

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE POLI-HIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE BIOMASSA BACTERIANA

Luci K. M. Quines, Méloidi Schmidt, Kellen Zanfonato, Willibaldo Schmidell e Gláucia M. F. Aragão*

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil

Recebido em 25/04/2015; aceito em 11/06/2015; publicado na web em 23/07/2015

METHODS OF EXTRACTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM BACTERIAL BIOMASS. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable and biocompatible polyesters intracellularly accumulated by many bacteria as an energy reserve material and carbon source. These biopolymers may be extracted from cells after their production phase, and the extraction process involves various individual operations to ensure adequate removal of the biopolymer from the cells. During this process, the following aspects should be considered: reduction of product losses during different stages of the process to obtain a highly pure product, preservation of physical and thermal characteristics, and use of low toxicity chemicals to achieve sustainable production and avoid harming the environment. The impact of the costs of PHA extraction on the total cost of the production process may account for over 50% of the end-value of the product. Within this context, several methods of PHA extraction have been reported in the literature. These methods include the use of solvents, chemical digestion, enzymatic digestion, mechanical extraction with high-pressure homogenization and ultrasound, extraction using supercritical fluids, or a combination of these methods. The present review of the literature shows strategies for extraction processes of PHAs produced by bacteria involving cell destabilization and/or breakage, recovery, and purification of the biopolymer.

Keywords: extraction; polyhydroxyalkanoates; recovery.

INTRODUÇÃO

Inseridos no atual contexto de preocupação com o ambiente, plásticos biodegradáveis têm sido amplamente estudados, a fim de substituir parcialmente os plásticos sintéticos.¹ Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros biodegradáveis que podem ser produzidos por inúmeros microrganismos como forma de reserva energética e de carbono, e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis.^{2,3} Dependendo do substrato utilizado e do metabolismo do microrganismo, diferentes monômeros e, assim, diferentes polímeros e copolímeros podem ser obtidos.⁴

A estrutura dos PHAs é apresentada na Figura 1. Estes polímeros são classificados de acordo com o número de átomos de carbono que compõe o grupo funcional R. Mais de 150 diferentes unidades monoméricas são identificadas como constituintes dos PHAs, fazendo com que diferentes tipos de polímeros sejam criados aumentando a gama de utilizações deste material.⁵ Na Figura 1 o valor de “n” representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero que, na estrutura geral dos PHAs, podendo variar de 100 a 30.000. Este valor está diretamente relacionado à massa molar do polímero e, conseqüentemente, às suas propriedades físicas.⁶

Os PHAs são classificados em três grupos dependendo do número de átomos de carbono nas unidades monoméricas: PHAs constituídos por unidades de ácidos hidroxicanoicos de cadeia curta (PHA_{SC}), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono, os PHAs constituídos por unidades de cadeia média (PHA_{MCL}), apresentando de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia e os de cadeia longa com mais de 15 átomos de carbono (PHA_{LCL}).⁷

Dentre os PHAs, o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e seu copolímero o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) são os mais estudados, apresentando, além de biodegradabilidade e biocompatibilidade, algumas propriedades termoplásticas e mecânicas que permitem suas aplicações como substitutos dos plásticos de origem petroquímica, produzidos a partir de fonte não

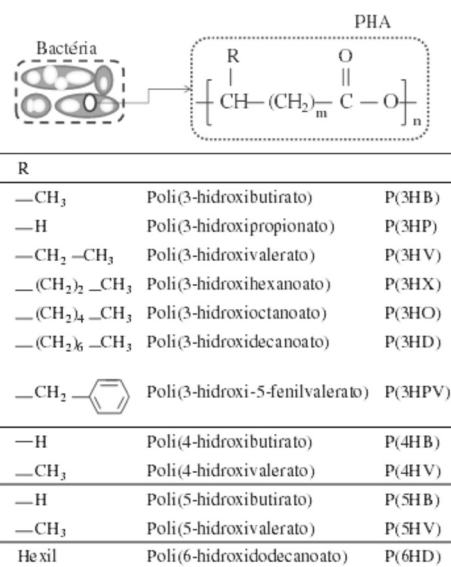


Figura 1. Estrutura molecular geral dos poli-hidroxicanoatos (PHAs), com $m = 1, 2, 3$ e 4 , n variando de 100 a milhares de unidades e R variável (Adaptado da ref. 5)

renovável.^{6,8-11} Apesar das atraentes características dos PHAs, a sua utilização em embalagens de alimentos, em biomedicina, na área farmacêutica e outras aplicações é limitada devido ao seu elevado custo de produção.^{12,13} Por se tratar de um produto acumulado intracelularmente, no citoplasma das células bacterianas, os PHAs devem ser extraídos das células após a etapa de produção (cultivo). O tratamento da biomassa, após o cultivo para a extração do PHA acumulado, é uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar alterações nas propriedades do produto final.¹⁴

O processo de extração de PHAs envolve, geralmente, as seguintes etapas: tratamento de desestabilização e/ou rompimento celular (que pode ser aplicado ou não), separação do meio de cultivo da

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

biomassa, recuperação do biopolímero e purificação. A etapa de extração de PHAs envolve diferentes operações unitárias que garantem a adequada remoção do biopolímero do interior das células. Neste processo, deve-se considerar aspectos como: redução das perdas de produto nas diferentes etapas do processo, obtenção de um produto de elevada pureza e com características físicas e térmicas preservadas e obtenção sustentável do produto, utilizando-se produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente. Estima-se que a etapa de extração dos PHAs possa representar cerca de 50% no custo total do processo de produção, dependendo de variáveis como processo de *downstream* e o conteúdo de PHA na biomassa.^{15,16} Segundo Chen *et al.*,¹⁷ para potencializar a produção de P(3HB), é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e de extração de baixo custo, com impacto ambiental reduzido, a fim de tornar este polímero economicamente competitivo e, desta forma, potencializar a sua aplicabilidade.

Dentre os métodos utilizados nos processos de extração de PHAs estão: aplicação de solventes orgânicos, tais como clorofórmio,^{18,19} carbonato de propileno,^{20,21} acetona,²² cloreto de metileno,^{23,24} acetato de etila¹⁹ e diclorometano;^{25,26} digestores químicos como dodecil sulfato de sódio (SDS),²⁷ hipoclorito de sódio^{28,29} e hidróxido de sódio;³⁰ fluidos supercríticos;^{31,32} digestor biológico (enzimas),³³⁻³⁶ aplicação de métodos mecânicos como homogeneizador à alta pressão, ultrassom, entre outros;³⁷ métodos combinados como mecânico e químico^{38,39} e estudos de liberação espontânea de PHAs.⁴⁰

A técnica de extração de PHAs com solventes orgânicos é a mais utilizada devido à sua facilidade de aplicação, baixa degradação e elevada pureza do produto extraído.⁴¹ Porém, o emprego de solventes tóxicos e voláteis para a extração de PHAs é contraditório à ideia de que estes biopolímeros possam representar alternativas para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros produzidos a partir do petróleo.²⁰

Diversos estudos na literatura propõem o desenvolvimento de metodologias de extração de PHAs, a partir de bactérias, que visam diminuir os custos de processo, substituir e/ou diminuir a aplicação de produtos químicos tóxicos por produtos atóxicos ou de baixa toxicidade, reduzir o tempo e as etapas de extração, diminuir a degradação das cadeias poliméricas e aumentar a recuperação do biopolímero. Neste contexto, esta revisão reporta algumas das estratégias de processos de extração de PHAs, produzidos por bactérias, que envolvem desde o tratamento de desestabilização e/ou rompimento celular até a recuperação e obtenção do biopolímero purificado.

EXTRAÇÃO DE PHAs

A Figura 2 apresenta diferentes estratégias de extração de PHAs a partir de biomassa bacteriana.

O processo completo de extração de PHAs é composto por várias etapas, sendo a primeira, que pode ser realizada ou não, de tratamento da biomassa com a finalidade de aumentar a recuperação polimérica por desestabilização e/ou rompimento da parede celular microbiana.³⁴ Esta primeira etapa é realizada após o cultivo. A biomassa pode ser tratada com métodos químicos (ácidos, álcalis, solvente e detergentes, fluido supercrítico), métodos biológicos (utilização de enzimas), métodos físicos como elevação da temperatura ou mecânicos que são subdivididos em homogeneizador à alta pressão, moinho de bolas, prensa francesa e ultrassom.^{21,38,42-45} Após o rompimento ou desestabilização da parede celular obtém-se uma suspensão constituída por biopolímero (quando ocorre rompimento celular), meio de cultivo, células com biopolímero (células que tiveram a parede celular desestabilizada, mas não rompida) e *debris* celulares (mistura de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e fragmentos de parede celular).

No caso de um processo de extração sem tratamento prévio da

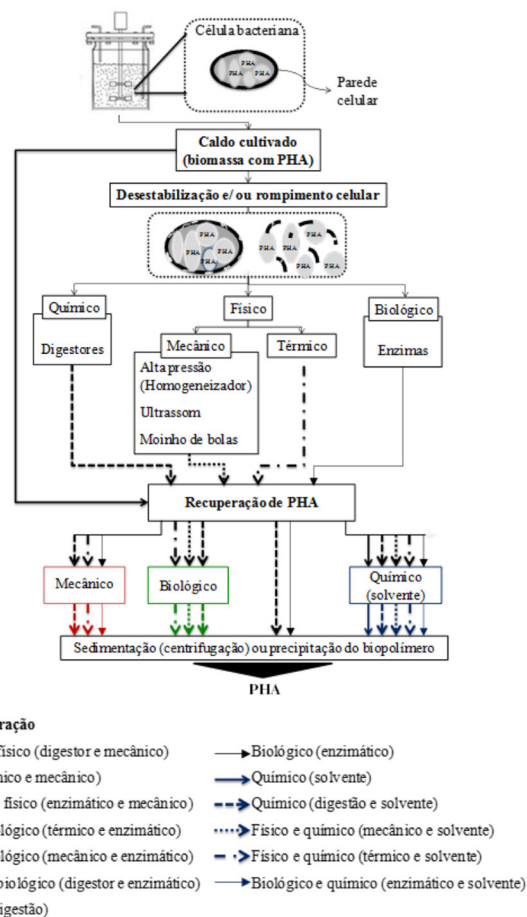


Figura 2. Estratégias de processos de extração de PHA produzido por bactérias e a definição do método de extração que envolve todas as etapas do processo, desde o tratamento da biomassa para desestabilização e/ou rompimento da parede celular até a obtenção do biopolímero

biomassa, este inicia na etapa de separação do material sólido, composto por células com biopolímero intracelular, do caldo de cultivo, que geralmente é realizado por centrifugação. Para biomassa tratada, esta é a segunda etapa do processo de extração.

A etapa seguinte é de recuperação do biopolímero que pode ser realizada com a utilização de métodos químicos, biológicos e físicos ou com a utilização de métodos combinados como físico e químico, biológico e químico, entre outros. O processo é finalizado após a recuperação do biopolímero por sedimentação (centrifugação) ou por precipitação.

Nos itens seguintes serão descritos diferentes métodos de extração de PHAs.

Métodos químicos

Os métodos químicos de extração de PHAs, a partir de bactérias, envolvem a utilização isolada ou combinada de solventes e digestores químicos.

Solvente

A técnica de extração de PHAs com solventes orgânicos é a mais utilizada devido à sua simplicidade, obtenção de polímeros com elevada pureza e reduzida redução da massa molar do produto.^{41,42,46,47} Define-se como solvente a substância capaz de dissolver o soluto, a fim de formar uma solução do soluto no solvente.⁴⁸ A solubilização do polímero por um determinado solvente é possível quando as

interações entre as moléculas do solvente e as cadeias poliméricas apresentam uma magnitude superior à magnitude das interações entre as cadeias poliméricas.⁴⁹

Na extração de PHAs utilizando solvente sob aquecimento, ocorre a modificação da permeabilidade da membrana celular pelo solvente e a solubilização do polímero, formando uma suspensão dos *debris* celulares na solução de polímero e solvente.⁴²

A solubilização polimérica é um processo físico reversível, que não altera a estrutura química polimérica. O polímero sólido em contato com o solvente tende a inchar devido à difusão das moléculas do solvente para dentro da massa polimérica, no volume livre existente entre as cadeias poliméricas, formando um gel.⁵⁰

A solubilidade de um polímero em um determinado solvente é acrescida com a elevação da temperatura e/ou redução da massa molar da cadeia polimérica.⁵⁰ De acordo com Fruet⁵¹ e Souza,⁵² polímeros termoplásticos são caracterizados por possuírem ligações covalentes entre os átomos nas macromoléculas e estas podem ser rompidas com a inserção de energia. Portanto, quando os polímeros são aquecidos, se a energia térmica imposta ao polímero for superior à energia das ligações químicas, algumas dessas ligações podem ser rompidas, causando redução na massa molar do polímero.^{53,54}

Após a solubilização do polímero no solvente, o polímero é separado dos *debris* celulares por filtração ou centrifugação e o produto final normalmente é obtido após a evaporação do solvente ou precipitação do polímero por meio da adição de um “não-solvente”, como álcool e água.⁵⁵ Não-solvente é definido como uma substância que é incapaz de dissolver o biopolímero fazendo com que ocorra a precipitação do mesmo por indução e/ou por enfraquecer o poder de diluição do solvente.⁵⁶

Os solventes mais utilizados nos processos de extração de PHAs a partir de bactérias são: clorofórmio, acetona, metil isobutil cetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etila e álcool isoamílico.^{19,21,22,48,57-59}

De acordo com Mantellato e Durão⁴⁸ e Quines *et al.*,⁶⁰ o tempo de contato e a temperatura de aquecimento do polímero com o solvente e a eficácia das operações unitárias empregadas na recuperação do biopolímero de bactérias são determinantes na qualidade do produto final, bem como na viabilidade industrial do processo.

Solventes halogenados como clorofórmio, dicloroetano, cloro-propano e cloreto de metila são amplamente reportados na literatura para a extração de PHAs a partir de bactérias, sendo o clorofórmio o mais estudado.^{18,21,38,59,61}

Ramsay *et al.*⁹ realizaram ensaios de extração de P(3HB), a partir de *Cupriavidus necator*, com clorofórmio, cloreto de metileno e dicloroetano. As suspensões de biomassa celular em solvente foram submetidas à agitação constante durante 12 h em temperatura ambiente. Os resultados de recuperação de P(3HB) para a extração com clorofórmio, cloreto de metileno e dicloro-1,2-etano foram de 27%, 26% e 0%, respectivamente. Os polímeros extraídos com os diferentes solventes apresentaram pureza de 95%.

Um processo de extração com clorofórmio foi utilizado para a recuperação de P(3HB) de células de *Zobellella denitrificans*. Após 72 h de extração a 30 °C, 85% do P(3HB) foi recuperado com pureza de 98,3%.⁵⁷ Estes autores também testaram a utilização de cloreto de metileno como solvente na extração de P(3HB) e obtiveram um produto com pureza de 98,8%, porém, a máxima recuperação de polímero obtida após 72 h de extração foi de 36%. Dalcanton¹⁸ e Fiorese *et al.*²¹ também estudaram a extração de PHA de *C. necator* DSM 545 com clorofórmio a 60 °C, obtendo porcentagens de recuperação superiores a 94% e polímeros com purezas acima de 95%.

Com a utilização de solventes halogenados, pode-se obter elevadas porcentagens de recuperação de produto com elevada pureza. Porém, o emprego de solventes tóxicos e altamente voláteis para a

extração de PHAs (como o clorofórmio) é contraditório à ideia de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica. Além disso, a utilização destes solventes halogenados (tóxicos) em processos em grande escala exige um rigoroso controle, devido à segurança do processo (exposição dos operadores a riscos), utilização de elevados volumes de solventes voláteis (com elevada porcentagem de perda por evaporação, aumentando o custo total de produção) e geração de problemas ambientais.^{46,62,63}

De acordo com McChalicher *et al.*,⁶³ o solvente ideal para a extração de biopolímeros a partir de microrganismos, a pressões atmosféricas, deve ser capaz de dissolver os PHAs abaixo da temperatura de degradação do polímero, minimizando a degradação de suas cadeias, ser reutilizável e apresentar baixos riscos ambientais.

Neste contexto, dentre os solventes utilizados na extração de PHAs a partir de biomassa bacteriana, destaca-se o carbonato de propileno, por apresentar várias das propriedades requeridas para um bom solvente.²⁰ O processo de extração de PHAs, a partir de bactérias, com carbonato de propileno se baseia nas seguintes etapas: aquecimento da suspensão formada por biomassa e solvente, filtração para separação da solução formada pelo solvente com o polímero solubilizado dos *debris* celulares, adição de um não-solvente para a precipitação polimérica, separação do polímero da mistura composta por solvente e não-solvente e, por fim, secagem do material polimérico.⁶⁴

A maior porcentagem de recuperação de P(3HB) com carbonato de propileno encontrado por Lafferty e Heinzle,²⁰ a partir de *Azobacter chroococcum* DSM 377, foi 87%, com aquecimento a 140 °C e tempo de contato de 30 min. Fiorese *et al.*,²¹ utilizando este solvente para extração de P(3HB), a partir de *C. necator*, na temperatura e tempo de extração de 130 °C e 30 min respectivamente, obtiveram recuperação de 95% e pureza de 84%.

Riedel *et al.*¹⁹ testaram diferentes solventes não halogenados para extração de poli(hidroxi-butilato-co-hidroxi-xanoato) [P(HB-co-HHX)], a partir de *Ralstonia eutropha*. Os solventes estudados foram metil-isobutil-cetona, metil-etil-cetona, acetato de butila, acetato de etila e álcool isoamílico, e os resultados mais elevados de recuperação polimérica obtidos foram com os solventes metil-isobutil-cetona e acetato de etila, de 84% e 93%, respectivamente.

A PHB Industrial SA., produtora de PHA da marca BIOCYCLE® em escala industrial no Brasil, utiliza processo de extração patenteado, em que são aplicados alcoóis superiores com cadeia superior a três carbonos e seus ésteres, como álcool isoamílico, acetato de amila, acetato de isoamila e óleo fúsel, resíduo do processo de produção de etanol, como solventes para extração de PHA.⁶⁵ Segundo Rossel *et al.*,⁶⁵ este método de extração consiste em recuperar PHA de biomassa bacteriana com solvente não halogenado, como propionato de isoamila, para solubilização do polímero na fase orgânica. Os *debris* celulares são separados da solução composta de polímero e solvente por filtração e, em seguida, o polímero é precipitado da solução por resfriamento, o solvente é removido, o polímero recuperado e submetido à secagem. As vantagens da aplicação deste método estão na utilização de apenas um solvente, não agressivo ao meio ambiente, como extrator e purificador no processo, não requerendo a utilização de um não-solvente na etapa de precipitação polimérica. A precipitação do PHA da solução com o solvente é realizada por resfriamento da mesma até temperatura próxima a ambiente.⁶⁶

Digestor químico

A utilização de digestão química para extração de PHAs produzido por bactérias envolve a solubilização dos materiais da parede celular, deixando os grânulos de PHAs em suspensão. Os materiais não poliméricos digeridos neste processo são ácidos nucleicos, lipídios, fosfolipídios, peptidoglicano e materiais proteicos (*debris*).^{67,68}

Vários estudos relatam a utilização de digestores químicos para recuperação de PHAs, mas a eficácia do método depende da espécie microbiana da qual será realizada a extração.^{35,38,69} Os digestores mais utilizados são o dodecil sulfato de sódio (SDS), hipoclorito de sódio (NaClO), hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄).^{6,29,55,70}

Hahn *et al.*,⁷⁰ utilizando hipoclorito de sódio no processo de extração de P(3HB), obtiveram 86% e 93% de recuperação a partir de *Alcaligenes eutrophus* e *E. coli* recombinantes, respectivamente. Porém, durante essa digestão ocorreu degradação de P(3HB), resultando em uma redução da massa molar de 50% após o processo de extração. Segundo Yu,⁶⁸ o hipoclorito de sódio é um agente oxidante não seletivo que digere tanto o material não polimérico como os grânulos poliméricos, resultando na elevada degradação da massa molar do biopolímero recuperado.

Heinrich *et al.*⁷¹ desenvolveram um método simplificado para extração de P(3HB) em escala piloto (tanque de reação de 50 L), utilizando hipoclorito de sódio. Este método se baseia nas seguintes etapas: células secas suspensas em uma solução de hipoclorito de sódio 13% (v/v) com pH de 12,3 durante 1 h, precipitação do polímero com adição de água e lavagem do material polimérico com isopropanol para a remoção do material lipídico. O P(3HB) foi extraído de células de *Ralstonia eutropha* H16 com resultados de 96% de pureza e recuperação de 87,03%. Estes autores compararam a degradação da massa molar do polímero extraído com hipoclorito de sódio ao extraído com clorofórmio e observaram uma redução da massa molar polimérica de até 70% quando se utilizou hipoclorito de sódio (460 kDa) em comparação com clorofórmio (1700 kDa).

Yang *et al.*²⁷ realizaram extração de PHA de *R. eutropha* H16 utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) como digestor e os resultados obtidos após 3 h de extração foram de 95% de recuperação e 83% de pureza. Embora o método de digestão com SDS seja simples e eficaz para a digestão dos materiais celulares e a liberação dos grânulos de PHA com elevadas purezas, este causa problemas de águas residuais.^{55,68,72,73}

Mohammadi *et al.*³⁰ propuseram um processo de extração de PHA sustentável, produzido por *Cupriavidus necator*, que envolve a utilização de NaOH em baixa concentração. O uso do NaOH é baseado no fato que este reagente provoca a saponificação da camada lipídica da célula e aumenta a permeabilidade da membrana celular facilitando assim, a liberação do material polimérico.⁵⁹ Os resultados de recuperação e pureza foram de 96,9% e 96,6%, respectivamente. Além dos resultados satisfatórios obtidos, este tratamento alcalino provocou uma baixa degradação da massa molar (13%).

Yu⁶⁸ utilizou H₂SO₄, NaOH e hipoclorito de sódio para a digestão do material não polimérico e recuperação de PHA produzido por bactéria. O método baseia-se no fato de que ácidos inorgânicos, como o ácido sulfúrico, em baixas concentrações, são agentes oxidantes seletivos que podem dissolver a massa celular (não polimérica) em pequenos detritos causando poucos danos aos grânulos de PHA. O método abordado neste compreendeu as seguintes etapas: Primeiramente a biomassa seca foi tratada com solução de H₂SO₄ (0,1 mol L⁻¹) a 100 °C/2 h, para dissolver o material não polimérico. Na sequência, o pH da suspensão (células e H₂SO₄) foi elevado de 7 para 10 com a adição de NaOH para a saponificação do material lipídico e, em seguida, submetida à centrifugação (4.000 g/20 min) para a separação dos *debris* celulares dissolvidos em solução do material polimérico. Após, o material polimérico foi ressuspenso em uma solução de NaClO (6%) durante 2 h para branqueamento e, por fim, o polímero foi submetido à secagem. Com este método a recuperação de PHA foi de 94,9% de com pureza de 99,9% e o autor verificou também que os PHAs são vulneráveis à saponificação em

solução alcalina, podendo ocorrer degradação polimérica, mas por outro lado, são altamente resistentes à hidrólise ácida.

Estudo semelhante foi desenvolvido por Yu *et al.*,²⁹ que realizaram a digestão de células de *Ralstonia eutropha* H16 para a recuperação de P(3HB). Os autores primeiramente realizaram hidrólise ácida do material não polimérico com H₂SO₄ para solubilização da massa celular. Posteriormente os grânulos poliméricos foram suspensos em água e o pH da suspensão foi elevado para aproximadamente 10 por meio da adição de NaOH. A suspensão foi mantida sob agitação durante 30 – 60 min e um branqueamento do material polimérico com hipoclorito de sódio foi realizado. Por fim, uma solução de SDS foi adicionada. A recuperação de P(3HB) foi de 92,6% com pureza de 99,4%. Segundo estes autores, a parede celular de *R. eutropha* torna-se porosa com o tratamento ácido, no qual ocorre a liberação de proteínas e de outros componentes biológicos do citoplasma, mas a estrutura da célula mantém os grânulos de P(3HB) em seu interior. Com o tratamento alcalino (NaOH), a parede celular é desestabilizada e o branqueamento com hipoclorito de sódio, nesse caso, realiza uma última etapa de digestão do material não polimérico e eleva a pureza do P(3HB) obtido. Embora com esta técnica se obtenha elevadas porcentagens de recuperação polimérica e de pureza, isto não compensa os altos custos dos reagentes como SDS e hipoclorito de sódio, devido aos elevados volumes de reagentes necessários e aos problemas ocasionados pela presença de surfactantes nas águas residuais.⁷⁰

Método combinado digestor químico e solvente

O método de extração de PHAs de microrganismos a partir do uso combinado de digestor químico e solvente é amplamente utilizado. O digestor químico digere o material celular (não polimérico) para facilitar a solubilização do polímero pelo solvente, sendo necessária ainda uma etapa de precipitação do polímero, que pode ser por meio da adição de um não-solvente. Este método, quando comparado aos métodos que utilizam somente digestão química ou somente solvente, apresenta algumas vantagens, entre elas a obtenção de polímeros mais puros, com porcentagens de recuperação mais elevadas e, em alguns casos, reduzido tempo de contato da biomassa com o agente químico (solvente e/ou digestor).^{17,42,70,74-76} Porém, com este método tem-se um incremento de etapas no processo de extração e a aplicação de mais um produto químico no mesmo.

Tamer *et al.*²⁸ combinaram dois digestores químicos, SDS e hipoclorito de sódio, para extração de P(3HB) produzido por *Alcaligenes latus*. Após a digestão do material celular com SDS durante 1 h a 35 °C, a suspensão foi centrifugada e o precipitado suspenso em hipoclorito de sódio durante 25 h. Este método, com algumas modificações, foi aplicado por Kshirsagar *et al.*⁷⁷ para a recuperação de PHA de *Halomonas campisalis* e apenas 16,5% do biopolímero foi recuperado.

Samrot *et al.*⁷⁶ obtiveram 94% de recuperação de PHAs de *Enterobacter cloacae* no processo de extração com clorofórmio e hipoclorito de sódio, e precipitação do polímero com a adição de etanol. Kshirsagar *et al.*⁷⁷ também utilizaram hipoclorito de sódio (4% v/v) e clorofórmio puro para a recuperação de PHA a partir de células de *Halomonas campisalis*. Neste estudo, 300 mg de células foram ressuspenso em uma mistura contendo 50 mL de clorofórmio e 50 mL de hipoclorito de sódio. Esta suspensão foi aquecida a 35 °C e mantida sob agitação a 150 rpm, durante 90 min e, após centrifugação, foi obtida recuperação polimérica de 47%. Hahn *et al.*,⁷⁰ com um método de extração semelhante ao anterior, porém com uma solução de hipoclorito de sódio mais concentrada (30% v/v), obtiveram 91% de recuperação de P(3HB) produzido por *Alcaligenes eutrophus*.

A extração de P(3HB) a partir de *Bacillus megaterium* MTCC 453 com digestão química e solubilização do material polimérico em solvente foi descrita por Prasanna *et al.*⁷⁸ O processo de extração

envolveu três etapas. Na primeira foi adicionado clorofórmio e hipoclorito de sódio à biomassa, seguido de filtração para separação dos *debris* celulares da solução polimérica (polímero e clorofórmio). Na terceira e última, ocorreu a precipitação do P(3HB) por meio da adição de metanol e água. Ao final do processo, os autores obtiveram uma recuperação de P(3HB) de 84%.

Bhattacharyya *et al.*⁷⁹ descreveram um método de extração de P(3HB) da biomassa de *Haloferax mediterranei* com a utilização de digestores e solvente. Nesse trabalho, a biomassa foi suspensa em SDS durante 24 h, em seguida foi centrifugada e, ao precipitado formado por polímero e resíduos celulares remanescentes, adicionou-se uma solução de hipoclorito de sódio (30% v/v). A mistura foi centrifugada e o precipitado lavado com água, acetona e etanol e posteriormente dissolvido em clorofórmio em ebulição. Finalmente, a suspensão de polímero composta por solvente e resíduo celular foi filtrada e o clorofórmio então evaporado. A porcentagem de recuperação de P(3HB) a partir do método descrito foi de 97%.

Acetona foi utilizada como solvente na extração de PHA de cadeia média, produzido por *Pseudomonas putida* KT2440. Neste estudo, foi avaliado o impacto do tratamento da biomassa com dois digestores, metanol e NaOH (0,1 mol L⁻¹), sobre a porcentagem de recuperação e de pureza do polímero, após extração com acetona. O metanol se mostrou mais adequado para o tratamento desta biomassa e a porcentagem de recuperação obtida nesse processo de extração com metanol e acetona foi de 94%.⁸⁰

Embora os resultados de recuperação e pureza de PHAs obtidos a partir da extração com a combinação de digestores químicos e solventes, de células microbianas, sejam elevados, eles não compensam os problemas relacionados aos excessivos volumes de produtos químicos utilizados (muitas vezes com elevada toxicidade), tornando o processo caro e com geração de grandes volumes de águas residuais.^{38,70,75,81}

Fluido supercrítico

A aplicação de fluidos supercríticos (SCF) tem sido estudada para rompimento celular e extração de PHAs produzidos por bactérias.^{32,45,82} O dióxido de carbono (CO₂) é o fluido supercrítico mais amplamente estudado devido à sua baixa toxicidade e reatividade, moderada temperatura e pressão crítica (31 °C e 73 atm) e devido ao fato de não ser inflamável e ao ser de baixo custo.³¹

Hejazi *et al.*³¹ desenvolveram um método de extração de P(3HB) de *R. eutropha* com fluido supercrítico e 89% de polímero foi recuperado nas seguintes condições: CO₂ como fluido supercrítico, tempo de 100 min, pressão de 200 atm e temperatura de 40 °C.

Khosravi-Darani *et al.*⁴⁵ estudaram a extração de P(3HB), produzido por *Cupriavidus necator*, com um método que combina a aplicação de hidróxido de sódio e fluido supercrítico. NaOH (0,4% m/m) foi aplicado na biomassa úmida para a desestabilizar a parede celular e facilitar o rompimento das células na etapa de extração com fluido supercrítico (CO₂, 200 bar, 30 °C). Com este método, foi obtida uma recuperação polimérica de 81%. Segundo estes autores, as variáveis que influenciam na extração supercrítica de P(3HB), produzido por bactéria, são estratégia de secagem da biomassa, tempo de cultivo, pressão e temperatura de operação. Esse método de extração apresenta algumas vantagens, pois utiliza produto químico atóxico, de baixo custo e temperatura de operação branda (30 °C), possibilitando a obtenção de PHAs com elevada pureza e características térmicas e mecânicas mais preservadas.^{14,32,42} O maior obstáculo ao uso da tecnologia supercrítica na indústria é a viabilidade econômica do processo, devido ao alto investimento necessário para a instalação de uma unidade de extração com fluido supercrítico. Seu alto custo é devido principalmente aos equipamentos e acessórios em aço inoxidável e pela necessidade de serem resistentes às altas pressões empregadas no processo.^{83,84}

Métodos físicos

Segundo Medeiros *et al.*,⁸⁵ a ruptura celular pode ser o primeiro passo no processo de recuperação de produtos intracelulares, apresentando influência direta na porcentagem de recuperação e na qualidade do bioproduto obtido. O rompimento mecânico de células geralmente é um método eficaz, pois causa pequenos danos aos produtos intracelulares.⁸⁵⁻⁸⁸

A eficiência dessa técnica de rompimento celular para recuperação de bioprodutos está relacionada com algumas propriedades das células, como resistência física da parede celular e localização intracelular do produto de interesse.^{89,90} No processo de extração de PHAs a partir de bactérias, o rompimento mecânico de células pode representar o processo de extração como um todo, em que, após o rompimento celular, é necessária apenas uma etapa de ultracentrifugação do caldo de cultivo para separar os *debris* celulares do material polimérico.^{38,91}

Segundo Garcia,³⁹ métodos mecânicos de extração, quando comparados aos químicos, conferem melhores propriedades térmicas ao polímero. Esses métodos surgem como uma alternativa interessante, por serem econômicos e, de acordo com Middelberg,⁹² são amplamente aplicáveis a técnicas de extração em larga escala. A seguir estão descritos os métodos de extração de PHAs com homogeneizador, ultrassom e moimho de bolas.

Homogeneizador à alta pressão

A ruptura celular por homogeneização à alta pressão pode ser utilizada em diversas aplicações, como por exemplo, biotecnológica, farmacêutica, cosmética, entre outras, sendo amplamente utilizada para liberação de proteínas intracelulares e para inativação de microrganismos.⁹³⁻⁹⁶

Na homogeneização à alta pressão, o rompimento celular está baseado na passagem da biomassa por uma válvula com orifício estreito, seguido de despressurização e grande aumento da velocidade de escoamento, com consequente cavitação e alta tensão de cisalhamento ocasionando a deformação/rompimento das células em suspensão.⁹⁷⁻¹⁰⁰

Tamer *et al.*³⁷ estudaram o rompimento celular de *Alcaligenes latus* com homogeneizador à alta pressão (pressão de operação de 900 bar) para recuperação de P(3HB). Estes autores avaliaram a eficiência do método com a variação da concentração celular do caldo cultivado e o número de passagens da suspensão pelo equipamento. Foi observado que o desempenho do homogeneizador depende da concentração da biomassa utilizada, ou seja, quanto mais concentrado o caldo cultivado, maior a eficiência da alta pressão no rompimento celular. O número de passagens pelo homogeneizador também apresentou influência no rompimento celular para recuperação de P(3HB). Van Hee *et al.*¹⁰¹ reportam a utilização de homogeneizador à alta pressão para extração de PHA produzido por *P. putida* com recuperação polimérica de 46% e pureza de 80%. Nesse método, a biomassa foi submetida à pressão de 1600 bar, seguido de centrifugação do caldo a 30.000 g durante 3 h para a separação dos *debris* celulares do material polimérico. Segundo os autores, perdas de PHA podem ter ocorrido na etapa de centrifugação da biomassa, uma vez que nesse estudo os *debris* celulares (densidade de 1,085 kg m⁻³) foram sedimentados e o biopolímero (densidade de 1,000 kg m⁻³) foi recuperado do sobrenadante e, consequentemente, podem ter ocorrido perdas de material polimérico no precipitado.

Um método de extração de P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante, com homogeneizador à alta pressão, foi proposto por Ling *et al.*⁹¹ com pressão de operação de 550 bar, 4 passagens da biomassa pelo equipamento e posterior centrifugação para a recuperação do biopolímero do sedimentado. Os resultados obtidos neste trabalho foram 90,2% de pureza e 72% de recuperação. Segundo Ghatnekar

et al.,³⁸ a utilização de digestor químico combinado com homogeneizador à alta pressão, na extração de P(3HB), facilita a liberação do polímero das células aumentando a porcentagem de recuperação.

Os principais fatores que influenciam no rompimento celular com homogeneizador à alta pressão são a pressão de operação, o número de passagens da suspensão celular pelo equipamento e a concentração celular da suspensão. A desvantagem do processo de homogeneização na extração de PHAs é a possibilidade de degradação do produto e formação de detritos celulares muito finos que podem comprometer a pureza do biopolímero recuperado.^{37,38,102} A aplicação de homogeneizador à alta pressão para rompimento celular e recuperação de PHAs, produzidos por bactérias, resulta em porcentagens de recuperação inferiores a 72% devido a perdas de produto na etapa de separação dos *debris* celulares do material polimérico. Logo, a utilização deste método combinado com a utilização de produtos químicos como digestores e solventes pode aumentar a eficiência na recuperação polimérica de biomassa bacteriana.¹⁰¹

Ultrassom

O rompimento celular por ultrassom tem sido aplicado em diversos processos de separação para obtenção de bioprodutos a partir de microrganismos.^{86,103-105} Esta técnica refere-se a um método de perturbação mecânica, em que as ondas ultrassônicas (alta frequência) são transferidas por uma ponteira metálica e dissipadas em um sistema líquido (suspensão celular), por meio de bolhas de cavitação, formando uma espécie de campo, no qual ocorre aumento de massa e consequente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de desestabilizar a parede celular.^{88,106,107}

Dados da literatura reportam a utilização de tratamentos da biomassa com ultrassom como uma etapa do processo de extração de PHAs de bactérias para promover a desestabilização da parede celular e, assim, facilitar a ação de solventes e digestores e, consequentemente, melhorar a recuperação do polímero obtido.^{108,109} De uma forma geral, o processo de ultrassonificação para recuperação de bioprodutos é bastante aplicado em escala laboratorial, porém, em grande escala seu uso ainda é limitado e de custo elevado, devido à necessidade de utilização de uma grande quantidade de sondas e da instalação de um sistema de refrigeração eficiente.¹¹⁰

Moinho de bolas

Neste método, utilizam-se pérolas de vidro em um recipiente contendo a suspensão celular. O rompimento celular com moinho de bolas ocorre a partir do choque de esferas com a biomassa, o que promove transferência de energia e consequente rompimento das células. O tamanho das esferas, a velocidade de agitação do moinho e a concentração celular são alguns fatores que interferem neste processo.³⁷ A eficiência do rompimento celular com moinho de bolas depende de vários parâmetros, como tempo de residência, forças de cisalhamento, tipo de microrganismo, concentração da suspensão celular e velocidade de agitação. A desvantagem deste método está no fato de haver uma grande quantidade de interferentes, como, por exemplo, geometria da câmara de rompimento, velocidade e tipo de agitador, tamanho das esferas, quantidade de esferas, diâmetro das esferas, concentração celular e temperatura, sua eficiência e a possibilidade de quebra das cadeias poliméricas.³⁹ Este método é utilizado juntamente com a aplicação de produtos químicos, como solventes, no processo de recuperação de PHAs.³⁹

Método combinado físico (mecânico) e químico

A aplicação do método mecânico para extração de biopolímero terá seu potencial de recuperação aumentado se for associado a um

método químico adequado, que possibilite elevada recuperação de PHA no processo de extração sem promover alterações significativas nas suas características.⁵⁶ Métodos mecânicos de ruptura celular para recuperação de PHAs vêm sendo aplicados em conjunto com solventes, digestores químicos ou enzimáticos e representam uma das etapas de um processo de extração (rompimento celular), sendo necessárias etapas posteriores para a recuperação e purificação do biopolímero.^{37,38,44}

Porém, após o rompimento mecânico, a escolha criteriosa dos solventes e digestores e das condições operacionais do processo de extração é fundamental para manter ao máximo a integridade do biopolímero, tendo em vista que as características do biopolímero dependem diretamente do tratamento da biomassa, do solvente ou digestor utilizado, da temperatura de aquecimento utilizada e do tempo de contato do polímero com o solvente.^{41,111}

Homogeneizador à alta pressão e digestor químico

Alguns autores desenvolveram tecnologias de extração de PHAs a partir de bactérias com homogeneizador à alta pressão associado a um tratamento químico e obtiveram resultados de recuperação e pureza elevados.^{28,38,91} Ghatnekar *et al.*³⁸ utilizaram SDS (5% m/v) e homogeneizador à alta pressão (dois ciclos de 392 bar) para extração de P(3HB) produzido por *Methylobacterium* SP e obtiveram uma porcentagem de recuperação de biopolímero de 98% com pureza de 95%. O SDS foi aplicado para facilitar a permeabilidade das células e facilitar a liberação dos grânulos de P(3HB) na etapa de homogeneização da biomassa. Segundo estes autores, o processo combinado de extração com aplicação de SDS na biomassa antes da homogeneização à alta pressão apresenta-se como um método eficiente. Ling *et al.*⁹¹ realizaram extração de P(3HB) a partir de *E.coli* recombinante com homogeneizador à alta pressão (quatro ciclos de 550 bar) e obtiveram 72% de biopolímero recuperado. Quando estes autores acrescentaram uma etapa de digestão, do material não polimérico com hipoclorito de sódio, no processo de recuperação de P(3HB) com homogeneizador, obtiveram 81% de recuperação de biopolímero, com pureza de 96,5%.

Homogeneizador à alta pressão e solvente

A influência da utilização de homogeneizador à alta pressão em conjunto com a aplicação de solvente, carbonato de propileno, na extração de P(3HB) de *Cupriavidus necator*, visando o aumento da recuperação, foi estudada por Quines *et al.*⁶⁰ Primeiramente, foi realizado o tratamento da biomassa à alta pressão com duas passagens em homogeneizador a 1300 bar, para rompimento celular, e, posteriormente, as células foram suspensas em solvente sob aquecimento. Por fim, o polímero foi precipitado com adição de um não-solvente (água). Os resultados mais elevados de recuperação (94,4%) e pureza (99%) para este método combinado de extração foram obtidos com temperatura de extração de 150 °C, tempo de contato das células com o solvente de 5 min, relação biomassa/solvente de 0,15 g mL⁻¹. Segundo estes autores, o tratamento da biomassa sob alta pressão antes da aplicação do solvente foi eficiente nos resultados de extração, pois possibilitou a redução do tempo de extração de 45 min para 5 min e esta combinação de métodos pode proporcionar economia de energia e de tempo de processo e a obtenção de um polímero com a massa molar mais preservada.⁶⁰

Prensa francesa e digestor químico

Gözke *et al.*¹¹² desenvolveram um método de recuperação de P(3HB), a partir de *C. necator* DSM 428, que envolveu tratamento da biomassa, para rompimento celular, com tris-(hidroximetil)-amino-metano (Tris) / HCl a pH 9 e duas passagens da biomassa em prensa francesa com pressão de 2000 psi. Após o rompimento celular, estes autores propuseram a utilização de eletrofiltração, processo híbrido

que combina filtração e eletroforese, para a recuperação do biopolímero. Segundo os autores, é uma estratégia inovadora no processo de recuperação de P(3HB) com redução do tempo de processamento, de energia e dos custos de purificação.

Moinho de bolas e solvente

Garcia³⁹ propôs um método mecânico alternativo para extração do P(3HB) usando para ruptura celular pérolas de vidro em moinho de bolas. Pérolas de vidro e clorofórmio foram adicionados à biomassa e a suspensão foi submetida a aquecimento e agitação constantes. Em seguida, foram centrifugadas, e formaram-se três fases distintas, sendo a fase inferior composta pelas pérolas de vidro, a fase intermediária contendo uma solução de polímero e clorofórmio e a fase superior formada pelos *debris* celulares. Este método mecânico e químico desenvolvido para extração de P(3HB) de *C. necator* apresentou uma recuperação de 64% de polímero com pureza de 89%.

Ultrassom e solvente

Um processo de extração de P(3HB), de *Azohydromonas lata* DSM 1123, com a utilização de método físico e químico foi descrito por Penloglou *et al.*⁴⁴ Este método envolveu duas etapas, sendo que a primeira consistiu no rompimento celular com ultrassom (60 pulsos de 30 s de sonicação e 5 s de pausa). Na segunda etapa, a solubilização do biopolímero foi realizada com clorofórmio a 30 °C durante 1,5 h sob agitação constante, e o polímero foi precipitado com a adição de metanol. Segundo os autores, esse método mostrou-se eficiente para a extração de P(3HB) de células de *A. lata*.

Quines *et al.*¹⁰⁹ utilizaram carbonato de propileno associado à aplicação de ultrassom para a extração de P(3HB), produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545. Este método envolve a aplicação do ultrassom para desestabilização e/ou rompimento da biomassa e para facilitar a ação do solvente no processo de solubilização do material polimérico. A biomassa foi submetida a três ciclos de aplicação de ultrassom de 59 s e pausa de 30 s e recuperação polimérica com carbonato de propileno a 150 °C por 45 min, e recuperou-se 92% de P(3HB), com 99% de pureza. Desta maneira, o método combinado de utilização do ultrassom e carbonato de propileno para extração de P(3HB), produzido por *C. necator*, pode ser uma eficiente opção de processo. Mesmo com a obtenção de resultados de recuperação elevados, este método de extração tem sua aplicação limitada, devido à dificuldade de implantação deste equipamento em grande escala.^{93,109}

Método biológico

Os métodos biológicos de extração de PHAs bacteriano são uma alternativa aos métodos que utilizam reagentes químicos e baseiam-se na aplicação de enzimas, como lisozimas, nucleases e proteases, para a recuperação do biopolímero.^{34,35}

Enzimático

O método enzimático é um processo complexo para recuperação de PHAs. Este método consiste na adição de enzimas ao caldo cultivado para hidrolisar as células que contêm o PHA. Vários tipos de enzimas são utilizados neste processo, principalmente as proteases. Essa técnica é atraente devido às condições amenas de operação, pela alta seletividade das enzimas em hidrolisar proteínas da parede celular bacteriana e consequente lise, sem agir na degradação polimérica e pela qualidade do polímero recuperado.^{34,113}

Kapritchkoff *et al.*³⁴ estudaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação de P(3HB) produzido por *C. necator*. Nesse método, inicialmente, o caldo cultivado foi tratado a 85 °C durante 15 min e depois a 95 °C durante 45 min, a fim de desnaturar as proteínas da parede celular e desestabilizar a membrana externa da

bactéria. Este tratamento também desnatura a PHB-depolimerase, enzima presente na parede do grânulo polimérico, capaz de degradar o biopolímero.¹¹⁴ A biomassa foi submetida a tratamento enzimático, para lise celular, com variação da temperatura e tempo de reação. As enzimas testadas foram: quimi tripsina bovina, tripsina bovina, bromelina, papaina, lisozima, celulase e pancreatina bovina. O melhor resultado obtido por esses autores foi utilizando pancreatina, a 50 °C durante 8 h, e obtiveram recuperação de P(3HB) de 90,3% com pureza de 62,2%. García *et al.*¹¹⁵ utilizaram este método para extração de P(3HB) de *C. necator* com a aplicação de bromelina. Após 10 h da ação enzimática na biomassa, os autores recuperaram 90% de P(3HB) com 88,8% de pureza.

A empresa Zeneca BioProducts, produtora de PHAs da marca BIOPOL[®], na Inglaterra, desenvolveu um processo de extração que envolve digestão enzimática para recuperação de PHA produzido por bactéria. Neste processo, primeiramente a biomassa contendo PHA é tratada termicamente a 100 °C para que possa ocorrer a lise celular, a dissolução de ácidos nucleicos e a desnaturação de proteínas pelo aquecimento. Em seguida, a biomassa é submetida à digestão por uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinas, proteinases entre outras. A maior parte do material celular é hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permanece intacto.^{2,116}

O método de recuperação de PHAs utilizando digestão enzimática é seletivo e eficiente em termos energéticos, conduz a bons níveis de recuperação polimérica e oferece menor risco de danos ao produto. Porém, a complexidade da técnica para aplicação em grande escala, o elevado custo das enzimas empregadas e a impossibilidade de sua reutilização resultam no aumento do custo do processo, tornando este o principal inconveniente do método.^{34,42,65}

Método biológico e químico

Estudos reportados na literatura descrevem processos que envolvem a combinação da digestão enzimática com a aplicação de produtos químicos, como digestores e solventes, para a extração de PHAs produzidos por bactéria.^{36,87,117}

Enzimas e digestor químico

Yasotha *et al.*¹¹⁸ estudaram a combinação de alcalase, SDS e Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para digerir o material não-polimérico na extração de PHA de *Pseudomonas putida*. Antes do tratamento enzimático, o caldo de cultivo foi tratado termicamente a 121 °C durante 1 min em autoclave. A suspensão celular foi então submetida à digestão com Alcalase e SDS a pH 8,5 e temperatura de 55 °C, seguido da adição de EDTA e lisozima a pH 7 e temperatura de 30 °C, por 15 min. Com este método, foi obtido um polímero com pureza de 92,6% e recuperação de 90%. Martino *et al.*¹¹⁹ também utilizaram o método que combina o tratamento da biomassa, de *C. necator* DSM 428, com SDS, EDTA e enzima alcalase. Segundo os autores, o SDS foi utilizado para romper as células, uma vez que penetra na bicamada lipídica, e o EDTA auxilia a ação do SDS por complexação de cátions bivalentes para a desestabilização da membrana celular externa. Após a lise celular, os *debris* celulares foram solubilizados por meio da digestão com a enzima alcalase. O P(3HB) recuperado com este método de extração, sem a etapa de tratamento térmico anterior à digestão enzimática, apresentou pureza superior a 90%.¹¹³

Enzimas e solvente

Neves e Müller³⁶ desenvolveram um método de extração de P(3HB-co-3HV) produzido por *C. necator* envolvendo tratamento térmico, hidrólise enzimática e recuperação do polímero com clorofórmio. Estes autores avaliaram a ação de diferentes proteases e

glicosidases para hidrólise do material celular, após tratamento térmico em autoclave durante 15 min a 121 °C, para desestabilizar a parede celular e facilitar a hidrólise enzimática. Das nove enzimas avaliadas, a glicosidase, Celumax BC[®], foi a que apresentou melhor resultado, quando o tratamento com esta enzima foi realizado a 60 °C e pH 4,0. A recuperação de P(3HB-co-3HV) foi realizada com a adição de clorofórmio ao material hidrolizado e posterior centrifugação, em que obtiveram uma solução de polímero em solvente (clorofórmio). Com a evaporação do solvente, ocorreu a formação de um filme polimérico com recuperação de 94,5% de P(3HB-co-3HV) com 91% de pureza.

O elevado custo das enzimas e a necessidade de etapas adicionais de digestão do material celular ou de solubilização do biopolímero com uso de solventes tornam este processo complexo e dispendioso.^{42,120}

Método físico, biológico e químico

Enzimas, homogeneizador à alta pressão e digestor químico

De acordo com Harrison,⁹³ o processo de extração de PHA produzido por *C. necator* que envolve homogeneização à alta pressão e digestão do material não polimérico por enzimas e detergente é eficiente para ruptura celular e recuperação do biopolímero após a remoção dos *debris* celulares.

Horowitz e Brennan⁸⁷ propuseram um método de extração de PHA com a combinação de rompimento celular com digestão enzimática

e tratamento mecânico e digestão dos *debris* celulares com a adição de digestores químicos para a recuperação de PHA de *Pseudomonas putida*. Assim, a enzima Benzonase (uma nuclease comercial) foi adicionada ao caldo cultivado para desestabilizar a parede celular da bactéria e facilitar o processo de rompimento celular por homogeneização à alta pressão (15.000 psi). Posteriormente, a suspensão com células lisadas foi submetida a um segundo tratamento enzimático com Lisozima, Alcalase e Flavourzyme para a digestão do material não polimérico. Ao final desta etapa, uma solução de água e álcool cetostearílico etoxilado (0,25%) foi adicionada ao polímero e, por fim, ozônio foi injetado na suspensão contendo PHA, álcool, e impurezas remanescentes, para a purificação do produto. Segundo estes autores, com a adição de ozônio no processo de extração de PHA pode-se obter um produto com elevada pureza, pois este solubiliza impurezas, e livre de odores.

Síntese dos métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias

A Tabela 1 sintetiza alguns métodos de extração de PHAs, a partir de bactérias, reportados da literatura, com seus respectivos resultados de porcentagens de pureza e porcentagens de recuperação, microrganismo produtor do biopolímero e vantagens e desvantagens de cada processo de extração.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.)

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência	Vantagens	Desvantagens
Clorofórmio		<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 99; Rec. 78	[38]	Elevada pureza; Baixa degradação da massa molar	Volume de solvente elevado; solvente altamente tóxico (halogenado) e com baixa temperatura de ebulição (perdas processo); soluções poliméricas muito viscosas
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 98; Rec. 94	[18]		
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 95; Rec. 96	[21]		
		<i>Zobellella denitrificans</i>	Rec. 54,5	[24]		
		<i>Alcaligenes latus</i>	Rec. 84	[1]		
		<i>C. necator</i>		[117]		
		<i>R. eutropha</i>	Pur. 100; Rec. 99	[19]		
		<i>Bacillus megaterium</i>		[59]		
Químico (solvente)		<i>Halomonas campisallis</i> MCM B-1027	Rec. 85	[77]	Elevada pureza; Elevada recuperação; Alta solubilidade do polímero no solvente; Baixa toxicidade; Elevada temperatura de ebulição permitindo elevada recuperação e reutilização no processo	Temperatura de solubilização do polímero no solvente elevada; Possibilidade de degradação da massa molar do polímero
	Carbonato de propileno	<i>Azobacter chroococcum</i> DSM 377	Rec. 87	[20]		
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 84; Rec. 95	[21]		
		<i>C. necator</i> DSM 545	Pur. 99; Rec. 98	[64]		
Acetona	<i>P. putida</i> KT 2440	Pur. 98; Rec. 62	[80]	Elevada pureza	Recuperação reduzida	
	Biomassa	Rec. 80-85	[22]			
Éter Metil-terc-butílico		<i>P. putida</i> KT 2440	Rec. 15-17	[121]	Temperatura de processo branda	Baixa recuperação
Metil isobutil cetona		<i>R. eutropha</i>	Pur. 99; Rec. 84	[19]	Não utiliza solvente halogenado; Elevada pureza	Baixa recuperação polimérica; Solvente clorado
		<i>C. necator</i>	Pur. 98	[23]		
Cloreto de metileno		<i>Zobellella denitrificans</i> MW	Rec. 33	[24]	Elevada pureza	Baixa recuperação polimérica; Solvente clorado

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.) (cont.)

Método	Agente	Microorganismo	Resultados (%)	Referência	Vantagens	Desvantagens
Químico (solvente)	Acetato de etila	<i>R. eutropha</i>	Pur. 95; Rec. 93	[19]	Elevadas pureza e recuperação	
	Álcool isoamílico	<i>C. necator</i>	Pur. 99; Rec. 90	[66]	Não agressivo ao meio ambiente, único solvente como extrator e purificador, não requer a adição de não-solvente para a precipitação polimérica, elevadas pureza e recuperação	
Químico (Digestão)	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	<i>R. eutropha</i> H16	Pur. 87; Rec. 95	[27]	Elevada recuperação	Reduzida pureza; Tratamento das águas residuais complexo; Custo elevado
		<i>Escherichia coli</i> XL BLUE	Pur. 98; Rec. 99	[55]		
	Hipoclorito de sódio	<i>R. eutropha</i> H16	Pur. 96; Rec. 91	[71]	Elevada pureza	Elevada degradação da massa molar do polímero; Utilização de solvente clorado (tóxico); Elevado custo com o tratamento das águas residuais
	SDS / Hipoclorito de sódio	<i>Alcaligenes latus</i>		[37]	Elevada pureza	Elevado custo com o tratamento das águas residuais, utilização de solvente clorado (tóxico)
		<i>Halomonas campisalis</i>	Rec. 16	[77]		
	NaOH	<i>C. necator</i>	Pur. 96,6; Rec. 96,9	[30]	Elevadas pureza e recuperação; Baixa degradação da massa molar	
	NaCl e NaOH	<i>C. necator</i>	Pur. 97,7; Rec. 97,5	[73]	Elevadas pureza e recuperação	
H ₂ SO ₄ /NaOH/ Hipoclorito	<i>R. eutropha</i> Bactéria	Rec. 92,6; Pur. 99,4 Rec. 94,9; Pur. 99,9	[29] [68]	Elevadas pureza e recuperação	Elevado volume de águas residuais; Utiliza reagente clorado	
Químico (Fluido supercrítico)	CO ₂	<i>R. eutropha</i>	Rec. 89	[31]	Método de baixo custo, fluido supercrítico não tóxico e de baixo custo; temperatura de operação branda; características do polímero mais preservadas.	Necessidade frequente de limpeza, dificuldade na otimização do processo.
	NaOH/CO ₂	<i>C. necator</i>	Rec. 81	[45]		
Químico (Digestor/ Solvente)	Hipoclorito de sódio e clorofórmio	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 97; Rec. 95	[38]	Elevadas pureza e recuperação	Elevada degradação da massa molar do polímero; Produtos químicos clorados e altamente tóxicos
		Cultura mista	Pur. 94; Rec. 85	[75]		
		<i>Enterobacter cloacae</i>	Rec. 94	[76]		
		<i>Halomonas campisalis</i>	Rec. 47	[77]		
	SDS/hipoclorito de sódio/clorofórmio	<i>Haloferax mediterranei</i>	Rec. 97	[79]	Elevada recuperação; Viscosidade reduzida da fase de solubilização das células com P(3HB) no solvente devido à pré digestão	Grande volume de reagentes químicos (tóxicos); Elevado custo com tratamento das águas residuais
	NaOH/metanol/ acetona	<i>P. putida</i> KT 2440	Pur. 98 Rec. 62	[80]	Elevada pureza	Baixa recuperação polimérica
Método enzimático	Bromelina	<i>C. necator</i>	Rec. 90	[34]	Produto com elevada qualidade; Condições brandas de processo	Processo complexo; Elevado custo das enzimas; Difícil ampliação de escala
	Pancreatina	<i>C. necator</i>	Pur. 88,8; Rec. 90	[115]		
	Lisozima/ novozyme	<i>P. putida</i>	Rec. 90; Pur. 88	[101]		
Método enzimático/ químico	Protease/ clorofórmio	<i>P. putida</i>	Rec. 95	[118]	Elevadas pureza e recuperação	Processo complexo; Elevado custo das enzimas; Utiliza solvente clorado de elevada toxicidade
	Alcalase/SDS/ EDTA	<i>P. putida</i>	Rec. 90; Pur. 92,6	[118]		
		<i>C. necator</i>	Pur. 90	[119]		
	Glicosidase/ clorofórmio	<i>C. necator</i>	Rec. 93,2; Pur. 94	[36]		
Enzimático/ mecânico/ químico	*Enzimas/ homogeneizador / álcool /ozônio	<i>P. putida</i>		[87]	Elevada pureza; Reduzida utilização de reagentes químicos	Elevado custo das enzimas; Processo complexo e de elevado custo

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de métodos de extração de PHAs produzidos por bactérias publicados na literatura e seus respectivos resultados de pureza (Pur.) e recuperação (Rec.) (cont.)

Método	Agente	Microrganismo	Resultados (%)	Referência	Vantagens	Desvantagens
Físico	Homogeneizador à alta pressão	<i>Escherichia coli</i>	Pur. 90,2; Rec. 72	[91]	Não utiliza produtos químicos Pode ser aplicado em escala industrial	Baixa recuperação; Possibilidade de degradação da massa molar e da formação de <i>debris</i> celulares muito finos que podem reduzir a pureza do bioproduto
		<i>Alcaligenes latus</i>		[28]		
		<i>P. putida</i>	Pur. 80; Rec. 46;	[101]		
	Homogeneizador à alta pressão/SDS	<i>Methylobacterium</i> sp V49	Pur. 95; Rec. 98	[38]	Elevadas pureza e recuperação	Elevado custo com tratamento das águas residuais (SDS); Redução da massa molar polimérica
Físico/ Químico	Homogeneizador à alta pressão/ Hipoclorito de sódio	<i>Escherichia coli</i> recombinante	Pur. 96,5; Rec. 80	[91]	Elevada pureza	Hipoclorito degrada a massa molar do polímero; Possibilidade de quebra das cadeias do polímero
	ultrassom/ Clorofórmio/ metanol	<i>Azohydromonas lata</i> DSM 1123	Rec. 95	[44]	Elevada recuperação	Utiliza solvente com elevada toxicidade; Elevado custo; Processo de difícil ampliação de escala devido ao uso de ultrassom e solvente clorado
	Moinho de bolas / Clorofórmio	<i>C. necator</i>	Pur. 89; Rec. 64	[39]		Baixa recuperação; Processo com muitas variáveis interferentes, dificuldade de ampliação de escala
	Moinho de bolas/ NaCl e NaOH	<i>Alcaligenes latus</i>		[37]		
Mecânico/ ultrafiltração	Prensa francesa/ Ultrafiltração	<i>C. necator</i> DSM 428		[112]		Elevado custo do processo

* Enzimas: benzonase, alcalase, lisozima, flavourzyme; Homogeneizador à alta pressão; Álcool cetosteárflico.

CONCLUSÃO

Neste artigo, diversos aspectos a cerca da extração de PHAs foram revisados, tais como o método químico, que faz uso de solventes e é extensivamente utilizado por proporcionar altos percentuais de recuperação de PHAs; a utilização de digestores químicos também é bastante estudada por proporcionar resultados de recuperação polimérica significativos. A maioria dos estudos realizados com métodos químicos faz uso de solventes e digestores tóxicos e altamente voláteis, sendo contraditórios ao fato de que estes polímeros são amplamente estudados para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica.

Adicionalmente, os métodos biológico e físico são uma alternativa positiva para a extração de PHAs, pois não há a necessidade de inserção de produtos químicos ao processo, mas apresentam resultados de recuperação polimérica inferiores aos encontrados nos demais métodos. Por outro lado, estes métodos têm sua eficácia aumentada quando combinados aos químicos. A combinação de métodos de extração possui potencial neste contexto, pois facilita o rompimento celular, a recuperação polimérica e muitas vezes, reduz o tempo de processo, bem como a aplicação de produtos químicos tóxicos.

As estratégias de extração de PHAs em desenvolvimento abordados neste artigo indicam claramente que a maioria dos métodos visa, sobretudo, a obtenção de elevados percentuais de recuperação e pureza de biopolímero. No entanto, é imprescindível a realização de estudos que abordem os métodos de extração e relacionem a eficiência do processo à influência do mesmo nas características do produto final, como na massa molar, por exemplo. Esta característica polimérica é de extrema importância, pois está diretamente relacionada à aplicação do polímero e ao tempo de degradação do mesmo, quando descartado.

Neste sentido, para tornarem-se competitivos com os plásticos petroquímicos, os PHAs necessitam ter os custos de produção

reduzidos, características semelhantes e/ou superiores às apresentadas por alguns plásticos convencionais e terem aplicações de alto valor agregado, como o uso em aplicações médicas. Para tanto, na etapa de produção, além da busca por altas densidades celulares e produtividades de polímero, são necessárias pesquisas com o propósito de desenvolvimento de estratégias de cultivo que proporcionem PHAs com elevados índices de massa molar, bem como o desenvolvimento de cepas geneticamente modificadas capazes de sintetizar PHAs com massas molares comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica.

Os PHAs são potenciais substitutos aos plásticos de origem petroquímica, por possuírem propriedades semelhantes aos materiais termoplásticos, serem biodegradáveis e passíveis de produção a partir de matérias-primas renováveis, porém, a sua aplicabilidade está diretamente ligada aos processos de produção e de extração. Por essas razões, na etapa de extração se deve buscar: reduzir as perdas de produto, obter um produto de elevada pureza e com suas características físicas e térmicas preservadas, obter um produto que se enquadre no termo sustentável, utilizando-se produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente, reduzir custos de processo por meio da reutilização dos produtos químicos (solventes e não-solventes) e desenvolver um processo possível de ser aplicado em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- Manangan, T.; Shawaphun, S.; *ScienceAsia* **2010**, *36*, 199.
- Byrom, D.; *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 246.
- Anderson, A. J.; Dawes, E. A.; *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- Squio, C. R.; Aragão, G. M. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 615.
- Shrivastav, A.; Kim, H. Y.; Kim, Y. R.; *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 12.
- Lee, S. Y.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 1.
- Steinbuechel, A.; Hustede, E.; Liebergesell, M.; Pieper, U.; Timm, A.; Valentin, H.; *FEMS Microbiol. Rev.* **1992**, *103*, 217.

8. Madison, L. L.; Huisman, G. W.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 21.
9. Ramsay, B. A.; *Proceedings of the Symposium on Physiology, Kinetics, Production and Use of Biopolymers*, Seggau, Austria, 1994.
10. Khanna, S.; Srivasta, A. K.; *Biochem. Eng. J.* **2005**, *27*, 197.
11. Hsu, K.; Tseng, M.; Don, T.; Yang, M.; *Bot. Stud.* **2012**, *53*, 307.
12. Penloglou, G.; Kretza, E.; Chatzidoukas, C.; Parouti, S.; Kiparissides, C.; *Biochem. Eng. J.* **2012**, *62*, 39.
13. Koller, M.; *Appl. Food Biotechnol.* **2014**, *1*, 1.
14. Madkour, M. H.; Heinrich, D.; Alghamdi, M. A.; Shabbaj, I. I.; Steinbüchel, A. *Biomacromolecules* (2013), doi: 10.1021/bm4010244.
15. Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Rocha, R. C. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1732.
16. Ienczak, J. L.; Aragão, G. M. F.; In *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2011.
17. Chen, Y.; Yang, H.; Zhou, Q.; Chen, J.; Gu, G.; *Process Biochem.* **2001**, *36*, 501.
18. Dalcanton, F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2006.
19. Riedel, S. L.; Brigham, C. J.; Budde, C. F.; Bader, J.; Rha, C.; Stahl, U.; Sinskey, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *110*, 461.
20. Lafferty, R. M.; Heinsle, E.; *US Pat. 4,140,741* **1979**.
21. Fiorese, M. L.; Freitas, F.; Pais, J.; Ramos, A. M.; Aragão, G. M. F.; Reis, M. A. M.; *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 454.
22. Narasimhan, K.; Cearley, A. C.; Gibson, M. S.; Welling, S. J.; *US Pat. 7378266* **2008**.
23. Zinn, M.; Weilenmann, H. U.; Hany, R.; Schmid, M.; Egli, T.; *Acta Biotechnol.* **2003**, *23*, 309.
24. Mohammad, H. A.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6222.
25. Vanlautem, N.; Gilain, J.; *US pat. 4310684-A* **1982**.
26. López-Cuellar, M.; Alba-Flores, J.; Rodríguez, J.; Pérez-Guevara, F.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 74.
27. Yang, Y. H.; Brigham, C.; Willis, L.; Rha, C. K.; Sinskey, A.; *Biotechnol. Lett.* **2011**, *6*.
28. Tamer, I. M.; Moo-Young, M.; Chist, Y.; *Bioprocess. Eng.* **1998**, *19*, 459.
29. Yu, J. B.; Porter, M.; Jarenko, M. In *Generation and utilization of microbial biomass hydrolysates in recovery and production of poly(3-hydroxybutyrate)*; Motovic, M. D., ed.; Creative Commons BY (2013), doi: 10.5772/52940.
30. Mohammadi, M.; Hassan, M. A.; Phang, L. Y.; Shirai, Y.; Man, H. C.; Ariffin, H.; Amirul, A. A.; Syairah, S. N.; *Environ. Eng. Sci.* **2012**, *29*, 783.
31. Hejazi, P.; Vasheghani-Farahani, E.; Yamini, Y.; *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1519.
32. Javers, J. E.; Gibbons, F. H.; Raynie, D. E.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *2*, 241.
33. Holmes, P. A.; Lim, G. B.; *US Pat. 4.910.145* **1990**.
34. Kapritchkoff, F. M.; Viotti, A. P.; Alli, R. C. P.; Zuccolo, M.; Pradella, J. G. C.; Maiorano, A. E.; Miranda, E. A.; Bonomi, A.; *J. Biotechnol.* **2006**, *122*, 453.
35. Suzuki, D. V.; Carter, J. M.; Rodrigues, M. F. A.; Silva, E. S.; Maiorano, A. E.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 771.
36. Neves, A.; Müller, J.; *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 1575.
37. Tamer, I. M.; Moo-Young, M.; Chisti, Y.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1998**, *37*, 1807.
38. Ghatnekar, M. S.; Pai, J. S.; Ganesh, M.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 444.
39. Garcia, M. C. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2006.
40. Martínez, V.; García, P.; García, J. L.; Prieto, M. A.; *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 533.
41. Gumel, A. M.; Annuar, M. S. M.; Chisti, Y.; *J. Polym. Environ.* **2013**, *21*, 580.
42. Jacquel, N.; Lo, C. W.; Wei, Y. H.; Wu, H. S.; Wang, S. S.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 15.
43. Mantellato, P. E.; Durão, N. A.; *US Pat 8357508 B2* **2013**.
44. Penloglou, G.; Chatzidoukas, C.; Kiparissides, C.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 329.
45. Khosravi, D. K.; Vasheghani, F. E.; Shojaosadati, S. A.; Yamini, Y.; *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1757.
46. Kunasundari, B.; Sudesh, K.; *Express Polym. Lett.* **2011**, *5*, 620.
47. Lee, S. Y.; Choi, J. I.; Han, K.; Song, J. Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2762.
48. Mantellato, P. E.; Durão, N. A. S.; *US Pat. 20080193987 A1* **2008**.
49. Galego, N.; Rozsa, C.; Sanchez, R.; Fung, J.; Anala, V.; Santo, T. J.; *Polym. Test.* **2000**, *19*, 485.
50. Canevarolo, S. V.; *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, 1ª ed., Artliber: São Paulo, 2007.
51. Fruet, G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.
52. Souza, D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil, 2006.
53. Navarro, R. F.; D'Almeida, J. R. M.; Rabello, M. S.; *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 2167.
54. Torres, A. U.; Almeida, J. R.; Habas, J. P.; *Revista Polímeros* **2011**, *20*, 331.
55. Peng, Y. U.; Lo, C. C. W.; Wu, H. S.; *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **2013**, *91*, 77.
56. Noda, I.; *Br PI 9507830-4, PCT US9506651*, **1995**.
57. Ibrahim, M. H. A.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6222.
58. Budde, C. F.; Riedel, S. L.; Willis, L. B.; Rha, C.; Sinskey, A. J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2847.
59. Rodriguez-Contreras, A.; Koller, M.; Dias, M. M. S.; Calafell, M.; Brauneegg, G.; Marqués-Calvo, M. S.; *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, *51*, 123.
60. Quines, L. K.; Schmidt, M.; Zanfonato, K.; Steffen, W.; Oliveira, S. M.; Schmidell, W.; Aragão, G. M. F.; *XIX Simpósio nacional de bioprocessos*, Foz do Iguaçu, Brasil, 2013.
61. Valappil, S. P.; Misra, S. K.; Boccaccini, A. R.; Keshavarz, T.; Bucke, C.; Roya, I.; *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 251.
62. Gorenflo, V.; Schmack, G.; Vogel, R.; Steinbüchel, A.; *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 45.
63. McChalicher, C. W. J.; Srienc, F.; Rouse, D. P.; *Am. Inst. Chem. Eng.* **2009**, *56*, 1616.
64. Quines, L. K. M.; Ienczak, J. L.; Schmidt, M.; Zanfonato, K.; Rodrigues, M. I.; Schmidell, W.; Aragão, G. M. F.; *Quim. Nova* **2015**, *38*, 214.
65. Rossel, C. E. V.; Mantellato, P. E.; Bueno Netto, C. L.; Ribeiro, A. M. M.; Matsubara, R. M. S.; *PI 9302312* **2002**.
66. Mantellato, P. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2011.
67. Choi, J., Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13.
68. Yu, J.; *US Pat. 0220505 A1* **2008**.
69. Kim, B. S.; Lee, S. C.; Chang, H. N.; Chang, Y. K.; Woo, S. I.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 892.
70. Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Kim, B. S.; Chang, H. N.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 256.
71. Heinrich, D.; Madkour, M. H.; Al-Ghamdi, M. A.; Shabbaj, I. I.; Steinbüchel, A.; *AMB Express* **2012**, *2*, 59.
72. Lo, C. W.; Wu, H. S.; Wei, Y. H.; *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2011**, *42*, 240.
73. Anis, S. N. S.; Nurhezreen, M. I.; Sudesh, K.; Amirul, A. A.; *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *102*, 111.
74. Roh, K. S.; Yeom, S. H.; Yoo, Y. J.; *Biotechnol. Tech.* **1995**, *9*, 709.

75. Salmiati, Z.U.; Salim, M. R. *8th International IWA Symposium Waste Management Problems in Agro-Industries*. Çeşme, Turkey, 2011.
76. Samrot, A.; Avinesh, R.; Sukeetha, S.; Senthilkumar, P.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 195.
77. Kshirsagar, P. R.; Kulkarni, S. O.; Nilegaonkar, S. S.; Niveditha, M.; Kanekar, P. P.; *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *103*, 151.
78. Prasanna, T.; Babu, P. A.; Lakshmi, P. D.; Chakrapani, R.; Rao, R.; *Int. J. Pharma Res. Rev.* **2011**, *1*, 15.
79. Bhattacharyya, A.; Pramanik, A.; Maji, S. K.; Haldar, S.; Mukhopadhyay, U. K.; Mukherjee, J.; *AMB Express* **2012**, *2*, 34.
80. Jiang, X.; Ramsay, J. A.; Ramsay, B. A.; *J. Microbiol. Methods* **2006**, *67*, 212.
81. Chen, G. Q.; Zhang, G.; Park, S. J.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 50.
82. Hampson, J. W.; Ashby, R. D.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1371.
83. Carrilho, E.; Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 509.
84. Aguiar, A. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2011.
85. Medeiros, F. O.; Alves, F. G.; Lisboa, C. R.; Martins, D. S.; Burkert, C. A. V.; Kalil, S. J.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 336.
86. Gogate, P. R.; Kabad, A. M.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *44*, 60.
87. Horowitz, D. M.; Brennan, E. M.; *European Pat. (070):135* **2010**.
88. Klimek-Ochab, M.; Brzezińska-Rodak, M.; Żymańczyk-Duda, E.; Lejczak, B.; Kafarski, P.; *Folia Microbiol.* **2011**, *56*, 469.
89. Sauer, T.; Robinson, C. W.; Glick, B. R. F.; *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33*, 1330.
90. Kuboi, R.; Umakoshi, H.; Takagi, N.; Komasa, I.; *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, *79*, 335.
91. Ling, Y.; Wong, H. H.; Thomas, C. J.; Williams, D. R. G.; Middelberg, A. P. J.; *Bioseparation* **1997**, *7*, 9.
92. Middelberg, A. P. J.; *Biotechnol. Adv.* **1995**, *13*, 491.
93. Harrison, S. T. L.; *Biotechnol. Adv.* **1991**, *9*, 217. 4.
94. Lanciotti, R.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Guerzoni, M. E.; Suzzi, G.; Belletti, N.; Gardini, F.; *Food Chem.* **2007**, *104*, 693.
95. Tribst, A. A. L.; Franchi, M. A.; Cristianini, M.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2008**, *9*, 265.
96. Chaves-López, C.; Lanciotti, R.; Serio, A.; Paparella, A.; Guerzoni, E.; Suzz, G.; *Food Control* **2009**, *20*, 691.
97. Maresca, P.; Dons, F.; Ferrari, G.; *J. Food Eng.* **2011**, *104*, 364.
98. Floury, J.; Legrand, J.; Desrumaux, A.; *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 1285.
99. Keshavarz-Moore, E.; Hoare, M.; Dunnill, P.; *Enzym. Microb. Technol.* **1990**, *12*, 764.
100. Masson, L. M. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.
101. Van Hee, P.; Middelberg, A. P. J.; Van der, L. R. G. J. M.; Van der Wielen, L. A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 100.
102. Kelly, W. J.; Muske, K. R.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2004**, *27*, 25.
103. Chin, W. H.; Tsuey, K. C.; Tau, C. L.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1829.
104. Lemes, A. C.; Álvares, G. T.; Kalil, S. J.; *Biochem. Biotechnol.* (2012), doi:10.5433/2316-5200.2012v1n2p7
105. Michelon, M.; Borba, T. M.; Rafael, R. S.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M.; *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 1.
106. Chuan, C. W.; Nicholls, S. J.; Tuzcu, E. M.; Crowe, T.; Sipahi, I.; Schoenhagen, P.; Kapadia, S.; Hazen, S. L.; Wun, C. C.; Norton, M.; Ntanos, F.; Nissen, S. E.; *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *7*, 1967.
107. Bossio, J. P.; Harry, J.; Kinney, C. A.; *Chemosphere* **2008**, *50*, 858.
108. Divyashree, M. S.; Shamala, T. R.; Rastogi, N. K.; *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2009**, *14*, 482.
109. Quines, L. K.; Cunha, L. D.; Schmidt, M.; Zanfonato, K.; Soares, L. B.; Schmidell, W.; Aragão, G. M. F.; *XIX Congresso brasileiro de engenharia química*, Búzios, Brasil, 2012.
110. Harrison, S. T. L.; Dennis, J. S.; Chase, H. A.; *Bioseparation* **1991**, *2*, 95.
111. Chemat, F.; Zill-E-Huma; Khan, M. K.; *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *18*, 813.
112. Gözke, G.; Prechtel, C.; Kirschhöfer, F.; Mothes, G.; Ondruschka, J.; Brenner-Weiss, G.; Obst, U.; Posten, C.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *123*, 272.
113. Kapritchkoff, F. M.; Bonomi, A.; Miranda, E. A.; Pradella, J. G. C.; Maiorano, A. E.; Zuccolo, M.; Schmidell, W.; *XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
114. King, A. T.; Davey, M. R.; Mellor, I. R.; Mulligan, B. J.; Lowe, K. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 148.
115. Garcia, I. L.; Perez, M. P. D.; López, J. A.; Villar, M. A.; Yanniotis, S.; Koutinas, A.; *International Congress on Engineering and Food*, Athens, Greece, 2011.
116. Mohammad, H. A. I.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6222.
117. Zahari, M. A. K. M.; Ariffin, H.; Mokhtar, M. N.; Salihon, J.; Shirai, Y.; Hassan, M. A.; *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 8.
118. Yasotha, K.; Aroua, M. K.; Ramachandran, K. B.; Tan, I. K. P.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, *30*, 268.
119. Martino, L. L.; Cruz, M. V.; Scamac, A.; Freitas, F.; Bertinc, L.; Scandola, M.; Reis, M. A. M.; *J. Biol. Macromol.* **2014**, *71*, 117.
120. Tan, G. Y. A.; Chen, C. L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I. M. N.; Li, Y.; Zhao, L.; Mo, Y.; Wang, J. Y.; *Polymers* **2014**, *6*, 706.
121. Wampfler, B.; Ramsauer, T.; Rezzonico, S.; Hischier, R.; Köhling, R.; Thöny-Meyer, L.; Zinn, M.; *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2716.