

ESTUDO DAS PROPRIEDADES DO PHB EXTRAÍDO POR VERMES DE *Zophobas Morio Fabricius*

Luana Orlandi de Aguiar⁽¹⁾

Engenheira Química, UNIVILLE

Natalício Stachewski⁽²⁾

Acadêmico de Ciências Biológicas, UNIVILLE

Ana Paula Kurek⁽³⁾

Química Industrial e Mestre em Engenharia de Processos, UNIVILLE; Doutora em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC e pós-doutorado no Mestrado em Engenharia de Processos, UNIVILLE.

Michele Cristina Formolo Garcia⁽⁴⁾

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE; Mestre em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC; Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UFSC. Professora dos Departamentos de Engenharia Química, Ciências Biológicas, Educação Física e Gastronomia, UNIVILLE.

Denise Monique Dubet da Silva Mougá⁽⁵⁾

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas, Mestre e Doutora em Zoologia, Instituto de Biociências da USP.

Ana Paula Testa Pezzin⁽⁶⁾

Licenciada em Química, Mestre em Engenharia Química e Doutora em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. Pós-Doutorado na Université Pierre et Marie Curie, em Paris/França. Professora dos Departamentos de Engenharia Química, Engenharia Ambiental e Sanitária, Engenharia Civil e Arquitetura e Urbanismo e Mestrado em Engenharia de Processos, UNIVILLE.

Endereço⁽¹⁾: R. Paulo Malschitzki, 10, Zona Industrial Norte, CEP 89219-710, Joinville/SC, Brasil; Tel: (47) 3461-9000; e-mail: anapkurek@gmail

RESUMO

Este trabalho avaliou o processo de extração do PHB, por meio das larvas de *Zophobas morio* Fabricius, comparado ao processo químico tradicional. O PHB foi sintetizado pela bactéria *Cupriavidus necator* em frascos de Erlenmeyer com 300 mL de meio mineral contendo glicose e frutose como fontes de carbono. O cultivo foi conduzido por 24 h a 30 °C e 150 rpm. A biomassa obtida do cultivo foi submetida à extração química (dispersão de clorofórmio/hipoclorito de sódio) e biológica, sendo, para isto, utilizada em uma mistura 2:1 (m/m) de farelo de trigo com células contendo PHB como fonte de alimentação das larvas de *Zophobas morio* Fabricius. O PHB obtido pelos dois processos foi caracterizado por termogravimetria (TG), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier - reflexão total atenuada (FTIR/ATR) e difratometria de raios-X (DRX). Verificou-se que a amostra extraída pelo método biológico, quando comparada com a amostra extraída pelo método químico, apresentou a mesma estrutura química e que a metodologia biológica usando larvas apresentou-se eficiente, garantindo a extração do PHB com elevada pureza e estabilidade térmica, com reduzida quantidade de solvente, tornando este processo mais ambientalmente amigável.

PALAVRAS-CHAVE: Extração biológica, Polihidroxibutirato, *Zophobas morio* Fabricius

INTRODUÇÃO

A produção de polímeros aumenta continuamente e, segundo o *Plastics Europe Market Research Group* – PEMRG (2016), a produção global aumentou para 322 milhões de toneladas no ano em 2015, sendo que a grande maioria dos polímeros convencionais são sintetizados a partir de matérias-primas não renováveis. Uma alternativa é a reciclagem, porém apenas uma pequena parcela é reciclada. As grandes maiorias dos polímeros petroquímicos acabam sendo destinados a aterros sanitários e industriais ou incinerados, ao fim da sua vida útil,

alternativas que ocasionam grandes impactos ambientais devido ao longo tempo de degradação desses materiais no meio ambiente.

Nesse contexto, faz-se necessário estudar a substituição dos polímeros convencionais por materiais produzidos a partir de fontes renováveis, conhecidos como biopolímeros, visando à diminuição dos impactos ambientais causados por resíduos poliméricos convencionais.

Entre os polímeros biodegradáveis têm-se os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres alifáticos naturais biodegradáveis, sintetizados naturalmente por várias espécies bacterianas como reserva de energia (MA *et al.*, 2014). As propriedades desses polímeros podem variar de termoplásticos rígidos à elastômeros elásticos, sendo diretamente influenciadas pela escolha do substrato, bactérias e condições de cultivo (DIETRICH *et al.*, 2017). Dentre toda a variedade de PHAs existentes, há o polihidroxibutirato (PHB), polihidroxivalerato (PHV) e poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), sendo que o PHB é o mais simples e extensamente estudado (LAURENCE, 2012; ZHENG *et al.*, 2014).

O PHB é um biopolímero cristalino e linear com propriedades estruturais semelhantes ao polipropileno isotático (PP) e apresenta a vantagem de ser biodegradável e biocompatível, sendo um candidato para a substituição do uso do polímero proveniente de fontes fósseis (RAVEENDRAN *et al.*, 2013; WELLEN, *et al.*, 2013). De acordo com Silva *et al.* (2007), as aplicações do PHB são destinadas, na sua grande maioria, a produtos produzidos por termoformagem e injeção, filmes extrudados. Além disso, devido a sua natureza biodegradável e elevadas propriedades mecânicas, o PHB pode ser utilizado na produção de embalagens e itens descartáveis. Atualmente, é amplamente estudado para aplicações na área médica, como em fios de suturas, malhas cirúrgicas, curativos e tecidos para regeneração óssea e nervosa, por exemplo (LI e LOH, 2015; MANAVITEHRANI *et al.*, 2016; MISRA *et al.*, 2015).

A síntese do PHB pode ser realizada por várias bactérias, sendo a espécie mais utilizada a *Cupriavidus necator*, devido à sua capacidade de acumular o polímero em até 90% da massa seca de sua célula (OBRUCA *et al.*, 2014). Segundo Aramvash *et al.* (2015), o acúmulo dos grânulos intracelulares de PHB depende de fatores como pH, aeração, fontes de carbono e nitrogênio e meio de cultura. A produção do polímero ocorre como uma via biosintética em duas etapas. Na primeira etapa, os microorganismos são induzidos ao crescimento em meio sem limitação de nutrientes e, na segunda etapa, faz-se a limitação dos nutrientes essenciais e excesso de fonte de carbono, promovendo o acúmulo do polímero na forma de grânulos intracelulares como reserva de energia e alimento (SILVA *et al.*, 2007; DAITX, 2016; FONSECA, 2014).

Como o polímero é intracelular, após o processo de polimerização, é necessário realizar a extração do mesmo. Segundo Jacquell *et al.* (2008), os métodos de extração podem ser realizados de diferentes maneiras, como, por exemplo, com o uso de solventes, por perturbação mecânica e métodos biológicos. Conforme o método utilizado, se obtêm diferentes rendimentos e purezas, que podem variar de 60 a 98%. Convencionalmente, a extração é realizada quimicamente utilizando elevadas quantidades de clorofórmio, apresentando elevado custo e problemas do ponto de vista ambiental, visto que esse solvente é altamente tóxico e volátil (FLANAGAN e POUNDER, 2010). Sendo assim, Telles *et al.* (2011), indicaram a necessidade do desenvolvimento de métodos que sejam viáveis econômica e ambientalmente e que garantam o desenvolvimento de materiais com o máximo possível de pureza e propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas.

Atualmente, há poucos estudos sobre o uso de novas tecnologias biológicas em escala industrial visando à redução de custos e troca do emprego de produtos químicos de elevada toxicidade para realizar a extração do polímero no interior das células. Estudos realizados por Murugan *et al.* (2016) e Ong *et al.* (2017), verificaram a possibilidade de substituição do uso de solventes para extração dos grânulos intracelulares de PHB pela utilização de larvas do besouro *Tenebrio molitor Linnaeus*, sendo que esta espécie foi capaz de digerir o material não poliéster, liberando o PHB intacto no resíduo fecal.

Dentre as espécies de besouro pertencentes à família *Tenebrionidae* da ordem *Coleoptera* tem-se o *Zophobas morio* e *Tenebrio molitor*, conhecidos popularmente como *Tenebrio gigante* e bicho da farinha, respectivamente (COSTA, 2017; MORALES-RAMOS *et al.*, 2011). De acordo com Yang *et al.* (2015), essas espécies são capazes de biodegradar polímeros sintéticos em gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) e os carbonos dos produtos são transformados em biomassa.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de extração do PHB, sintetizado pela da bactéria *Cupriavidus necator*, por meio das larvas de *Zophobas morio fabricius*, comparando as alterações no biopolímero ocasionadas pela extração biológica com a extração química como amostra de referência. Logo, esse estudo visa à substituição do processo de extração por via química e contribuirá tanto técnico quanto cientificamente nos estudos de metodologias de extração do PHB.

METODOLOGIA

Biossíntese do PHB

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Cupriavidus necator* – DSM 545. Para a ativação das células foi utilizado um frasco de Erlenmeyer aletado contendo 100 mL de caldo nutriente (NB) composto por 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne. As células de *Cupriavidus necator*, mantidas em placa de Petri sob refrigeração, foram transferidas para o frasco. Posteriormente, o frasco foi incubado em um agitador (B. Braun CERTOMAT HK) em movimento rotatório de 150 rpm a 30 °C, *overnight* (±18h).

Para a produção de PHB foi o Meio Mineral (MM), descrito por Ramsay et al., (1990) com alterações propostas por Aragão (1996). Resumidamente, o meio foi composto: glicose (15 g · L⁻¹), frutose (15 g · L⁻¹), ácido nitriloacético (0,19 g · L⁻¹), citrato férrico de amônia (0,06 g · L⁻¹), MgSO₄ · 7H₂O (0,5 g · L⁻¹), CaCl₂ · 2H₂O (0,01 g · L⁻¹), NH₄SO₄ (5 g · L⁻¹), Na₂HPO₄ · 12H₂O (8,95 g · L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g · L⁻¹) e oligoelementos (1 mL · L⁻¹). A solução de oligoelementos foi composta: H₃BO₃ (0,3 g · L⁻¹), CoCl₂ · 6H₂O (0,2 g · L⁻¹), ZnSO₄ · 7H₂O (0,1 g · L⁻¹), MnCl₄ · 4H₂O (0,03 g · L⁻¹), Na₂MoO₄ · 2H₂O (0,03 g · L⁻¹), NiCl₂ · 6H₂O (0,02 g · L⁻¹), CuSO₄ · 5H₂O (0,01 g · L⁻¹).

Este processo foi dividido em duas etapas, uma etapa denominada pré-inóculo, conduzida de forma a estimular o crescimento das células sem nenhuma limitação de nutrientes, enquanto a segunda etapa, denominada cultivo, foi conduzida, com limitação da fonte de nitrogênio (NH₄SO₄ (2,3 g · L⁻¹)), mantendo-se os demais nutrientes e concentrações, para estimular a produção do polímero.

As células foram transferidas a uma taxa de 10% (V / V) e novamente incubadas em um agitador orbital a 150 rpm, 30°C por 24 h. Ao final do cultivo o meio contendo as células foi congelado para a posterior extração.

Extração do PHB

- Extração química

Para efeito de comparação utilizou-se também o método de extração de Hahn *et al.* (1994), o qual utiliza uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio. O meio de cultivo foi centrifugado a 6.000 rpm. As células foram ressuspensas em uma dispersão contendo 100 mL de hipoclorito de sódio e 100 mL de clorofórmio (30% m/V). Esta suspensão foi agitada durante 150 min a 30 °C. Após este tratamento uma nova etapa de centrifugação foi realizada na qual são obtidas três fases: a fase superior é composta pelo hipoclorito de sódio, na fase intermediária ficam os *debris* celulares (também chamados de NPCM, ou materiais celulares não-PHB) e no fundo a solução de clorofórmio e P(3HB). Removendo-se as fases superior e intermediária e, vertendo-se a última fase em uma placa de Petri, posteriormente submetida a evaporação obtém-se uma massa polimérica. Para a purificação do polímero, foi utilizada a metodologia proposta por Garcia (2006), assim, o polímero foi solubilizado em clorofórmio sob agitação constante a 60 °C. Em seguida, adicionou-se n-hexano na proporção 1:1 (V/V), como agente não-solvente, promovendo a precipitação do PHB e, então, foi realizada a filtração a vácuo dos cristais poliméricos formados. Após o processo de filtração, os cristais foram vertidos em uma placa de Petri para a evaporação do solvente.

Os filmes poliméricos foram preparados após o processo de evaporação do solvente. Os biopolímeros foram solubilizados utilizando-se clorofórmio (1% m/V) com agitação por 2 h em *shaker* (B. Braun CERTOMAT HK) em movimento rotatório a 150 rpm. Em seguida, as amostras foram vertidas em placas de Petri e alocadas em uma cuba de vidro saturada em clorofórmio. Os filmes poliméricos foram removidos após o período de evaporação completa do solvente e então secos em estufa à vácuo (Quimis) 40 °C por 24 h, para posterior caracterização.

- Extração biológica

Adaptando a metodologia de Murugan *et al.* (2016) e Ong *et al.* (2017), o meio de cultivo foi centrifugado (SP Labor) durante 10 min a 6.000 rpm, para separação das células de *C. necator* contendo PHB. A alimentação das larvas do *Zophobas morio* (50 g) foi realizada, durante um período de 16 dias, com uma mistura de farelo de trigo com a biomassa centrifugada, sendo a mistura seca em estufa (Quimis) a 60 °C por 24 h. As larvas foram mantidas em recipientes plásticos em condições ambientais. De acordo com Murugan *et al.* (2016), a quantidade de alimento necessário para as larvas deve corresponder a 5% da massa corporal por dia das mesmas. Posteriormente, as fezes obtidas das larvas foram secas durante 8 h em uma estufa (Quimis) a 60 °C.

As fezes secas foram adicionadas em 100 mL de água destilada e submetidas a sonicação por 30 min utilizando-se 40 kHz em um banho ultrassônico (Thornton) a temperatura ambiente (2017). Posteriormente, a mistura foi agitada por 24 h e centrifugada (SP Labor) a 6.000 rpm por 5 min a 4 °C.

O PHB recuperado foi seco em estufa (Quimis) a 105 °C até atingir massa constante. O processo anterior foi repetido e o PHB recuperado foi agitado constantemente por 1 h com hidróxido de sódio 0,05 M. Após, a mistura foi centrifugada (SP Labor) a 6.000 rpm por 5 min a 4 °C. O PHB recuperado passou pelo processo de agitação com água por 1 h e, novamente, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores e então foi seco a 105 °C até atingir massa constante. Esse material foi utilizado para caracterizar a amostra.

Identificação das amostras

As amostras obtidas pelos diferentes processos de extração foram identificadas conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1: Identificação das amostras

Amostra	Procedimento
PHB_EQ	PHB extraído pelo método químico
PHB_EB	PHB extraído pelo método biológico

Caracterização das amostras de PHB obtidas pelos diferentes métodos de extração

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com Acessório de Reflexão Total Atenuada (FTIR/ATR): os espectros das amostras foram obtidos em um equipamento da marca PerkinElmer modelo 65 FT-IR, no intervalo de 4.000 a 600 cm^{-1} , com 32 varreduras.

Difratometria de raios-X (DRX): para analisar os picos de difração em 2θ foram obtidos os difratogramas de raios-X em um equipamento da marca Shimadzu, modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, utilizou-se um ângulo 2θ alternando de 5 a 70°.

Termogravimetria (TG): esta análise foi realizada com o objetivo de analisar a estabilidade térmica e pureza das amostras após os processos de extração. A análise foi efetuada no equipamento da marca Shimadzu modelo TGA-50, com aquecimento de 25 a 900 °C a uma taxa de 10 °C/min em atmosfera inerte (N_2).

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): foi utilizada com o objetivo de identificar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e grau de cristalinidade (α_c). A análise foi conduzida em equipamento da marca TA Instruments modelo Q20, com taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera inerte (N_2), com faixa de temperatura de 25 a 200 °C, resfriamento até -90 °C e segundo aquecimento até 200 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com Acessório de Reflexão Total Atenuada (FTIR/ATR)

Na Figura 1 são apresentados os espectros obtidos por FTIR/ATR referente às amostras de PHB extraídas pelo método químico e biológico. Verificou-se no espectro obtido para as amostras (Figura 1) bandas em 2977 e 2935

cm^{-1} (PHB_EQ) e 2976 e 2933 cm^{-1} (PHB_EB) relacionadas ao grupo assimétrico metil (CH_3) e ao grupo simétrico metileno (CH_2), respectivamente, correspondentes às cadeias laterais do monômero do PHB, o que está de acordo com a literatura (LÓPEZ-CUELLAR *et al.*, 2011; BHUWAL *et al.*, 2013).

Observou-se uma banda de absorção em 1720 cm^{-1} (Figura 1) correspondente à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) associada aos agrupamentos cristalinos, valor idêntico ao descrito por Bhuwal *et al.* (2013) referente a esta ligação.

De acordo com Tânase *et al.* (2015), a presença de uma banda em 1379 cm^{-1} é atribuída ao alongamento simétrico do grupo metil (CH_3), banda também observada no espectro, Figura 1, obtido da amostra PHB_EQ e também, muito próxima à observada no espectro da amostra PHB_EB em 1380 cm^{-1} .

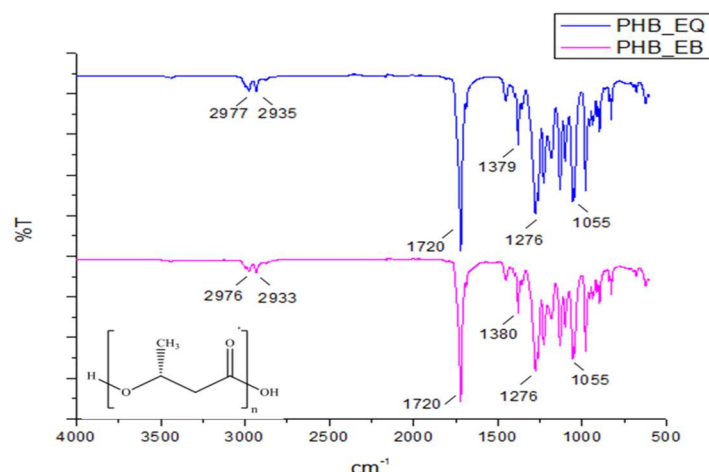


Figura 1: Espectros obtidos por FTIR/ATR das amostras de PHB_EQ e PHB_EB.

Na Figura 1 foi possível observar a presença de bandas em 1276 e 1055 cm^{-1} e, segundo López-Cuellar *et al.* (2011), bandas de absorção entre 1300 e 1000 cm^{-1} são relacionados a vibrações de alongamento C-O-C. Em um estudo realizado por Bhuwal *et al.* (2013), também foi observada banda em 1273 cm^{-1} e foi atribuída a esse estiramento, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho para ambas as amostras, de 1276 cm^{-1} . Portanto, as bandas observadas no espectro correspondem às ligações químicas dos grupamentos presentes no polímero, garantindo que o PHB foi de fato sintetizado e extraído por ambos dos métodos.

Difratometria de raios-X (DRX)

Na Figura 2 são apresentados os difratogramas de raios-X para as amostras extraídas pelo método químico e biológico.

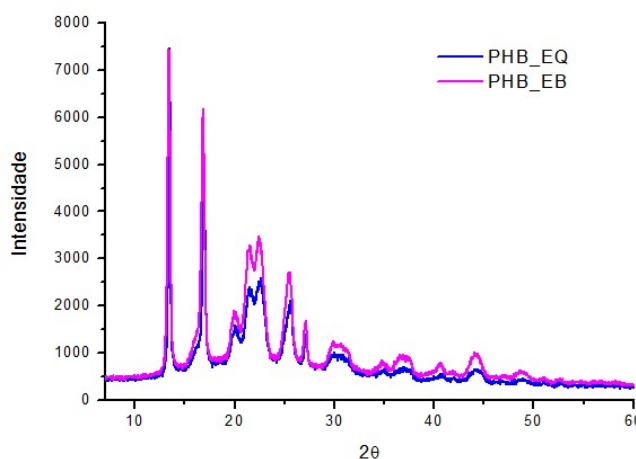


Figura 2: Perfis de difração de raios-X para PHB_EQ e PHB_EB.

Conforme observado na Figura 2, não houve deslocamento dos picos de difração das amostras PHB_EQ e PHB_EB, apresentando picos de difração em 2θ bem definidos, correspondentes às reflexões (020) e (110), em $13,5^\circ$ para PHB_EQ e $13,3^\circ$ para PHB_EB e $16,9^\circ$ em ambas as amostras, respectivamente, valores similares ao descrito por Garcia (2006). Observou-se também, para PHB_EQ e PHB_EB, reflexões em $19,9^\circ$ e, segundo Wang *et al.* (2008), esse pico de difração é atribuído à forma β dos cristais do polímero. Outras reflexões também foram observadas na amostra PHB_EQ em $21,5^\circ$ (101), $22,4^\circ$ (111), $25,5^\circ$ (130), 27° (040) e na amostra PHB_EB picos de difração em $21,6^\circ$ (101), $22,5^\circ$ (111), $25,5^\circ$ (130) e 27° (040), conforme relatado também na literatura.

Dos difratogramas de raios-X, Figura 2, determinou-se o grau de cristalinidade do PHB_EQ e PHB_EB, sendo, 56,7 e 58,4%, respectivamente, valores similares ao descrito por Garcia (2006), pelo mesmo método, para o PHB, de 61,66% e inferior ao calculado por meio da entalpia de fusão obtida por DSC, de 63 e 64%. Porém, os valores obtidos ainda encontram-se dentro da faixa de cristalinidade, de 55 a 80% (MACHADO *et al.*, 2010).

Termogravimetria (TG)

Na Figura 3 são apresentadas as curvas termogravimétricas (TG) obtidas para as amostras de PHB extraída pelo método químico (PHB_EQ) e biológico (PHB_EB). Observa-se que o perfil de degradação térmica ocorreu em um único estágio para ambas as amostras, o que também foi observado no estudo realizado por Garcia (2006). O filme polimérico extraído pelo método químico e biológico apresentou temperatura de início de degradação (T_{onset}) de 325 e 347°C , respectivamente, valores bem superiores ao encontrado por Garcia (2006), de 282°C , indicando uma maior estabilidade térmica do PHB sintetizado comparado com o PHB produzido por Garcia (2006).

Conforme descrito por Garcia (2006), a análise de TG pode ser utilizada como indicativo do grau de pureza do polímero, representado pela perda de massa. Logo, a porcentagem de perda de massa obtida para PHB_EQ (Figura 3a) e PHB_EB (Figura 3b) foi de 98,4 e 98,7%, respectivamente, valor semelhante ao descrito por Hahn *et al.* (1995), de 98% para o PHB. As impurezas presentes no biopolímero podem ser resultado da ligação de hidrogênio do mesmo com proteínas e cátions do meio de cultivo.

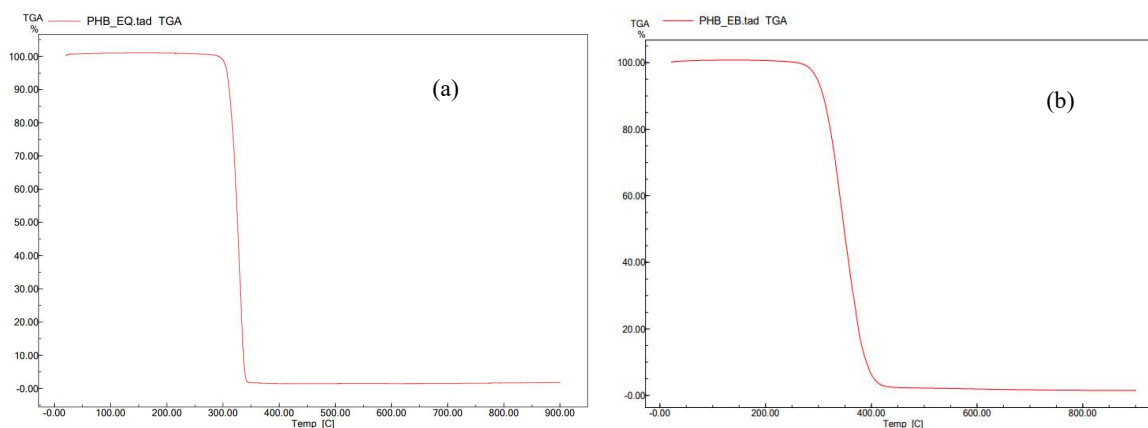


Figura 3: Curvas TG das amostras: a) PHB_EQ; b) PHB_EB.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 4 são apresentadas as curvas de DSC das amostras de polímero recuperado a partir de clorofórmio e hipoclorito de sódio e com uso das larvas de *Zophobas morio* Fabricius. Verificou-se que a temperatura de fusão (T_m) do PHB recuperado pelo método químico e biológico (Figura 4a), foi de 174°C e 172°C , respectivamente, valor semelhante ao descrito por Hahn *et al.* (1995) e por Machado *et al.* (2010), de 173 a 176°C . A entalpia de

fusão liberada (ΔH_m) foi de 89,6 J/g para PHB_EQ e 90,9 J/g para PHB_EB, valor semelhante ao reportado na literatura por Machado *et al.*, (2010), de 93 J/g.

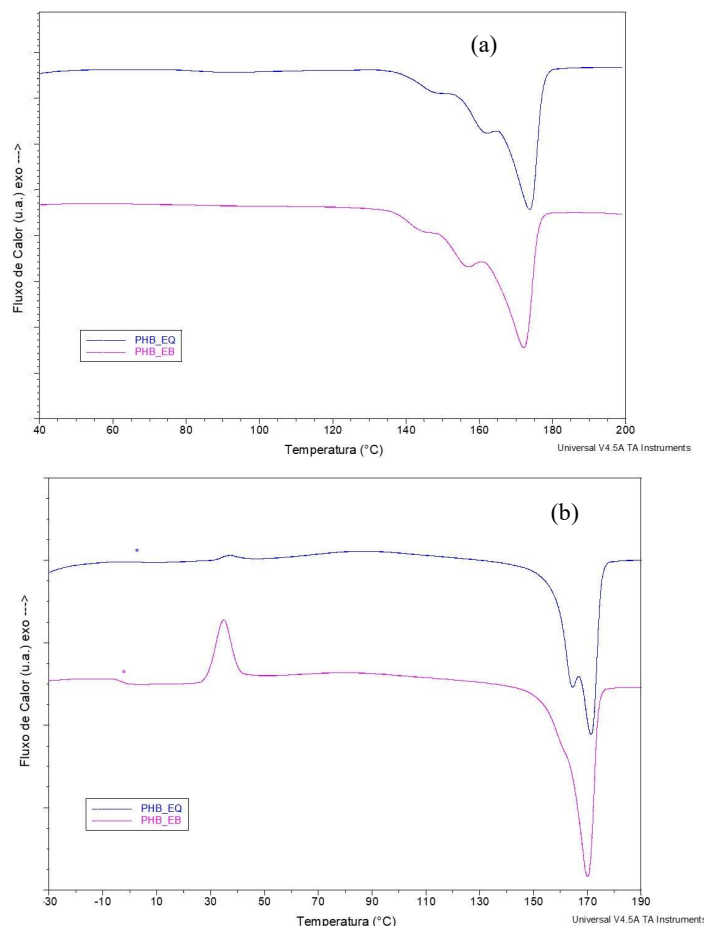


Figura 4: Curvas obtidas por DSC das amostras: a) primeiro aquecimento; b) segundo aquecimento.

O grau de cristalinidade do material foi calculado por meio da razão entre a entalpia de fusão da amostra e a entalpia de fusão do polímero, supondo 100% cristalino, de 142 J/g (TSUJI *et al.*, 1996). Logo, para PHB_EQ e PHB_EB, o grau de cristalinidade obtido foi de aproximadamente 63 e 64%, respectivamente, valor dentro da faixa de cristalinidade para o PHB, de 55 a 80%, conforme descrito por Machado *et al.* (2010).

Por meio das curvas obtidas por DSC do 2º aquecimento (Figura 4b), observou-se que as temperaturas de transição vítrea (T_g) para ambas as amostras foram de - 3,3 e - 4,4 °C, valores semelhantes ao encontrado por Mousavioun *et al.* (2010).

Da Figura 4b, observou-se também que a amostra extraída pelo método biológico tem uma temperatura de transição vítrea mais nítida quando comparada com a amostra extraída pelo método químico. Além disso, nas curvas nota-se que houve a formação de um pico de cristalinidade bem definido na amostra PHB_EB e, ainda, que a fusão do material ocorreu em um único pico, o que pode indicar uma maior organização dos arranjos cristalinos, características observadas também em uma análise de DSC realizado por Wellen *et al.* (2015).

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos a partir do aquecimento das curvas de DSC.

Tabela 1: Dados de temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) para PHB_EQ e PHB_EB.

	T_m (°C)	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)
PHB_EQ	174	-3,3	89,6	63
PHB_EB	172	-4,4	90,9	64

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a eficiência da extração do PHB com larvas de *Zophobas morio* Fabricius comparada ao método de extração química convencional. Os diferentes métodos de extração possibilitaram a obtenção do polímero desejado, como evidenciado pelas análises de FTIR. A partir da análise de DRX, verificaram-se picos de difração característicos do PHB em ambas as amostras e, foi determinado o grau de cristalinidade de 56,7 e 58,4% para o PHB extraído pelo método químico e biológico, respectivamente. Por meio das análises de DSC, verificou-se que as amostras obtidas pelo método químico e biológico apresentaram temperatura de fusão de 174 e 173 °C, temperatura de transição vítrea (T_g) de -3,3 e - 4,4 °C e grau de cristalinidade de 63 e 64%, respectivamente. Já por TG, obteve-se pureza de 98,4 e 98,7%, T_{onset} de 325 e 347 °C para os dois polímeros, valores que indicaram uma maior estabilidade térmica do polímero extraído biologicamente.

Sendo assim, a extração biológica por larvas de *Zophobas morio* foi eficiente para extrair o PHB, apresentando propriedades ligeiramente superiores ao polímero extraído quimicamente, como maior estabilidade térmica e maior pureza, reduzindo a quantidade de solvente exigida no processo, tornando o processo de extração mais ambientalmente amigável. Portanto, o processo de extração química pode ser substituído pela metodologia de extração biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, S., ALLEN, D., PHOENIX, V. R., et al., “Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment”. *Nature Geoscience*, v. 12, n. 5, pp. 339, 2019.
2. APATI, G.P., KELBERT, M., SOMBRIO B.R., et al., “Evaluation of the addition of glycerol to *Cupriavidus necator* culture medium over Poly (3-hydroxybutyrate) production”, *Matéria (Rio J.)*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, e-11978, 2018.
3. ARAGÃO, G.M.F., “*Production de poly-β-hydroxyalkanoates par Alcaligenes eutrophus: caractérisation cinétique et contribution à l’optimisation de la mise en oeuvre des cultures*”. Toulouse. These du Doctorale (Sciences de la Vie), L’institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 1996.
4. ARAMVASH, A., SHAHABI, A.Z., AGHJEH, D.S., et al., “Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*”, *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, n. 7, pp. 2307 – 2316, 2015.
5. BHUWAL, A.K., SINGH, G., AGGARWAL, N.K., et al., “Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes”, *International Journal of Biomaterials*, v. 2013, n. 1, pp. 1 – 10, 2013.
6. COSTA, S.M., “*Proteínas de Larvas de Tenebrio molitor (L. 1758): Extração, Caracterização e Aplicação num Produto Alimentar*”, Dissertação M.Sc. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2017.
7. DIETRICH, K., DUMONT, M. J., DEL RIO, L. F., et al., “Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic”. *Sustainable Production and Consumption*, v. 9, pp. 58 – 70, 2017.
8. FLANAGAN, R.J., POUNDER, D.J., “A chloroform-related death: Analytical and forensic aspects”, *Forensic Science International*, v. 197, pp. 89-96, 2010.
9. GARCIA, M.C.F., “*Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por Cupriavidus necator e seu efeito sobre as características do polímero*”, Dissertação M.Sc. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2006.
10. Glaser, J. A. “Polymer recycling using microbes”. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v 19(7), pp. 1817–1823, 2017.

11. HAHN, S.K., CHANG, Y.K., KIM, B.S., *et al.*, “Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 256–261, 1994.
12. HAHN, S.K., CHANG, Y.K., LEE, S.Y., “Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 1, pp. 34–39, 1995.
13. JACQUEL, N., LO, C., WEI, Y. *et al.*, “Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, pp. 15–27, 2008.
14. LAURENCE, W. M. *Film Properties of Plastics and Elastomers*. 3 ed. William Andrew, 2012.
15. LI, Z., LOH, X. J., “Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications”, *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 10, pp. 2865 – 2879, 2015.
16. LÓPEZ-CUELLAR, M.R. ALBA-FLORES, J., RODRÍGUEZ J.N.G, *et al.* “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, pp. 74 – 80, 2011.
17. MA, P., XU, P., CHEN, M., *et al.*, “Structure–property relationships of reactively compatibilized PHB/EVA/starch blends”, *Carbohydrate Polymers*, v. 108, pp. 299 – 306, 2014.
18. MACHADO, M.L.C. PEREIRA, N.C., MIRANDA L.F., *et al.*, “Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n. 1, pp. 65 – 71, 2010.
19. MANAVITEHRANI, I., FATHI, A., BADR, H., *et al.*, “Biomedical applications of biodegradable polyesters”, *Polymers*, v. 8, n. 1, pp. 20 – 52, 2016.
20. MISRA, M., PANDEY, J., MOHANTY, A. “*Biocomposites: Design and Mechanical Performance*”. 1 ed. Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2015.
21. MORALES-RAMOS, J.A., ROJAS, M.G., KAY, S., *et al.*, “Self-selection of two diet components by *Tenebrio molitor* (coleptera Tenebrionidae) larvae and its impact on fitness”, *Environmental Entomology*, v. 40, n. 5, pp. 1285 – 1294, 2011.
22. MURUGAN, P., HANA, L., GANB, C.Y., *et al.*, “A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*”, *Journal of Biotechnology*, v. 239, pp. 98 – 105, 2016.
23. NERY, T.B.R., SANTOS, Z.I.G.; JOSE, N.M. “Desenvolvimento e caracterização de biocompósitos de polihidroxibutirato e fibra de bananeira”, *Matéria (Rio J.)*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, e12257, 2018.
24. OBRUCA, S., BENESOVA, P., OBORNA, J., *et al.*, “Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly (3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*”, *Biotechnology Letters*, v. 36, pp. 775 – 781, 2014.
25. ONG, S.Y., KHO, H.P., RIEDEL, S.L., *et al.*, “An integrative study on biologically recovered polyhydroxyalkanoates (PHAs) and simultaneous assessment of gut microbiome in yellow mealworm”, *Journal of Biotechnology*, v. 265, pp. 31–39, 2017.
26. RAVEENDRAN, S., NAGAPOOSAM, S., PARAMESWARAN, B., *et al.*, “Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 78, pp. 67 – 72, 2013.
27. SILVA, L.F., GOMEZ, J.G.C., ROCHA, R.C., *et al.*, “Produção Biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil”, *Química Nova*, v. 30, n. 7, pp. 1732 – 1743, 2007.
28. TÂNASE, E.E., POPA, M.E., RÁPĂ, M., *et al.*, “PHB/Cellulose fibers-based materials: physical, mechanical and barrier properties”, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v 6, n. 1, pp. 608 – 615, 2015.
29. TELLES, R., SARAN, L.M., UNÊDA-TREVISOLLI, S. H., “Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar”, *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB*, v. 2, n. 1, pp. 52–63, 2011.
30. TSUJI, H., IKADA, Y., “Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies of solution-cast blends from poly(DL-lactide) and poly(ε-caprolactone)”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 60, n. 1, pp. 2367–2375, 1996.
31. MOUSAVIOUN, P., DOHERTY, W.O.S., GRAEME, G., “Thermal stability and miscibility of poly (hydroxybutyrate) and soda lignin blends”. *Industrial Crops and Products*, v. 32, n. 3, pp. 656 – 662, 2010.
32. WANG, C., HSU, C.H., HWANG, I.H., “Scaling laws and internal structure for characterizing electro spun poly[(r)-3-hydroxybutyrate] fibers”, *Polymers*, n. 49, pp. 4188–4195, 2008.
33. WELLEN, R.M.R. RABELLO M.S., ARAUJO JÚNIOR I.C., *et al.* “Melting and crystallization of poly (3-hydroxybutyrate): effect of heating/cooling rates on phase transformation”, *Polímeros*, v. 25, n. 3, pp. 296–304, 2015.
34. WELLEN, R.M.R.; RABELLO, M.S., FECHINE, G.J.M. *et al.*, “The melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate) by DSC”, *Polymer Testing*, v. 32, pp. 215–220, 2013.

34. YANG, Y., YANG, J., WU, W.M., *et al.*, “Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests”, *Environmental Science Technology*, v. 49, n. 20, pp. 12080–12086, 2015.
35. ZHENG, Z.; OPHIR, O.; GOYAL, R. KOHN, J. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. 1 ed. William Andrew, 2014.