

ESTIMATIVA DO EFEITO DE CO₂ SUPERCRÍTICO NA RECUPERAÇÃO DE P(3HB) PRODUZIDO POR *B. megaterium* ATCC 14581

ASSESSMENT OF SUPERCRITICAL CO₂ EFFECT IN THE RECOVERY OF P(3HB) PRODUCED BY *B. megaterium* ATCC 14581

Paloma Truccolo Reato¹, Rafaela Nery de Melo¹, Bruno Fischer¹, Guilherme de Souza Hassemer¹, Yen-Han Lin², Eunice Valduga¹, Alexander Junges¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Avenida Sete de Setembro, Fátima, 99709-910 - Erechim, RS, Brasil. E-mail: palomareato@gmail.com, rafinha.nm@outlook.com, bruno.fischer.com@hotmail.com, guilherme.hassemer@hotmail.com, junges@uricer.edu.br

² Departamento de Engenharia Química, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, SK S7 N 5A9, Canadá. E-mail: yel360@mail.usask.ca

RESUMO

Uma possível alternativa no combate ao acúmulo de plástico e seus resíduos é a produção de biopolímeros como os polihidroxicanatoos (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 bacterianas 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 o tratamento com propanol apresentou uma taxa de recuperação de 75,18 % do biopolímero. Baseado nos dados encontrados, a recuperação do polímero por tecnologia supercrítica pode ser considerada como uma alternativa viável para a extração e recuperação de polímeros produzidos por microrganismos.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato, P(3HB), *Bacillus megaterium*, Agroindústria, Recuperação, Tecnologia supercrítica.

ABSTRACT

A possible alternative to reduce the number of discarded plastics is the production of biopolymers such as polyhydroxycanoates (PHAs). Among PHAs, poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is one of the most studied, due to its applicability in a wide range of varied processes. Thus, this study seeks to evaluate the potential for extracting P(3HB) from the interior of bacterial cells using supercritical carbon dioxide (CO₂) alongside ethanol and propanol acting as co-solvents. Operation conditions were 150 bar and a temperature of 50° C. The results obtained by using ethanol was 55.51 %, while the treatment with propanol displayed a recovery rate of 75.18 %. Based on the results found, polymer recovery using supercritical technology can be considered as a viable alternative for the extraction and recovery of biopolymers produced by microorganisms.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, P(3HB), *Bacillus megaterium*, Agroindustry, Recovery, Supercritical technology.

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 polihidroxialcanoatos (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 ele 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 a etapa de extração, bem como durante o pós-processamento dos extratos 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 de P(3HB) do interior de células de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empregando dióxido de carbono (CO₂) supercrítico e etanol e propanol como co-solventes.

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 resuspendido 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

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

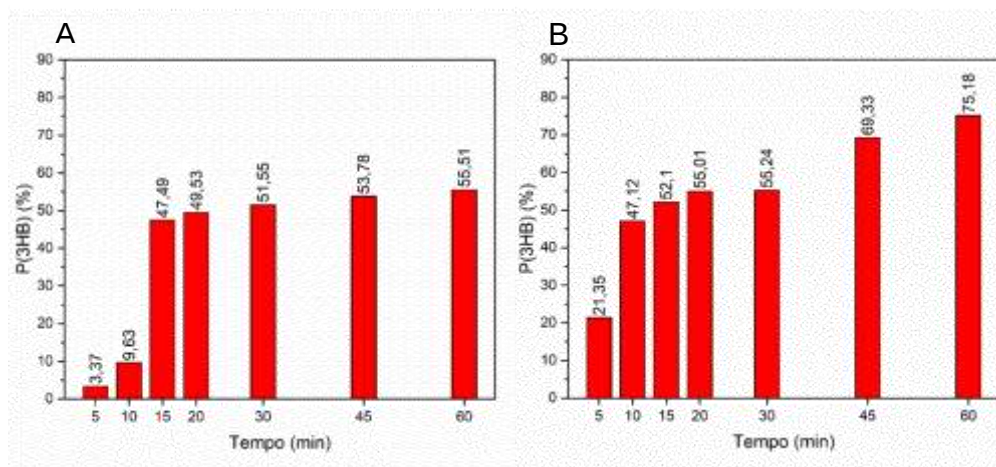


Figura 1 – Recuperação cumulativa de P(3HB) durante o período de recuperação por CO₂ supercrítico utilizando etanol (A) e propanol (B) como co-solventes

Observando a Figura 1, nota-se que ao se utilizar etanol (A), a recuperação máxima obtida após 60 min foi de 55,51 %, enquanto o tratamento com propanol (B) apresentou uma taxa de recuperação 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 de 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.

AGRADECIMENTOS

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

5. REFERÊNCIAS

DALY, S. R.; FATHI, A.; BAHRAMIAN, B.; MANAVITEHRANI, I.; MCCLURE, D.; VALTCHEV, P.; SCHINDELER, A.; DEGHANI, F.; KAVANAGH, J. 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, K. K.; MOZAFARI, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review. *Journal of Biochemical Technology*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 144–152, 2010.

DEMIRDÖĞEN, R. E.; EMEN, F. M.; OCAKOGLU, K.; MURUGAN, P.; SUDESH, K.; AVŞAR, G. 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 dez. 2020.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.s; AYUB, M. A. Z. 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, I. 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. 2021.

ISRANI, N.; SHIVAKUMAR, S. 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. 2020.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KHOSRAVI-DARANI, K.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly (R -hydroxybutyrate) Recovery. [s. l.], 2004.

KOSSEVA, M. R.; RUSBANDI, E. 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, Y.; CHEN, P. T. 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: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107017300846>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

MOHAPATRA, S.; MAITY, S.; DASH, H. R.; DAS, S.; PATTNAIK, S.; RATH, C. C.; SAMANTARAY, D. *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 dez. 2020.

PAKALAPATI, H.; CHANG, C.; SHOW, P. L.; ARUMUGASAMY, S. K.; LAN, J. C. 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, S. L.; BRIGHAM, C. J.; BUDDE, C. F.; BADER, J.; RHA, C.; STAHL, U.; SINSKEY, A. J. Recovery of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* Cultures with Non-Halogenated Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 461–470, 2013.