aureus* e *C. perfringens*, a capacidade lítica dos LIs testados foi comparável àquela dos solventes. Ainda, O'Toole e colaboradores (2012) demonstraram a capacidade antimicrobiana a baixas concentrações (1 µM) do LI cloreto de 1,1-(1, 6-hexanodiol)bis(1,1,1-trihexil) em tempos inferiores a 15 minutos de contato.

Na última década, surgiram trabalhos propostos a investigar a eficiência de LIs na recuperação de biopolímeros de inclusões bacterianas. Dubey e colaboradores (2017) utilizaram o LI dietilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio ($[C_2MIm][C_2OPO_3]$) para realizar a recuperação de P(3HB) do interior de células bacterianas da espécie Gram-negativa, *Halomonas hydrothermalis*; 0,5 g de células foram postas em contato com 5 g de $[C_2MIm][C_2OPO_3]$ a 60°C durante um período de 24 h e, após, metanol foi adicionado como um anti-solvente para realizar a separação. O rendimento da obtenção do biopolímero foi de 60% ± 2% e a pureza encontrada para o produto obtido a partir de análise elementar CHNS-O foi de 86%.

Kobayashi e colaboradores (2015) investigaram o potencial de um grupo de 13 LIs na recuperação de P(3HB) de células liofilizadas de espécie de cianobactéria do gênero *Synechocystis*; 1 mg de células foi adicionado a 1 g de cada um dos diferentes LIs e as amostras foram agitadas durante um período de 24 h. O metilfosfonato de 1-etil-3-metilimidazólio, $[C_2MIm][MeO(H)PO_2]$, foi o que apresentou o melhor resultado no estudo, alcançando um rendimento de 98%, sem a necessidade de aquecimento ou pré-tratamento. Entretanto, obtiveram uma pureza de apenas 30% do produto.

2.7 Considerações finais

Conforme visto no presente capítulo, a literatura sugere diversas maneiras de se obter e recuperar P(3HB) de células bacterianas. A técnica mais utilizada é a recuperação a partir de solventes halogenados, em especial o clorofórmio sendo empregadas, principalmente, bactérias Gram-negativas. Entretanto, estes dois fatos tornam o processo de pós-processamento mais complexo, exigindo etapas adicionais de purificação, principalmente tratando-se de possíveis aplicações biomédicas. Outro ponto importante, é a nocividade do solvente clorado para com o meio ambiente e para o organismo de quem o estiver manipulando.

Deste modo, em meio a este cenário, é de fundamental importância o estudo de alternativas para a obtenção de P(3HB) em escala industrial, sempre pensando que o custo final desse produto sofre grande impacto pelo substrato utilizado no cultivo e ainda mais pelas etapas de purificação adicionais. Assim, justifica-se o uso de espécies como *Priestia megaterium*, que são capazes de crescer em fontes de carbono simples e de menor custo. Além disso, é fundamental estudar mais profundamente a utilização de Lis como método para recuperar e purificar P(3HB), buscando condições de processo que permitam alcançar percentuais elevados de recuperação e pureza do biopolímero, visto que este é um campo com ainda muitas oportunidades de aprofundamento.

3 Materiais e Métodos

O procedimento experimental descrito neste capítulo foi conduzido no Laboratório de Bioengenharia (LABIO) – Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O líquido iônico utilizado foi fornecido pelo Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise (TECNOCAT) – Instituto de Química, UFRGS.

3.1 Cultivo Celular

A biomassa utilizada nos testes foi produzida como parte do presente trabalho, sendo o meio de cultivo utilizado o sugerido por Wang e Lee (1997), preparado segundo as quantidades apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição do meio mineral utilizado no cultivo celular.

Composto	Fórmula	Concentração [g.L ⁻¹]
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008
Fosfato Dissódico	Na ₂ HPO ₄	3,6
Fosfato Monopotássico	KH ₂ PO ₄	1,5
Sulfato de Ferro (II) Heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05
Cloreto de Cálcio Dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	0,1

A 1 L do meio mineral descrito, foi adicionado 1 mL de uma solução de micronutrientes, cuja composição é descrita na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Composição da solução de micronutrientes adicionada ao meio de cultura.

Composto	Fórmula	Concentração [mg.L ⁻¹]
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	300
Cloreto de Cobalto (II) Hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	200
Sulfato de Zinco Heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	30
Cloreto de Manganês (II) Tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	30
Molibdato de Amônio Tetrahidratado	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	30
Sulfato de Níquel Heptahidratado	NiSO ₄ .7H ₂ O	30
Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	10

Como fonte de carbono e nitrogênio, foram utilizados, respectivamente, a sacarose [C₁₂H₂₂O₁₁] e o sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄]. A concentração do primeiro composto utilizada nos experimentos foi de 16 g.L⁻¹ e a do segundo foi de 2 g.L⁻¹, conforme otimização realizada por Faccin (2012).

Após o preparo do meio de cultivo, este foi transferido para erlenmeyers e levado ao processo de autoclavagem durante 15 minutos à 121 °C. Então, a partir dos meios já autoclavados, o processo de obtenção das células bacterianas contendo P(3HB) foi realizado em três etapas principais: 2 cultivos pré-inóculos sequenciais (para reativação das células) seguidos da transferência, na fase de crescimento adequada, para o cultivo propriamente dito. Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (*shaker*), na rotação de 200 rpm e temperatura de 30 °C. Desse modo, primeiramente, realizou-se a reativação das células bacterianas congeladas em glicerol por um período de 18 h sob as condições descritas (1° pré-inóculo). Após, 5 mL desta solução foram repassadas a outro frasco contendo o mesmo meio de cultura e nas mesmas condições de agitação e temperatura (2° pré-inóculo). Decorridas 5 horas do início da incubação, quando o cultivo estava no início de sua fase exponencial de crescimento, 2 mL foram inoculados nos erlenmeyers, contendo 50 mL de meio de cultura, sendo estes encubados por 20 h no *shaker* e tendo sido necessário 20 erlenmeyers para obtenção da biomassa total.

Após a etapa de cultivo, os meios contendo a cultura celular foram centrifugados, realizando-se o descarte do sobrenadante (sobra do meio de cultivo utilizado) e realizando-se a liofilização do precipitado (células bacterianas contendo o biopolímero). Durante o processo de liofilização, entretanto, foram formados alguns aglomerados de células, que acabam dificultando o processo de recuperação do P(3HB), pois, seja qual for o método utilizado para esta recuperação, é necessário maximizar a superfície de contato das células com o meio. Assim, realizou-se o peneiramento do material, de modo a uniformizar as partículas de aglomerado, garantindo uma granulometria de células secas inferior a 28 *mesh* e facilitando as recuperações posteriores.

3.2 Testes iniciais para determinação de P(3HB)

Para quantificação do P(3HB), utilizou-se uma metodologia semelhante à utilizada por Fernandes Júnior (2009), adaptada de Karr (1983). Esta metodologia utiliza quantificação de ácido crotônico em HPLC, mediante conversão de P(3HB) a ácido crotônico ao reagir com ácido sulfúrico concentrado. Como esta metodologia é mais simples que aquela que vinha sendo utilizada no grupo de pesquisa (LABIO e LATEP) para quantificação de P(3HB), o objetivo dos testes realizados com este método foi fazer sua avaliação prática e, assim, estabelecer se seria efetivamente vantajosa sua utilização em lugar do método anteriormente utilizado.

Os testes iniciais foram realizados utilizando-se polímero puro adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich) para a construção de uma curva padrão. Para tanto, foram pesadas as massas do biopolímero comercial, conforme a Tabela 3.3. Todos os pontos da curva foram feitos em duplicata.

Tabela 3.3 Massas pesadas em miligramas para cada amostra com P(3HB) comercial em duplicata.

Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)
1	1,1	5	5,1	9	15,0
2	1,0	6	5,6	10	15,0
3	2,2	7	9,9	11	20,2
4	2,0	8	9,7	12	20,2

A cada amostra, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). Os frascos foram colocados em banho Maria durante 60 minutos, mantendo-se uma temperatura dentro do intervalo de 90 - 95 °C e realizando-se agitações periódicas nos tubos a cada 15 minutos de experimento. Após o tempo de reação, as amostras foram deixadas para esfriar até atingir temperatura ambiente e, então, foram adicionados 4 mL de uma solução de ácido sulfúrico 4 mM, mantendo-se os tubos em banho de gelo por 10 minutos.

Para injeção em HPLC procedeu-se mais uma diluição para chegar a uma proporção de (1:10). A 200 µL do conteúdo de cada amostra, que compõe a curva padrão, adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico 4 mM. Realizou-se a filtração das amostras com membrana de acetato de celulose, diâmetro de poro 0,45 µm. Por último, as amostras foram injetadas no equipamento de HPLC com coluna *Phenomenex Rezex RHM-Monosaccharide H+ (8%)*, solução de H₂SO₄ 4 mM como fase móvel à vazão de 0,5 mL/min e temperatura de coluna de 60 °C. O detector utilizado foi do tipo DAD em comprimento de onda de 210 nm.

3.3 Testes de interação P(3HB) x líquido iônico

Com a finalidade de verificar a possibilidade de interferência nos resultados experimentais, realizou-se experimentos para verificar a possibilidade de interação do LI com a cadeia do biopolímero. Para tanto, foram feitas duas soluções de concentrações distintas (1 mg/mL e 100 mg/mL) do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio (C₁₆MImCl) com água mili-Q. Então, 1 mL de cada uma destas soluções foi colocado em contato com 0,05 g de P(3HB)

comercial por 24 h (DUBEY e colaboradores, 2018), conforme a Figura 3.1. Os testes foram realizados em duplicata para as temperaturas de 30, 60 e 90 °C em banho, sob agitação.

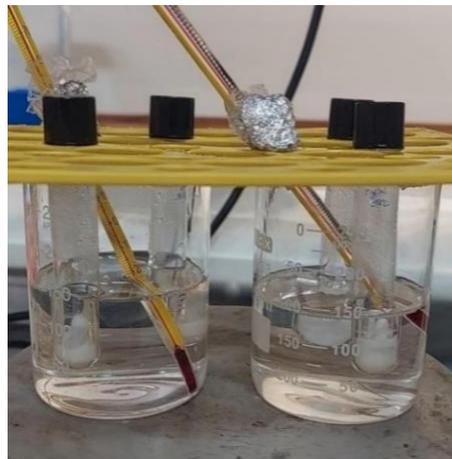


Figura 3.1 Aparato experimental para contato P(3HB) comercial – solução LI.

Após o contato, 1 mL de água mili-Q foi adicionado à cada amostra e as soluções foram centrifugadas à 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para posterior análise e o precipitado, ressuspensionado em 1 mL de água mili-Q para mais uma centrifugação sob as mesmas condições. Enfim, o novo sobrenadante foi descartado e este precipitado foi levado para a estufa, à 60 °C. As massas secas foram, então pesadas em balança analítica. A metodologia descrita está representada esquematicamente na Figura 3.2.

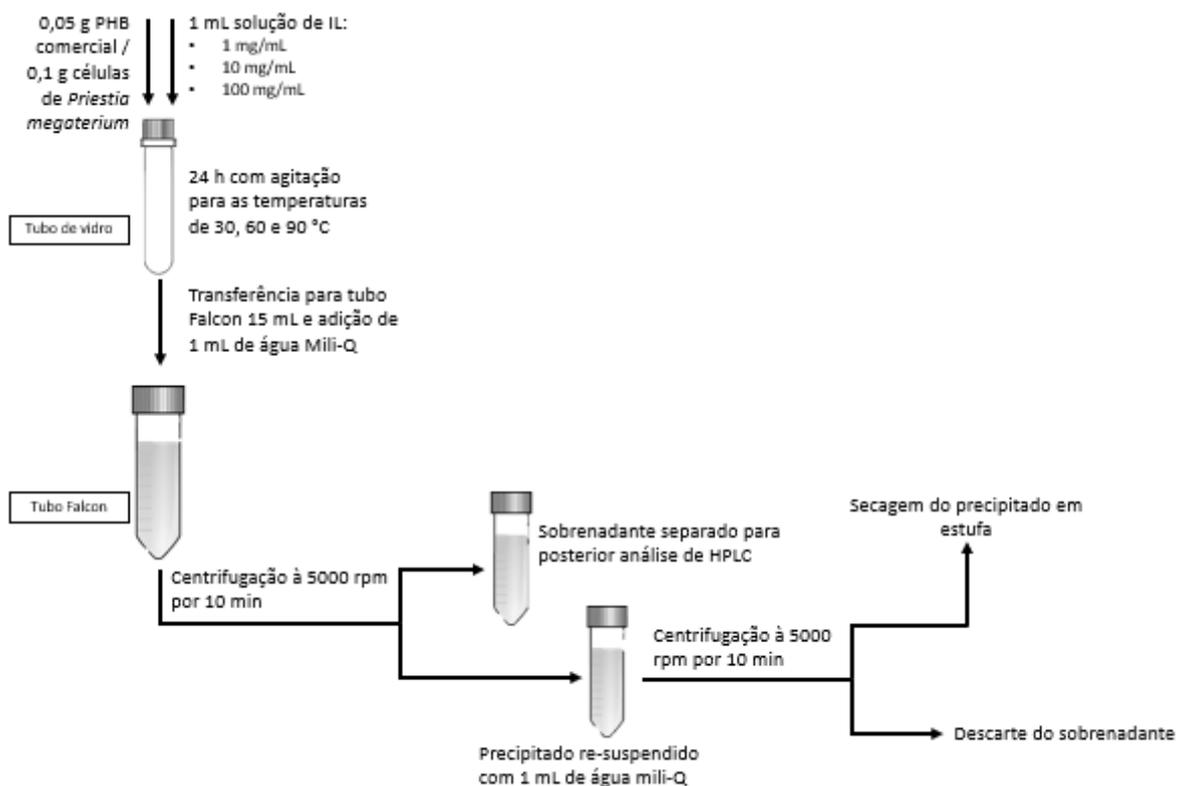


Figura 3.2 Diagrama exemplificando o processo experimental para as amostras de contato P(3HB) – LI ou biomassa – LI. Fonte: Elaboração Própria

3.4 Testes de recuperação de P(3HB) de células bacterianas

Em um segundo momento, foram colocados em contato soluções de $C_{16}MImCl$ de concentrações de 1, 10, e 100 mg/mL com 0,1 g de células liofilizadas de *Priestia megaterium* contendo P(3HB) acumulado. Cada um destes contatos foi realizado em duplicata, nas temperaturas de 30 e 60 °C. O procedimento experimental seguido pós contato foi o mesmo utilizado nos testes de interação entre P(3HB) e líquido iônico (Figura 3.2), tendo sido os precipitados resultantes também secos a 60 °C em estufa. A análise estatística dos resultados dos experimentos realizados foi feita no software Minitab, avaliando-se a influência das variáveis temperatura e concentração da solução de LI nos resultados de diferença de massa antes e após os contatos.

As amostras secas em estufa (etapa final do procedimento da Figura 3.2) foram submetidas a contato com ácido sulfúrico e, então, à análise de HPLC, juntamente a uma curva de calibração. A partir das áreas obtidas nos cromatogramas das amostras e com a equação obtida pela curva de calibração, calculou-se a massa de P(3HB) nas amostras segundo a metodologia seguida por Quines (2017). Assim, o percentual de P(3HB) nas amostras (pureza) foi calculado a partir da Equação 1, na qual m_{P_HPLC} é a massa de biopolímero obtida pelo resultado da análise de HPLC e m_{t_HPLC} é a massa total da amostra pesada para realização da análise de HPLC.

$$Pureza [\%] = \frac{m_{P_HPLC}}{m_{t_HPLC}} \times 100 \quad (1)$$

A partir da pureza do P(3HB), foi possível determinar o percentual de recuperação do polímero por meio das Equações 2 e 3.

$$m_{P_f} = m_{t_f} \times Pureza \quad (2)$$

$$Recuperação [\%] = \frac{m_{P_f}}{m_{P_i}} \quad (3)$$

onde:

m_{P_f} = massa de P(3HB) puro (g) na amostra após a recuperação;

m_{t_f} = massa total obtida após a recuperação (g);

m_{P_i} = massa total de P(3HB) nas células antes da recuperação (g).

4 Resultados e Discussão

4.1 Testes iniciais para determinação de P(3HB)

Os testes realizados tiveram como objetivo a verificação inicial do método de detecção e quantificação de P(3HB) a partir da metodologia de HPLC descrita na Seção 3.2. Na Figura 4.1 mostra-se um cromatograma obtido para uma amostra comercial de P(3HB) puro (a) e outro obtido para células bacterianas contendo P(3HB) em seu interior (b). Destaca-se a semelhança entre os dois cromatogramas, que indica a capacidade do método de quantificar o

biopolímero contido na massa celular bacteriana. Além disso, pode-se observar que na análise das células (b), não se constatou presença de picos adicionais em função de impurezas de origem celular, mesmo tendo-se usado um maior tempo de corrida cromatográfica.

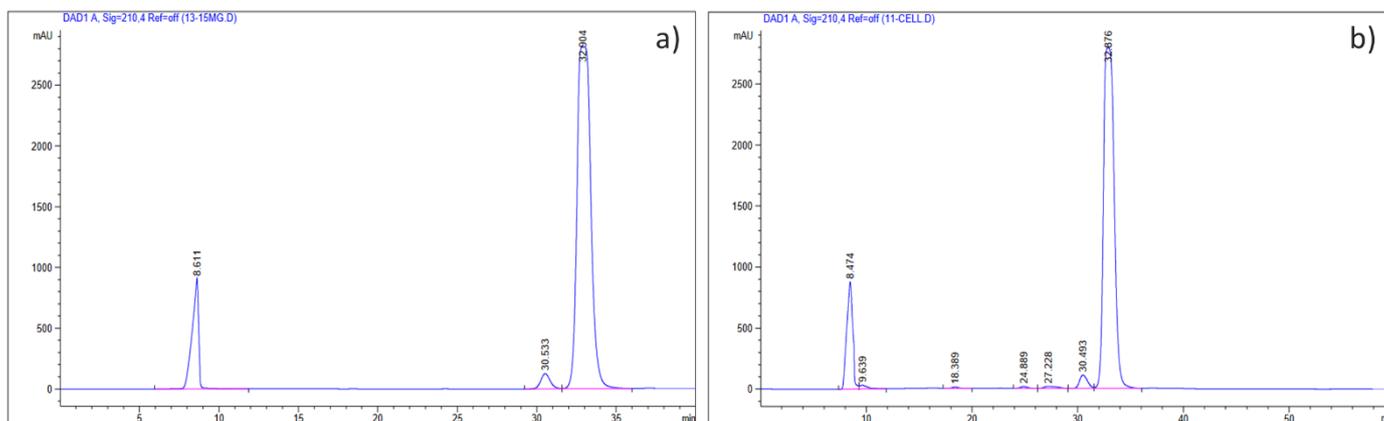


Figura 4.1 Cromatogramas obtidos para quantificação de ácido crotonico: (a) a partir de P(3HB) comercial; (b) a partir de células bacterianas de *Priestia megaterium*.

Na Figura 4.2 apresenta-se a curva padrão obtida, na qual observa-se uma correlação linear satisfatória entre os dados, o que pode ser constatado a partir do valor de R^2 de 0,9923. Além disso, é importante ressaltar que a curva não passa pela origem do gráfico e este fenômeno é também observado em todos os trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a presente metodologia para quantificação de P(3HB).

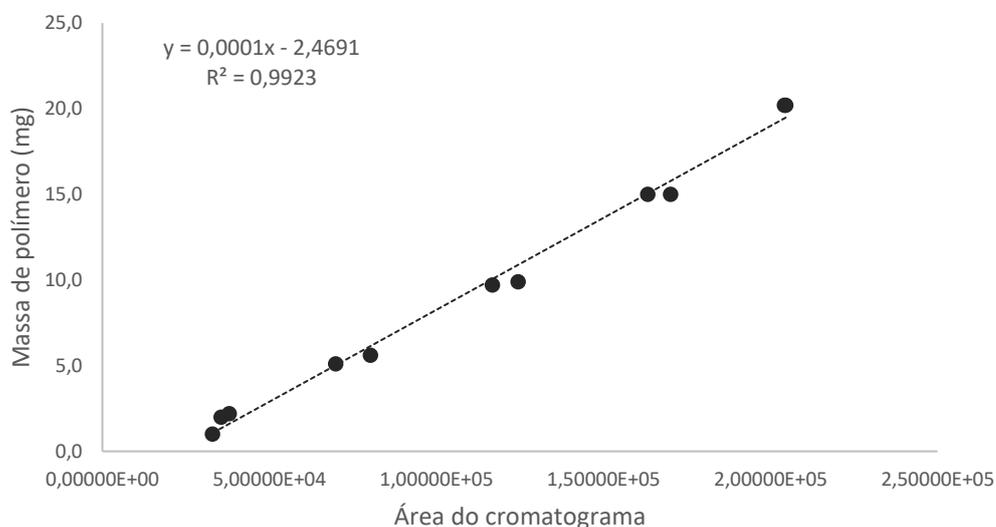


Figura 4.2 Curva de calibração construída a partir de quantidades conhecidas de P(3HB) comercial, descritas na Seção 3.2.

Outro objetivo deste teste foi o de verificar a estabilidade das amostras com o passar do tempo. Para tanto, as mesmas amostras foram analisadas no dia em que passaram pelo procedimento experimental de digestão com H_2SO_4 (resultado que se encontra apresentado na Figura 4.2), um dia e duas semanas após o procedimento. Com isso, pôde-se observar que as amostras apresentam uma grande estabilidade, com os desvios apresentados estando ligados à variabilidade intrínseca ao método de HPLC empregado e não impactando de forma significativa nos resultados encontrados.

Por fim, células bacterianas foram submetidas à mesma metodologia, com o intuito de verificar se os resultados de percentual de P(3HB) encontrado nas amostras estavam de acordo com o esperado. Como resultado, obteve-se, em média, 45,2% em massa de P(3HB) por biomassa bacteriana e este resultado foi similar ao obtido a partir da metodologia padrão utilizada para quantificação no grupo de pesquisa (propanólise seguida de cromatografia gasosa). Deste modo, foi possível verificar a capacidade da metodologia para quantificação do biopolímero e seguir utilizando-a para a sequência do trabalho.

4.2 Testes de interação P(3HB) x líquido iônico

Os primeiros testes utilizando LIs foram realizados com o objetivo de investigar possíveis interações entre o P(3HB) e o C₁₆MImCl. Assim, as soluções de LI foram colocadas em contato com massas conhecidas de P(3HB) comercial e, após o processo de secagem em estufa à 60 °C, realizou-se a comparação da massa seca final obtida e a massa de polímero inicialmente pesada. Estes resultados podem ser observados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 para as temperaturas de 30, 60 e 90 °C, respectivamente.

Tabela 4.1 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 30 °C.

Solução	Massa P(3HB) pesada (g) [M1]	Massa tubo Falcon vazio [M2]	Massa Falcon + P(3HB) [M3]	M3 - M2	Desvio (M3 - M2) / M1
1 mg/mL LI	0,0505	6,1402	6,1889	0,0487	-3,6%
1 mg/mL LI	0,0503	6,1102	6,1574	0,0472	-6,2%
100 mg/mL LI	0,0503	6,1592	6,2064	0,0472	-6,2%
100 mg/mL LI	0,0500	6,1732	6,2256	0,0524	4,8%

Tabela 4.2 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 60 °C.

Solução	Massa P(3HB) pesada (g) [M1]	Massa tubo Falcon vazio [M2]	Massa Falcon + P(3HB) [M3]	M3 - M2	Desvio (M3 - M2) / M1
1 mg/mL LI	0,0501	6,1365	6,1815	0,0450	-10,2%
1 mg/mL LI	0,0505	6,2579	6,3036	0,0457	-9,5%
100 mg/mL LI	0,0502	6,1799	6,2329	0,0530	5,6%
100 mg/mL LI	0,0503	6,1413	6,1923	0,0510	1,4%

Tabela 4.3 Valores de massa medidos e desvios calculados para tubos antes (M1) e depois (M3 – M2) dos testes à 90 °C.

Solução	Massa P(3HB) pesada (g) [M1]	Massa tubo Falcon vazio [M2]	Massa Falcon + P(3HB) [M3]	M3 - M2	Desvio (M3 - M2) / M1
1 mg/mL LI	0,0501	6,2492	6,2997	0,0505	0,8%
1 mg/mL LI	0,0499	6,2601	6,3105	0,0504	1,0%
100 mg/mL LI	0,0497	6,1979	6,2579	0,0600	20,7%
100 mg/mL LI	0,0499	6,2195	6,2802	0,0607	21,6%

A análise dos dados apresentados nas Tabelas 4.1 a 4.3 permite inferir que, de modo geral, os desvios obtidos não são muito elevados. Para as amostras dos testes a 30 °C, o maior desvio observado foi uma perda de 6,2%, o que equivale a uma massa de 3,1 mg. Para os testes à 60 °C, houve um aumento no desvio, chegando à perda de 10,2% (5,1 mg), para a primeira amostra e 9,5 % (4,8 mg), para a segunda. O caso onde obteve-se a maior diferença entre as massas ocorreu para a temperatura de 90 °C, na qual houve aumentos na ordem de 20% nas amostras com 100 mg/mL de LI.

Os testes realizados a 30 °C foram os primeiros a serem conduzidos. Nestes, foi retirada uma quantidade maior de sobrenadante após a segunda centrifugação realizada, chegando muito próximo a interface líquido-sólido. Esta proximidade ao sólido precipitado no momento da sucção do sobrenadante pode justificar as perdas de massa observadas, pois é possível que parte do polímero precipitado tenha sido retirado. Esta hipótese foi reforçada com o aparecimento de um precipitado branco, possivelmente P(3HB), nos tubos no qual o sobrenadante foi armazenado após os testes. O mesmo pode ser dito para o caso de 60 °C. Para os testes à 90 °C, um maior cuidado foi tomado na retirada do sobrenadante, de modo a evitar a perda de precipitado.

Uma especial atenção deve ser posta nos resultados obtidos para os contatos com concentração de 100 mg/mL de LI. De modo geral, salvo no terceiro ponto dos testes à 30 °C, houve um aumento da massa final obtida em relação à massa de polímero inicialmente pesada. Este fato pode estar relacionado à precipitação de LI juntamente ao polímero na etapa de centrifugação, o que acarretaria a diminuição da pureza do produto obtido. Uma hipótese para este fenômeno é que pode ocorrer uma interação devido a forças de coesão entre as moléculas de LI e de biopolímero, fazendo com que as primeiras fiquem “aprisionadas” na rede de P(3HB). Na temperatura de 90 °C, um aumento considerável de massa foi observado, sugerindo que, possivelmente, a temperaturas mais elevadas, este efeito seja mais pronunciado, em virtude de uma maior interação entre o LI e o biopolímero, além do efeito de fusão do líquido iônico que pode interferir em sua interação com o P(3HB). Uma análise mais detalhada desta possível interação deve ser feita, realizando uma avaliação criteriosa do efeito da temperatura e do ponto de fusão, do tempo de contato e da concentração de LI sobre a interação entre a solução de LI e o biopolímero.

Posteriormente, de modo a verificar uma possível quebra do biopolímero em ácido crotônico por ação do LI, as amostras de sobrenadante resultantes do primeiro processo de

centrifugação foram submetidas à análise de HPLC. Constatou-se a presença de picos na região correspondente ao ácido crotônico; porém, de intensidade muito baixa. Assim, pode-se inferir que, muito embora tenha possivelmente havido quebra de P(3HB) e conversão à ácido crotônico, a pequena quantidade detectada indica que esta quebra não deveria interferir de forma significativa nos resultados obtidos nas condições utilizadas. Entretanto, também neste caso seria interessante uma avaliação mais profunda desta interação e da ação de Lis em relação à quebra de P(3HB) deve ser performada, o qual permitiria a definição de condições ótimas em termos de minimização deste efeito na concorrência com o ataque à parede celular.

4.3 Testes de recuperação de P(3HB) de células bacterianas

Os testes de recuperação de P(3HB) do interior das células foram realizados nas concentrações de LI de 1, 10 e 100 mg/mL. Cada uma destas soluções foi posta em contato com 0,1 g de células de *Priestia megaterium* nas temperaturas de 30 e 60 °C, com um tempo experimental de 24 h. Após a condução dos passos descritos na Figura 3.2 e da secagem das amostras, realizou-se a pesagem de cada tubo, de modo a comparar as massas iniciais com as obtidas ao final dos procedimentos descritos. As massas iniciais, finais, a diferença entre estas, bem como o percentual desta diferença são apresentados na Tabela 4.4 para cada um dos pontos experimentais à 30 e 60 °C.

Tabela 4.4 Diferença de massas entre o início e o final do processo para cada uma das 6 amostras nas temperaturas de 30 e 60 °C.

30 °C				60 °C			
Solução	Biomassa inicial [g]	Massa após contatos [g]	Percentual redução [%]	Solução	Biomassa inicial [g]	Massa após contatos [g]	Percentual redução [%]
1 mg/mL LI	0,0998	0,0729	27,0	1 mg/mL LI	0,1000	0,0752	24,8
1 mg/mL LI	0,1012	0,0743	26,6	1 mg/mL LI	0,1000	0,0763	23,7
10 mg/mL LI	0,0999	0,0854	14,5	10 mg/mL LI	0,1000	0,0845	15,5
10 mg/mL LI	0,0997	0,0829	16,9	10 mg/mL LI	0,1003	0,0858	14,5
100 mg/mL LI	0,1007	0,0936	7,1	100 mg/mL LI	0,1008	0,0961	4,7
100 mg/mL LI	0,1000	0,0921	7,9	100 mg/mL LI	0,1000	0,0963	3,7

A observação destes resultados mostra uma proximidade dos percentuais de redução de massa entre duplicatas (o que confere uma boa repetibilidade para o método), mas também entre amostras de mesma concentração de LI para temperaturas diferentes. Além disso, é possível observar que, conforme a concentração da solução de LI foi aumentada, o percentual de redução de massa foi diminuindo, chegando a uma diferença de, aproximadamente, 20 % entre as amostras de solução de LI de 1 mg/mL e de 100 mg/mL. De acordo a um teste estatístico ANOVA com um intervalo de 95% de confiança, tanto a temperatura, quanto a concentração tiveram influência significativa no resultado; entretanto, enquanto a influência da temperatura foi muito baixa, a influência exercida pela concentração da solução de LI foi bastante alta.

Como observado, as amostras de 1 mg/mL foram as que apresentaram a maior redução de massa, sugerindo uma maior remoção de material celular do meio. Entretanto, o fato das amostras de maior concentração de solução de LI apresentarem uma menor redução de massa, pode também estar associado à precipitação de parte do LI juntamente ao polímero, fato discutido na Seção 4.2.

Os precipitados secos também foram submetidos à metodologia de HPLC apresentada na Seção 3.2 para permitir o cálculo da pureza das amostras e do rendimento da recuperação (Seção 3.4). Todas as corridas cromatográficas foram realizadas em duplicata e o valor considerado foi a média de ambos os resultados. A Figura 4.3 apresenta os resultados de pureza obtidos a partir da utilização da Equação 1. Estes resultados estão apresentados para cada um dos 6 pontos em cada uma das temperaturas testadas e subdivididos pela concentração da solução de LI utilizada para a amostra.

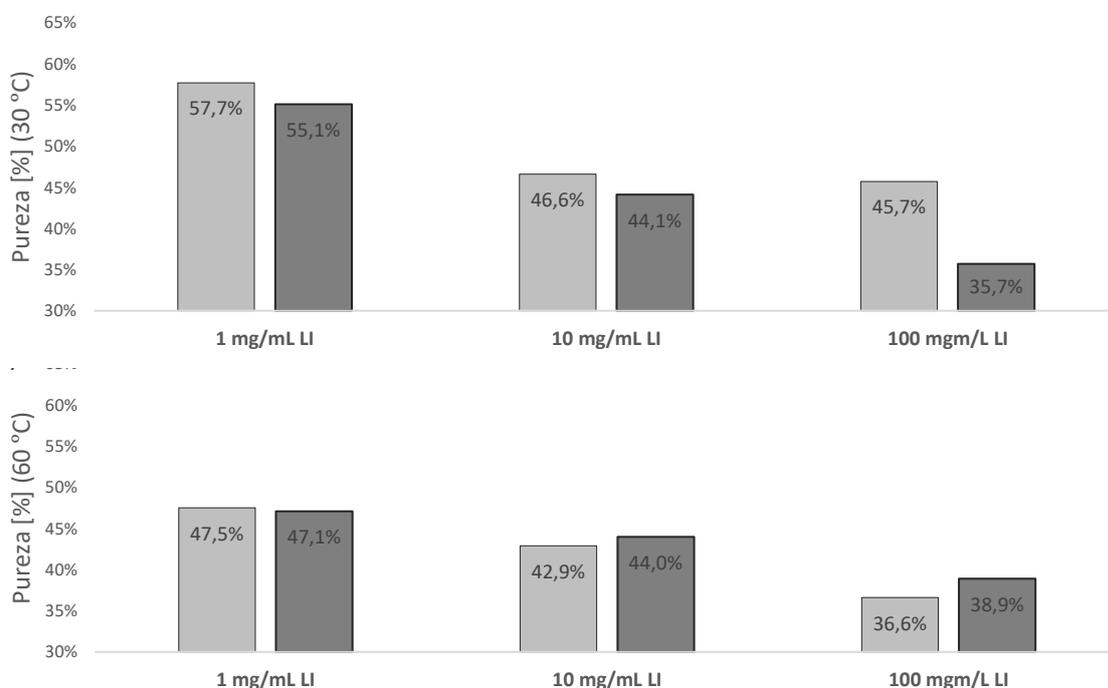


Figura 4.3 Purezas obtidas para cada amostra após contato entre biomassa e as soluções de LI testadas. Em a), para os contatos à 30 °C e, em b) para os contatos à 60 °C.

A partir dos valores de pureza da Tabela 4.4, foi possível calcular a recuperação para cada ponto experimental a partir da utilização das Equações 2 e 3. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Valores de recuperação obtidos para cada ponto experimental nas temperaturas de 30 e 60 °C, sendo m_f a massa em gramas obtida após a recuperação, m_p a massa em gramas de P(3HB) puro e m_i a massa de P(3HB) original contida nas células.

30 °C					60 °C				
Solução	m_f [g]	m_p [g]	m_i [g]	Recuperação [%]	Solução	m_f [g]	m_p [g]	m_i [g]	Recuperação [%]
1 mg/mL LI	0,0729	0,0421	0,0451	93,2	1 mg/mL LI	0,0752	0,0357	0,0452	79,0
1 mg/mL LI	0,0743	0,0409	0,0457	89,5	1 mg/mL LI	0,0763	0,0359	0,0452	79,5
10 mg/mL LI	0,0854	0,0398	0,0452	88,1	10 mg/mL LI	0,0845	0,0363	0,0452	80,2
10 mg/mL LI	0,0829	0,0366	0,0451	81,1	10 mg/mL LI	0,0858	0,0378	0,0453	83,3
100 mg/mL LI	0,0936	0,0428	0,0455	94,0	100 mg/mL LI	0,0961	0,0352	0,0456	77,2
100 mg/mL LI	0,0921	0,0329	0,0452	72,7	100 mg/mL LI	0,0963	0,0375	0,0452	82,9

Com relação aos resultados de pureza apresentados na Figura 4.3, nota-se que o melhor desempenho encontrado ocorreu para a concentração de 1 mg/mL, na temperatura de 30 °C. Nestas condições, foi possível obter-se, em média, uma pureza de 56,4 % de P(3HB). Para os demais resultados, a pureza encontrada não apresentou grandes diferenças em relação àquela correspondente às células intactas (45,2 %). Além disso, quando se observam os resultados de rendimento (Tabela 4.5) é possível perceber que os maiores encontrados dizem respeito aos testes à 30 °C, chegando a valores superiores à 90 %. Para as amostras de 60 °C, os resultados de recuperação foram em geral inferiores, assim como no último ponto dos testes a 30 °C, provavelmente devido à co-precipitação de LI.

Ainda, destaca-se o fato de que, o método de quantificação por HPLC é antecedido pela quebra do envoltório celular pela ação do ácido sulfúrico. Assim, não é possível distinguir se, anteriormente ao processo de quantificação, o P(3HB) encontrava-se no interior das células ou disperso no meio, liberado do envoltório celular. Portanto, ainda no caso em que se obteve aumento de pureza (1 mg/mL de LI a 30 °C) não é possível determinar por qual mecanismo este efeito aconteceu (quebra de parede celular, digestão de camadas mais externas da parede celular, etc.) De modo a investigar com maior aprofundamento esta questão, seria possível realizar preparos em placas e observações em microscopia óptica (aumento de 1000x) das soluções de contato LI – células ao longo do tempo experimental (KOBAYASHI e colaboradores, 2015). Desse modo, se tornaria possível avaliar a condição do biopolímero no meio: se houve a liberação, ou se ele permanece contido no interior bacteriano.

Embora os resultados de rendimento para os testes à 30 °C tenham sido satisfatórios, a pureza em todos os casos testados não atingiu patamares desejáveis em se tratando de um processo com potencial de escalonamento. Estes resultados de pureza podem estar associados com o que foi observado nos testes de contato LI – P(3HB) comercial, uma possível associação das moléculas de LI às de P(3HB) causando um efeito de coprecipitação e aumentando assim a impureza do produto obtido. De modo a investigar esta possibilidade mais a fundo, poderiam ser realizadas análises de FTIR e de ^1H NMR para investigar de forma mais elucidativa as impurezas presentes na amostra obtida ao final do processo.

Uma possível explicação para a presença de LI no precipitado reside na possibilidade de baixa eficiência do método de separação realizado após o contato com as células. Na

literatura, os trabalhos que buscaram a recuperação de material polimérico intracelular a partir da utilização de LIs utilizaram metanol como anti-solvente para efetuar a separação, obtendo purezas e recuperações de, respectivamente, 86% e 60% (DUBEY e colaboradores, 2018) e 30% e 98% (KOBAYASHI e colaboradores, 2015); cabe ressaltar, entretanto, que nos referidos trabalhos foram utilizados outros LIs e para outros microrganismos. No presente trabalho, optou-se pela utilização de água, com o objetivo de uma abordagem mais sustentável, mas uma possível alteração que poderia ser feita no protocolo experimental utilizado seria a adição de mais lavagens após o contato células – solução de LI. Além disso, na etapa de separação do P(3HB) do LI, a literatura sugere a utilização de uma membrana filtrante, através da qual a solução de LI permearia, mas o biopolímero ficaria contido. No presente trabalho, foi utilizada a centrifugação, que pode ter acarretado a precipitação de LI juntamente ao P(3HB).

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar o desempenho de um método para quantificação de P(3HB) pela quebra em ácido crotônico e determinar o efeito do líquido iônico cloreto de 1-hexadecilimidazólio na recuperação de poli(3-hidroxi-*butirato*) do interior de células da espécie Gram-positiva *Priestia megaterium*. A partir do desenvolvimento deste, foi possível chegar às seguintes conclusões:

1. O método testado para quantificação de P(3HB), a partir da quebra da cadeia polimérica a ácido crotônico por ação de ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, apresentou resultados que estiveram em concordância com aqueles gerados pela técnica de metanólise atualmente utilizada pelo grupo para este fim, além de boa reprodutibilidade. Assim, este método foi selecionado para as posteriores quantificações ao longo do desenvolvimento do trabalho;
2. Com relação à determinação dos efeitos da utilização do LI, a etapa inicial de testes de interação LI – P(3HB) indicou que o contato com o LI pode promover um certo grau de degradação do biopolímero, mas a níveis suficientemente baixos para permitir sua utilização em uma etapa de recuperação de P(3HB), tendo sido a redução de massa observada nas temperaturas de 30 e 60 °C inferior à 10%;
3. Em relação aos testes de contato entre o LI e as células bacterianas, apenas a condição de 1 mg/mL de LI à 30 °C gerou melhoria significativa na recuperação de P(3HB), chegando a um resultado de, em média 56,4%. Os resultados das maiores concentrações de LI podem, entretanto, estarem mascarados pelo efeito de coprecipitação do LI juntamente ao biopolímero.

Neste sentido, os resultados apresentados abrem a oportunidade de uma investigação mais aprofundada da interação LI – P(3HB), sendo possível a realização de testes com contatos feitos com água pura e com concentrações distintas da solução de LI; com um maior número de pontos experimentais de temperatura e com diferentes tempos de contato entre a solução e o biopolímero para maior entendimento da natureza da interação.

No caso do contato entre as soluções de LI e as células bacterianas, podem ser realizados mais testes com concentrações mais baixas de LI, variando outros parâmetros, como: proporção solução/células, natureza do LI, temperatura, tempo de contato, etc para avaliar se é possível obter resultados ainda mais promissores do que aqueles utilizando-se a solução de LI 1 mg/mL. Além disso, microscopia óptica pode ser utilizada para verificação do rompimento celular e da liberação do biopolímero ao longo do contato das células com as soluções de LI e novas metodologias devem ser testadas para separação do P(3HB) obtido da biomassa, como a utilização de filtração e de metanol como antissolvente.

Destaca-se também a necessidade de aprofundar as investigações com relação ao produto obtido após o processo de recuperação. Para tanto, poderiam ser realizadas análises de FTIR e ^1H RMN para melhor compreender a composição do produto obtido; ensaio de microscopia óptica para constatar a liberação do biopolímero do interior das células e análises complementares de propriedades mecânicas do polímero, para avaliar se houve alguma modificação a partir da ação do LI.

REFERÊNCIAS

- ALFANO, S.; LORINI, L.; MAJONE M. Ethylic esters as green solvents for the extraction of intracellular polyhydroxyalkanoates produced by mixed microbial culture. **Polymers**, v. 13, 2021.
- ANDLER, R.; PINO, V; MOYA, F. Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. **International Journal of Biobased Plastics**, v. 3, p. 98–111, 2021.
- ANJUM, A.; ZUBER, M; ZIA, K. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.
- BAIDURAH, S.; KOBAYASHI, T. Polyhydroxyalkanoates: Production and Biodegradation - A Review. **Encyclopedia of Materials: Plastics and Polymers**, p. 530–540, 2022.
- BARANWAL, J. et al. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. **Polymers**, 2022.
- BENEDETTO, A.; BALLONE, P. Room-Temperature Ionic Liquids and Biomembranes: Setting the Stage for Applications in Pharmacology, Biomedicine, and Bionanotechnology. **Langmuir**, 2018.
- BISSACOT, E. **Comparação de diferentes metodologias para purificação de PHA : uma revisão bibliográfica**. Monografia. (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, p. 55. 2018.
- BORGES, F.; FACCIN, D.; RECH, R. **EVALUATION OF SOLVENT PERFORMANCE IN THE EXTRACTION OF P(3HB) FROM GRAM-POSITIVE BACTERIA *Bacillus megaterium***, 2017.
- BRANDL, H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(P-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, 1988.
- CARSON, L.; CHAU, P.; EARLE, M. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 492–499, 2009.
- CHEN, G. Q.; PATEL, M. K. Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. **Chemical Reviews**, 2012.
- CORRÊA, M. **EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO P(3HB) COM SOLVENTE RENOVÁVEL**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, p. 77. 2014.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Microorganisms. **Energy Reserve Polymers in Micro-organisms**, 1973
- DOCHERTY, K. M.; KULPA, C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 185–189, 2005.
- DUBEY, S.; BHARMORIA, P.; GEHLOT, P. 1-Ethyl-3-methylimidazolium Diethylphosphate Based Extraction of Bioplastic “polyhydroxyalkanoates” from Bacteria: Green and Sustainable Approach. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 766–773, 2018.
- EHSAN KIANFAR; SAJJAD MAFI. Ionic Liquids: Properties, Application, and Synthesis. **Fine Chemical Engineering**, p. 22–31, 2020.
- ESHETU, G.; MECERREYES, D.; FORSYTH, M. Polymeric ionic liquids for lithium-based rechargeable batteries. **Molecular Systems Design and Engineering**, 2019.

- FACCIN, D. **Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por Bacillus megaterium e modelagem do bioprocesso**. Tese. (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, p. 160. 2012.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Caracterização Fenotípica e Produção de Biopolímeros por Bactérias Isoladas de Nódulos de Guandu [(Cajanus cajan (L.) Millsp.)]**. Tese (Doutorado em Agronomia), UFRRJ, Rio de Janeiro, p.183, 2009.
- FUMINO, K.; REIMANN, S.; LUDWIG, R. Probing molecular interaction in ionic liquids by low frequency spectroscopy: Coulomb energy, hydrogen bonding and dispersion forces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 40, p. 21903–21929, 2014.
- GAHLAWAT, G.; KUMAR SONI, S. Study on sustainable recovery and extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by cupriavidus necator using waste glycerol for medical applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 33, n. 1, p. 99–110, 2019.
- GANAPATHI, P.; GANESAN, K. Anti-bacterial, catalytic and docking behaviours of novel di/trimeric imidazolium salts. **Journal of Molecular Liquids**, v. 233, p. 452–464, 2017.
- GETACHEW, A.; WOLDESENBET, F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.
- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, 2017
- GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, 2013.
- HALLETT, J. P.; WELTON, T. Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. 2. **Chemical Reviews**, 2011.
- HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical Fluid Disruption of Ralstonia eutropha for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 5, p. 1519–1523, 2003.
- HURLEY, F. H.; WIER, T. P. Electrodeposition of Metals from Fused Quaternary Ammonium Salts. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 98, n. 5, p. 203, 1951.
- ISRANI, N.; THAPA, S.; SHIVAKUMAR, S. Biolytic extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from Bacillus megaterium T13 using the lytic enzyme of Streptomyces albus Tia1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 265–271, 2018.
- JÜTTNER, R. R.; LAFFERTY, R. M.; KNACKMUSS, H.-J. A Simple Method for the Determination of Poly-[3-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. **European Journal of Applied Microbiology**, 1975.
- JACQUEL, N.; LO, C.; WEY, Y. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, 2008.
- JANGRA, M.; NEHRA, I.; PIPPAL, S. Recent updates on the economic use of poly hydroxy butyrate (PHB): A green alternative to plastics. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, n. 1, p. 97–109, 2018.
- KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A.; ALLI, R. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by Ralstonia eutropha. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 453–462, 2006.
- KARR, D.; WATERS, J.; EMERICH, D. Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate in Rhizobium japonicum Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. **Applied and environmental microbiology**, 1983.

- KENRY, K.; LIU, B. Recent Advances in Biodegradable Conducting Polymers and Their Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, 2018.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.
- KHIYAMI, M. A.; AL-FADUAL, S. M.; BAHKLIA, A. H. Polyhydroxyalkanoates production via *Bacillus plastic* composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 14, p. 3312–3320, 2011.
- KOBAYASHI, D.; FUJITA, K.; NAKAMURA, N. A simple recovery process for biodegradable plastics accumulated in cyanobacteria treated with ionic liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1647–1653, 2015.
- KRUYT, D. E.; KAMIO, Y.; NIKAIDO, H. Outer Membrane of *Salmonella typhimurium*: Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase C and Cyanogen Bromide Activated Dextran in the External Medium. **Biochemistry**, v.15, 1972.
- KULPRECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009.
- KUMARI, P.; PILLAI, V. V. S.; BENEDETTO, A. Mechanisms of action of ionic liquids on living cells: the state of the art. **Biophysical Reviews**, 2020.
- LEBRETON, L. C. M.; VAN DER ZWET, J.; DAMSTEEG, J. River plastic emissions to the world's oceans. **Nature Communications**, v. 8, 2017.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for the Production of Polyhydroxyalkanoates. **IFAC Proceedings Volumes**, v. 31, n. 8, p. 337–341, 1998.
- LEE, S.Y.; PARK, S.J. **Fermentative production of SCL-PHA's** in: Doi, Y.; STEIBÜCHEL (Eds). *Biopolymers*, v.3, p. 263-290, 2005.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; GARCÍA-TORREIRO, M.; LÚ-CHAU, T. Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 250–259, 2015.
- LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. **Chemosphere**, 2008.
- LUCIANO, B. Polyhydroxyalkanoates based systems: the future of drug delivery and tissue engineering devices. **Bio-Based Nanomaterials: Synthesis Protocols, Mechanisms and Applications**, p. 133–169, 2022.
- LYU, X.; WANG, W.; SUN, Y. Ionic Liquids Catalyzed Friedel–Crafts Alkylation of Substituted Benzenes with CCl_4 Toward Trichloromethylarenes. **Catalysis Letters**, v. 149, n. 3, p. 665–671, 2019.
- MACAGNAN, K.; RODRIGUES, A.; ALVES, M. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. **Quimica Nova**, v. 40, n. 2, p. 125–130, 2017.
- MADKOUR, M.; HEINRICH, D.; ALGHAMDI, M. PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules*. **Biomacromolecules**, 2013.
- MANALI SHAH et al. Bioplastic for future: A review then and now. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 9, n. 2, p. 56–67, 2021.
- MARTZY, R. et al. Simple lysis of bacterial cells for DNA-based diagnostics using hydrophilic ionic liquids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- MARUDKLA, J.; PATJAWIT, A.; CHUENSANGJUN, C. Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 3, p. 266–273, 2018.

- MELIH TAMER, I.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(-hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis, 1998.
- MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B. et al. Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1136–1139, 2009.
- MORADALI, M. F.; REHM, B. H. A. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. **Nature Reviews Microbiology**, 2020.
- MUTELET, F.; BUTET, V.; JAUBERT, J. N. Application of inverse gas chromatography and regular solution theory for characterization of ionic liquids. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 11, p. 4120–4127, 2005.
- NARANJO, J.; POSADA, J.; HIGUITA, J. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38–44, 2013.
- NEUHAUS, F. C.; BADDILEY, J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 686–723, 2003.
- O'TOOLE, G.; WATHIER, M.; ZEGANS, M. Diphosphonium Ionic Liquids as Broad-Spectrum Antimicrobial Agents, **Cornea**, vol. 31, n. 7, p. 810-816, 2012.
- PAJERSKI, W.; OCHONSKA, D. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 21, n. 8, 2019.
- LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, vol. 14, p. 431-438, 1996.
- POVOLO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7902–7907, 2010.
- QUINES, L.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K. Recuperação e reutilização do carbonato de propileno empregado no processo de extração de poli(3-hidroxibutirato). **Polimeros**, v. 27, p. 20–26, 2017.
- RANKE, J. et al. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 430–438, 2007.
- RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2018.
- REITH, J.; MAYER, C. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-Positive bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011.
- RIIS, V.; MAI, W. Note Gas chromatographic determination of poly-P-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, 1988.
- RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1378–1387, 2013.
- DE CARVALHO, C.L. ; ROSA, D. S. . Polypropylene Biodegradation. **Nova Science Publishers**, 2016.
- ROSENBOOM, J. G.; LANGER, R.; TRAVERSO, G. Bioplastics for a circular economy. **Nature Reviews Materials**, 2022.

- SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2010.
- STOLTE, S.; ARNING, J.; BOTTIN-WEBER, U. Anion effects on the cytotoxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 621–629, 2006.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters**, 2000.
- THEO, I.; DE RIJK, C.; VAN DER MEER, I. Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) Composition, 2005.
- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A.; BUCKE, C. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, 2007.
- VERLINDEN, R.; HILL, D.; KENWARD, M. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, 2007.
- VRANEŠ, M.; TOT, A. Correlation between lipophilicity of newly synthesized ionic liquids and selected: *Fusarium* genus growth rate. **RSC Advances**, v. 9, n. 33, p. 19189–19196, 2019.
- Walden, P.I. Ueber die Molekulargrosse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenen Salze. *Известия Российской академии наук. Серия математическая*, 8(6), pp.405-422, 1914.
- WANG, F.; SANG, A.; LEE, Y. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, 1997
- WANG, X.; ZHANG, C.; SHI, F. Purification and Characterization of Lipopolysaccharides. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 27–51, 2010.
- WELTON, T. Ionic liquids: a brief history. **Biophysical Reviews**, 2018.
- WONG, H. S. J.; BHUBALAN, K.; AMIRUL, A. A. A. A Critical Review on the Economically Feasible and Sustainable Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production from Alkyl Alcohols. **Polymers**, 2022.
- XIAO, C.; WANG, H.; MU, X. Ionic-liquid-like copolymer stabilized nanocatalysts in ionic liquids I. Platinum catalyzed selective hydrogenation of o-chloronitrobenzene. **Journal of Catalysis**, v. 250, n. 1, p. 25–32, 2007.