



Desenvolvimento de processos ecológicos para a recuperação de PHA a partir de Culturas Mistas

José Pedro dos Reis Fragoso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biológica

Orientadores: Dr. Nídia Dana Mariano Lourenço
Prof. Dr. Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro

Júri

Presidente: Dr. Gabriel António Amaro Monteiro
Orientador: Dr. Nídia Dana Mariano Lourenço
Vogal: Dr. José António Leonardo dos Santos

Outubro 2021

Declaração

Declaro que este documento é original, de minha autoria e cumpre o código de conduta e boas práticas da Universidade de Lisboa

Prefácio

O trabalho apresentado nesta dissertação foi levado a cabo no grupo de engenharia bioquímica (BIOENG) na Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade NOVA de Lisboa (UNL), entre março e novembro de 2021. A dissertação foi orientada pela Dr. Nídia Dana Mariano Lourenço e co-orientada a partir do Instituto Superior Técnico (IST) pela Prof. Dr. Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro.

Agradecimentos

Gostava em primeiro lugar de agradecer a toda a minha Ohana pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos, foram os responsáveis por guiar o meu crescimento enquanto homem e filantropo. Gostaria de referir especialmente os meus pais, a quem dedico este trabalho, pela educação que me deram e por todo o esforço que fizeram por mim. Sem vocês nada disto seria possível.

Um obrigado muito especial à Margarida pelo amor que partilhou comigo bem como pelas horas de trabalho juntos.

Não posso deixar de referir toda a equipa do BIOENG que me acolheu com boa disposição desde o primeiro dia. Em especial à Marta, essencial pelo acompanhamento orientação e ensinamentos. Agradeço também aos outros parceiros de projeto, a Rita e o Rodrigo.

Essenciais foram também as minhas orientadoras a quem agradeço: Dr. Nídia Lourenço e Dr. Helena Pinheiro, sempre disponíveis com um sorriso no rosto.

Por último, um agradecimento do fundo do coração, para a minha avó, a Teresinha, o meu irmão, os meus padrinhos, a Matilde e o Joaquim; as últimas pedras basilares da minha vida que faltavam referir e que têm a capacidade de me sustentar em qualquer dificuldade.

Abstract

Today's society has reached a climate emergency situation due to the impacts of human activity. The scientific community is working to improve our future and one of the main goals is to achieve a circular economy, it's in this landscape that this project was born.

Our part in this project was to purify, using an eco-friendly procedure, a polyhydroxyalkanoate (PHA) from an enriched biomass grown using paper mill side streams as a substrate.

The strategy applied was to dissolve the non-polymeric cell mass with some inexpensive, low-impact reagents. The received biomass had a PHBV content of less than 30% and half of the polymer was water soluble, thus lost in all extraction processes implemented.

Nevertheless it was possible to obtain an extraction product with a PHA content of $70,8 \pm 1,5\%$ recovering $33,7 \pm 1,8\%$ of the polymer present in the initial biomass. This trial was made with some state of the art techniques that didn't allow an easy, ecological and low-cost scale-up, so the extraction process was adapted. With this changes, the extraction was quite unsuccessful, achieving the most promising result of $27,5 \pm 2,4\%$ in PHA content and recovering $40,3 \pm 3,1\%$ of the initial polymer.

All this tests allowed us to conclude that, for this biomass, an dual extraction with a first quick step of acidification, followed by an basic digestion is needed to dissolve the impurities of different nature.

A lot of thought and work was put in the optimization of the producing and processing steps, prior to the arrival of the biomass at NOVA ID, but no improvements were made in the PHA content nor the quality of it. So, if the situation remains unchanged, no improvements are expected.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates; Mixed Culture; Paper Industry Residues; Extraction; Alkaline Digestion; Scale up; Drying

Resumo

A sociedade em que vivemos atingiu uma situação de emergência climática, devido aos impactos da atividade humana. A comunidade científica tem trabalhado com afinco para solucionar estas questões, nomeadamente para viabilizar uma economia circular e é neste contexto que surge este projeto. O papel da nossa equipa na NOVA ID foi purificar, de forma ecológica, o PHA contido numa biomassa alimentada com um substrato proveniente de uma água residual da indústria do papel.

A estratégia extrativa preferida assenta na dissolução do material celular não polimérico. Infelizmente as biomassas disponíveis tinham um teor polimérico inferior a 30% sendo que metade do polímero se encontrava numa forma solúvel em água e, conseqüentemente, é perdido na extração.

Ainda assim foi possível recuperar $33,7 \pm 1,8\%$ do polímero presente na biomassa inicial atingindo uma pureza final de $70,8 \pm 1,5\%$. Neste ensaio as condições foram optimizadas a partir da literatura e não viabilizavam um aumento de escala simples e rentável, então, decidiu-se adaptar a extração obtendo-se, na condição mais favorável, um produto com um conteúdo de PHA de $27,5 \pm 2,4\%$ e uma recuperação de $40,3 \pm 3,1\%$ do polímero inicial. Os testes efetuados permitiram concluir que, para esta biomassa, é necessário aplicar uma extração com um pré-tratamento ácido seguido de uma digestão básica de forma a dissolver as diferentes impurezas.

Foi também dispendido muito tempo e trabalho numa tentativa de optimização da produção e processamento aplicados pelo parceiro a jusante na cadeia de valor, mas as tentativas de melhoria mostraram ser infrutíferas. Assim sendo, não são expectáveis claras melhorias.

Palavras Chave

Polihidroxicanoatos; Culturas Microbianas Mistas; Resíduos da indústria do papel; Extração; Digestão Alcalina; *Scale up*; Secagem

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Contextualização da Dissertação	3
1.2	Bioplásticos	4
1.2.1	Porque são relevantes?	4
1.2.2	Mercado	5
1.3	Polihidroxicanoatos	6
1.3.1	Estrutura, classificação e propriedades	6
1.3.2	Aplicações	8
1.3.3	Produção microbiana de PHAs	8
1.3.3.A	Culturas puras vs. culturas mistas	8
1.3.3.B	Produção com resíduos da indústria do papel	11
1.3.4	Recuperação de PHA do caldo de produção	13
1.3.4.A	Processos convencionais	13
1.3.4.B	Extração com processos ecológicos/verdes	15
1.3.5	Secagem térmica de PHA	19
1.4	Motivação e objetivos	22
2	Materiais e Métodos	25
2.1	Processo e biomassa de estudo	27
2.2	Moagem	28
2.3	Estudo das consequências do processamento pós-produção	28
2.4	Extração laboratorial	29
2.5	Extração piloto	30
2.6	Secagem	31
2.7	Quantificação e caracterização do polihidroxicanoato (PHA)	32
3	Resultados & Discussão	35
3.1	Análise comparativa da biomassa de estudo	37
3.2	Processo extrativo - resultados prévios de enquadramento	44

3.3	Ensaio de otimização da Extração	46
3.3.1	Ensaio preliminar de eliminação de lenhina e CaCO_3	46
3.3.2	Ensaio de otimização de eliminação de lenhina e carbonato de cálcio	48
3.3.3	Ensaio de acidificação preliminares	50
3.3.4	Ensaio de acidificação (otimização)	52
3.3.5	Balanço geral e conclusões	59
3.4	Alterações no processamento da biomassa	62
3.5	Ensaio piloto	63
3.6	Secagem do PHA extraído	68
4	Conclusão e perspectivas futuras	75
	Bibliografia	79
A	Apêndice A	91
A.1	Ensaio biomassa NOVA ID	92
A.2	Retas de calibração	92

Lista de Figuras

1.1	Capacidade de produção global de biopolímeros (por material) em 2020. polietileno (PE)-polietileno, politereftalato de etileno (PET)-politereftalato de etileno, poliamida (PA)-poliamida, polipropileno (PP)-propileno, furanoato de polietileno (PEF)-furanoato de polietileno, politereftalato de trimetileno (PTT)-politereftalato de trimetileno, tereftalato de polibutileno adipato (PBAT)-tereftalato de polibutileno adipato, polibutileno succinato (PBS)-polibutileno succinato, ácido polilático (PLA)-ácido polilático, PHA-polihidroxialcanoatos. *PEF está ainda em desenvolvimento, prevê-se que a sua comercialização comece em 2023. Adaptado de <i>European Bioplastics, 2020</i> ^[1]	5
1.2	Previsão da capacidade de Produção Global de biopolímeros (por material) em 2025. Adaptado de <i>European Bioplastics, 2020</i> ^[2]	6
1.3	Fórmula geral de um PHA onde o grupo R é designado cadeia lateral e pode conter de 1 até mais de 15 carbonos. <i>n</i> representa o número de átomos de carbono na cadeia linear da unidade monomérica e varia entre 1 e 4. ^[3]	7
1.4	Recuperação média (%) de PHA por diferentes métodos de extração a produções com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. ^[4]	18
1.5	Pureza (%) do PHA extraído por diferentes métodos e produzido com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. ^[4]	18
1.6	Massa molecular média (MDa) do PHA extraído por diferentes métodos e produzido com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. ^[4]	19
1.7	Curva de secagem tipo.	20
2.1	Esquema geral das operações unitárias do processo produtivo executado pela empresa parceira produtora até chegar à Universidade NOVA	27
2.2	Biomassa em pedaços e após moagem do lado esquerdo; <i>close-up</i> sobre fragmentos queimados à direita.	27

3.1	Diferença de comportamento da biomassa quando sujeita a uma lavagem com H ₂ O. Biomassa NOVA (à esquerda a laranja) e de estudo (à direita a azul), dados cedidos pela equipa da NOVA ID.	38
3.2	Biomassa NOVA sujeita a diferentes tipos de inativação acídica e de secagem. No primeiro setor encontram-se as amostras que não foram acidificadas (NA); no segundo, as acidificadas com ácido acético (AA); no terceiro, as acidificadas com ácido sulfúrico (A). .	41
3.3	Biomassa NOVA sujeita a diferentes tipos de secagem e de inativação acídica. No primeiro setor encontram-se as amostras que não foram acidificadas (NA); no segundo, as acidificadas com o ácido acético (AA); no terceiro, as acidificadas com ácido sulfúrico (A). .	43
3.4	Produto de extração proveniente da biomassa de interesse analisado ao microscópio com uma aplicação de 100x, com a presença de filamentos de lenhina destacada.	45
3.5	Biomassa em contacto com H ₂ SO ₄ . Nota para a pinta azul que é apenas uma marca do copo utilizado e não faz parte da amostra em causa.	46
3.6	Ensaio 1: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. As legendas destacadas a cinzento, indicam uma pré-incubação de 2 horas e 4 mL. A indicação "@"traduz uma centrifugação e a descarga subsequente do sobrenadante. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água. As últimas duas amostras apresentadas quantificam duas extrações soxhlet aplicadas à biomassa de estudo	46
3.7	Ensaio 2: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com água.	49
3.8	Ensaio 3: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.	50
3.9	Ensaio 4: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.	51
3.10	Ensaio 5: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.	53
3.11	Ensaio 6: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.	55
3.12	Ensaio 7: Biomassa (IS201105) sujeita a um teste extrativo.	56
3.13	Ensaio 8: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água. A secção à esquerda refere-se aos testes efetuados no primeiro dia e à direita aos do segundo dia.	57

3.14	Análise quantitativa e qualitativa da natureza das amostras e das suas impurezas. No primeiro gráfico está demonstrado o efeito da degradação do processo extrativo desde a biomassa inicial (BI) ao produto da extração (4A). O segundo grafismo permite comparar a composição das amostras; à esquerda está a biomassa inicial; no centro o produto da extração 4 do ensaio 5 (réplica A); à direita uma simulação da extração se metade do polímero inicial não estivesse numa forma solúvel e se mantivesse intacto.	60
3.15	Quantificação do PHA das amostras no sentido de melhorar o processo produtivo.	62
3.16	Reator utilizado para a extração do ensaio piloto. A: motor de agitação; B1-3 válvulas de descarga.	64
3.17	Resultados da análise da natureza de conteúdo e da quantificação de PHA da extração à escala piloto	66
3.18	Resultados da quantificação de PHA da extração à escala piloto e da lavagem das amostras, na Figura identificadas com o sufixo <i>washed</i>	67
3.19	Curva de secagem a 70°C.	69
3.20	Curva de secagem a 70°C.	70
3.21	Curva de secagem a 105°C.	71
3.22	Caracterização do produto de extração (PdE) aplicado no primeiro ensaio de secagem (70°C)	72
3.23	Fotografia das amostras de secagem referente ao ensaio a 105°C. Da esquerda para a direita: Ctr, MW e EtOH	73
A.1	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra.	92
A.2	Resultados do ensaio. Cada condição é identificada por três elementos: o primeiro exprime o tipo de acidificação aplicada (NA-Não Acidificado; A.A.-acidificação com Ácido Acético; A-acidificação com Ácido Sulfúrico); o segundo define o tipo de processamento aplicado à biomassa antes da extração (liof-liofilizada; fresh-fresca; dry-seca); o terceiro expressa o tipo de extração aplicada (Ctr-Sem extração; B-Extração básica com NaOH (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h); Hip-Extração oxidante com hipoclorito de sódio (NaClO 8,97% a 30°C por 3,4 h); Vazio-Lavagem com Água).	92
A.3	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 1.	93
A.4	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 2.	93
A.5	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 3.	93

A.6	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas nos ensaios 1 e no referente à extração à escala piloto.	93
A.7	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 5.	94
A.8	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 6.	94
A.9	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 7.	94
A.10	Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 8.	94
A.11	Reta de calibração aplicadas na quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra de biomassa inicial extraída à escala piloto.	95

Lista de Tabelas

2.1	Listagem das soluções de extração e de lavagem aplicadas	30
3.1	Resultados da análise de massa molecular e polidispersão da biomassa de estudo e NOVA ID	38
3.2	Diferentes tratamentos aplicados a diferentes amostras no ensaio com a biomassa NOVA ID. A numeração corresponde ao gráfico da Figura 3.2	40
3.3	Diferentes tratamentos aplicados a diferentes amostras no ensaio com a biomassa NOVA ID. A numeração corresponde ao gráfico da Figura 3.3	42
3.4	Condições aplicadas no ensaio 1, cujos resultados estão representados na Figura acima (3.6).	47
3.5	Condições aplicadas no ensaio 2, cujos resultados estão representados na Figura acima (3.7).	49
3.6	Sumário das condições aplicadas no ensaio 3, primeiro ensaio preliminar com uma incubação acídica com ácido sulfúrico (ácido sulfúrico (A)).	51
3.7	Condições aplicadas no ensaio 4, segundo ensaio preliminar com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.	52
3.8	Condições aplicadas no ensaio 5, primeiro ensaio de otimização com uma pré-incubação com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.	53
3.9	Condições aplicadas no ensaio 6, terceiro ensaio preliminar com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.	55
3.10	Condições aplicadas no ensaio 8, quarto ensaio de otimização com uma incubação com ácido sulfúrico (A).	58
3.11	Caracterização da natureza do conteúdo das amostras e da simulação (sim) provenientes da análise retratada na Figura 3.14	61
3.12	Processamento efetuado nas amostras analisadas. Secagem pelo parceiro produtor e lavagens NOVA.	63

3.13 Biomassa utilizada no ensaio piloto 64

Acrónimos

UE	União Europeia
ODS	objetivos de desenvolvimento sustentável
PA	poliamida
PE	polietileno
PET	politereftalato de etileno
PLA	ácido polilático
PHA	polihidroxicanoato
PP	polipropileno
PEF	furanoato de polietileno
PTT	politereftalato de trimetileno
PBAT	tereftalato de polibutileno adipato
PBS	polibutileno succinato
PHB	poli-3-hidroxi- <i>n</i> -butirato
PHV	poli-3-hidroxi- <i>n</i> -valerato
PHBV	poli(hidroxi- <i>n</i> -butirato-co- <i>n</i> -valerato)
HB	ácido hidroxi- <i>n</i> -butírico
UV	ultra violeta
HD	hidroxidecanoato
CM	cultura microbiana mista
CP	cultura pura
AGV	ácido gordo volátil
RBS	reator descontínuo (batch) sequencial

COV	composto orgânico volátil
CQO	carência química de oxigênio
ACV	avaliação do ciclo de vida
MCNP	material celular não-PHA
SAB	sistema aquoso bifásico
PEG	polietilenoglicol
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
CG	cromatografia gasosa
AA	ácido acético
BI	biomassa inicial
PdE	produto de extração
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
A	ácido sulfúrico
X	humidade

1

Introdução

Conteúdo

1.1	Contextualização da Dissertação	3
1.2	Bioplásticos	4
1.3	Polihidroxialcanoatos	6
1.4	Motivação e objetivos	22

1.1 Contextualização da Dissertação

Há milénios que o *homo sapiens* recorre a materiais plásticos no seu dia a dia, desde o látex da seringueira, às carapaças de tartarugas e chifres de rinoceronte [5], todos de origem natural e biodegradáveis.

Plásticos são polímeros que se dividem em duas grandes classes: Termoplásticos e termoendurecíveis. Os termoplásticos são moldáveis sempre que são sujeitos a temperaturas elevadas. Já os plásticos termoendurecíveis, depois de moldados criam ligações químicas covalentes ou reticulam de forma permanente tornando-se rígidos e quando sujeitos novamente a altas temperaturas não voltam a ficar num estado moldável.

Em 1907, Baekeland cria o primeiro plástico sintético (termoendurecido), ao reagir fenol com ácido fórmico em condições de pressão e temperatura elevadas, a que chamou baquelite. Cada vez mais tipos de plástico com diferentes características foram produzidos, ganhando um lugar de relevo na economia mundial, substituindo metais, vidro, cartão etc.; em 2019, a produção mundial de plástico situava-se em 368 milhões de toneladas [6]. Este setor tornou-se assim num sucesso sem paralelo na indústria dos materiais, com uma presença ubíqua na face do planeta azul, desde o computador em que escrevo, a micro pipeta do laboratório ou os *pacemakers* que salvam a vida a mais de 600 000 pessoas por ano [5].

Cerca de 99% do plástico produzido provém do petróleo [1] e uma das suas maiores qualidades é também um dos maiores defeitos, a resistência tanto física como à degradação química ou biológica. Estima-se que uma simples garrafa de plástico demore 450 anos para se decompor, logo, praticamente todo o plástico que foi produzido desde Baekeland e que não foi sujeito a combustão ainda existe na face da terra [5].

Esta questão só foi apercebida pela humanidade na década de 1980 e, como solução, implementou-se a reciclagem do plástico, que altera conceptualmente a forma como lidamos com este material. Produzir plástico reciclado requer em média 88% menos energia do que produzir plástico a partir do petróleo, mas ainda assim nos dias de hoje apenas 20% do plástico descartado é efetivamente reciclado levando a que esta problemática tenha vindo a avolumar-se. Por ano, 8 a 12 milhões de toneladas de resíduo plástico tem como destino o Oceano, levando à morte mais de 1 milhão de animais marinhos; se nada se alterar, em 2050 haverá mais plástico nos oceanos do que peixes [5].

A contaminação pelo plástico já chegou também aos humanos, tendo sido identificados microplásticos em fezes pela primeira vez em 2018 e, posteriormente, foram também detetados na placenta de mulheres grávidas, o que terá consequências ainda indeterminadas na saúde humana [5,7]. Estima-se que em média um ser humano consuma por semana uma quantidade de plástico equivalente a um cartão de crédito [5].

Hoje em dia o plano de ação em Portugal para lidar com esta problemática está alinhado com os

restantes estados membros da União Europeia (UE), sendo considerada uma das peças chaves para atingir a neutralidade carbónica e para a transição rumo a uma economia circular, contribuindo para cumprir os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) com o quais se comprometeu no acordo de Paris em 2015 [8].

Em Outubro de 2018, Portugal assinou ainda outro acordo que visa acelerar os objetivos de Paris, o "*The New Plastics Economy Global Commitment*". Este acordo prevê que até 2025 todas as embalagens plásticas colocadas no mercado possam ser facilmente reutilizadas, recicladas ou compostadas [8,9]. A consequência mais visível destes compromissos, até à data, é claramente a lei que entrou em vigor a 1 de Julho de 2021, que restringe o plástico de utilização única [10].

Perante esta pressão na direção de abandonar totalmente o uso do plástico convencional, aliada à dependência simbiótica entre o mundo moderno e este material, o investimento em pesquisas que nos permitam ter alternativas renováveis (bioplásticos) tem aumentado drasticamente nas últimas décadas.

É neste contexto e nesta demanda científica que surge o projeto Europeu no qual este trabalho se inclui. Este projecto tem com objetivo produzir ingredientes funcionais e inovadores a partir de papel e subprodutos agro-alimentares, através de processos biotecnológicos sustentáveis e eficientes.

1.2 Bioplásticos

1.2.1 Porque são relevantes?

Bioplásticos são alternativas aos polímeros tradicionais derivados do petróleo, com as vantagens de serem de base biológica e/ou biodegradáveis. São produzidos a partir de fontes vivas e renováveis e, consoante a sua estrutura química, podem ser biodegradáveis, o que significa que há seres vivos que os podem utilizar como fonte de carbono, metabolizando-o até obter água, dióxido de carbono, metano, nitrato ou amónia [11]. O objetivo destes polímeros é mimetizar os plásticos tradicionais para que os possam substituir eficazmente e nesse sentido conseguiu-se produzir de forma totalmente biológica, entre outros, polietileno (PE), poliamida (PA) e politereftalato de etileno (PET). No entanto, apesar de estes polímeros serem biológicos, a sua estrutura química é exatamente igual ao dos seus parentes derivados do petróleo logo, como supracitado, não são biodegradáveis [12].

O investimento da comunidade científica está focado noutro tipo de biopolímeros, os que são de origem biológica e também biodegradáveis. Estas características combinadas contribuem diretamente para minimizar os problemas com que nos deparamos hoje em dia provenientes dos materiais plásticos, *i.e.*, a pegada de carbono e a acumulação de resíduos. Estes polímeros são especialmente relevantes para substituir o material tradicional em embalagens plásticas, que são praticamente na totalidade de utilização única e que correspondem a cerca de 40% de todo o plástico produzido [9]. No entanto, como

são química e estruturalmente diferentes dos polímeros convencionais, a sua aplicação precisa de ser adaptada consoante o objetivo.

1.2.2 Mercado

De acordo com a "European Bioplastics" [1, 13], das 368 Mton de plástico produzidas em 2019, apenas cerca de 2 correspondem a biopolímeros, pouco mais de 0,5%. Destes, a grande maioria (53%) é utilizada como plástico de embalagem, o que faz sentido pois são embalagens descartáveis e os biopolímeros mais utilizados para este efeito são biodegradáveis/compostáveis. Destacam-se também determinados segmentos que começaram nos últimos anos a utilizar estes polímeros, como a construção civil e a indústria dos transportes.

A indústria do bioplástico ainda é relativamente modesta, mas ainda assim garante 23 000 postos de trabalho na Europa. Por ser um setor muito recente, ainda não há um panorama legal e social que suporte o crescimento que se espera para os próximos anos; caso uma conjuntura favorável seja criada, é expetável que na próxima década o número de trabalhadores desta área aumente acentuadamente, prevendo-se a geração de até 300 000 postos de trabalho qualificado.

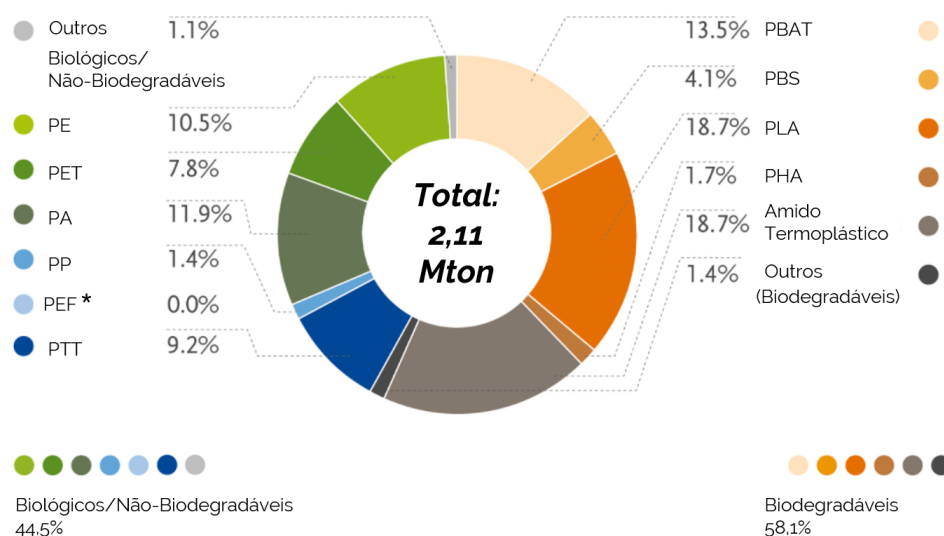


Figura 1.1: Capacidade de produção global de biopolímeros (por material) em 2020. PE-polietileno, PET-politereftalato de etileno, PA-poliamida, polipropileno (PP)-propileno, furanoato de polietileno (PEF)-furanoato de polietileno, politereftalato de trimetileno (PTT)-politereftalato de trimetileno, tereftalato de polibutileno adipato (PBAT)-tereftalato de polibutileno adipato, polibutileno succinato (PBS)-polibutileno succinato, ácido polilático (PLA)-ácido polilático, polihidroxialcanoato (PHA)-polihidroxialcanoatos. *PEF está ainda em desenvolvimento, prevê-se que a sua comercialização comece em 2023. Adaptado de *European Bioplastics*, 2020 [1]

Em primeiro lugar *ex aequo*, como polímeros mais produzidos de 2020 (Figura 1.1), estão os polímeros biodegradáveis à base de amido e o ácido polilático (PLA), confirmando a tendência para

a aposta neste tipo de polímeros ao contrário do que acontecia em anos anteriores, em que o PET, não sendo biodegradável, era o bioplástico mais vendido do mercado [1].

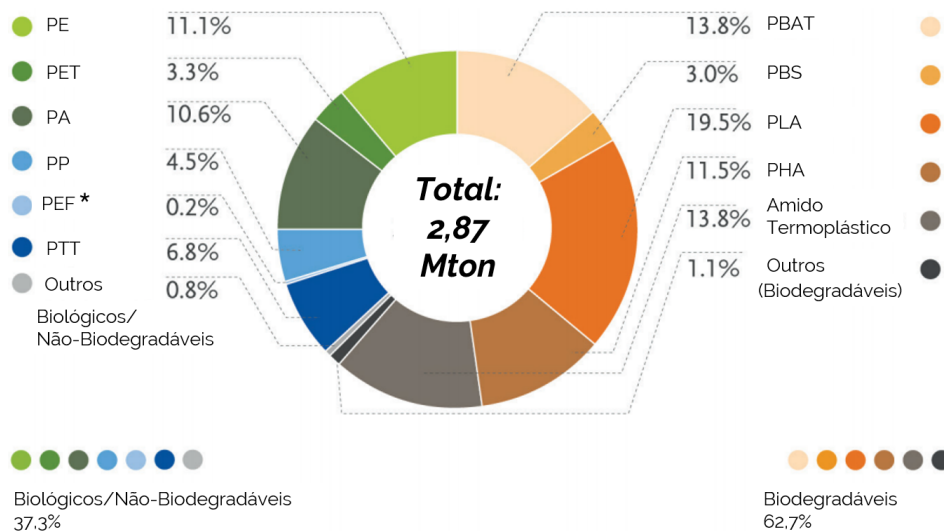


Figura 1.2: Previsão da capacidade de Produção Global de biopolímeros (por material) em 2025. Adaptado de *European Bioplastics*, 2020 [2]

Apesar do PHA ser ainda um dos biopolímeros menos relevantes, será previsivelmente o que mais crescerá nos próximos cinco anos (1.2). A sua produção e extração tem-se desenvolvido muito num passado recente e está pronto para dar um salto produtivo e ganhar relevância comercial. Em termos de capacidade de produção de biopolímeros geral, espera-se que aumente em mais de 35% e ainda assim, será uma contribuição de menos de 1% de todo o plástico produzido. É o início de uma transição que infelizmente ainda ficará aquém para reverter o paradigma da acumulação do plástico num futuro próximo.

1.3 Polihidroxicanoatos

1.3.1 Estrutura, classificação e propriedades

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres que ocorrem naturalmente dentro de alguns microrganismos na forma de inclusões granulares de dimensão até $0,7 \mu\text{m}$, servindo como reserva de energia [14,15]. Foram descobertos pela primeira vez em 1925, na forma de poli-3-hidroxiбутирато (PHB) pelo francês Lemoigne, que observava ao microscópio culturas de *Bacillus megaterium* [16]. O ácido hidroxi-butírico (HB) é o monómero de PHA mais comum, mas para além deste, já foram identificados mais de 150 monómeros de hidroxicanoatos, com massas moleculares entre 1×10^4 e 3×10^6 , produzidos por mais de 300 espécies de bactérias [17]. A estrutura básica geral do polímero está representada na

Figura 1.3 sendo que no caso do PHB, o grupo R corresponde a um grupo metilo.

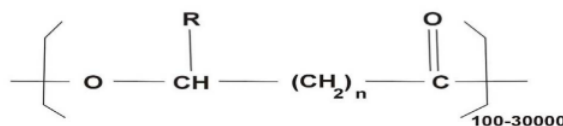


Figura 1.3: Fórmula geral de um PHA onde o grupo R é designado cadeia lateral e pode conter de 1 até mais de 15 carbonos. *n* representa o número de átomos de carbono na cadeia linear da unidade monomérica e varia entre 1 e 4. [3]

A diversidade monomérica, a distribuição de massas moleculares e a microestrutura do polímero contribuem para um largo espectro de propriedades térmicas e mecânicas nos PHAs, conferindo-lhe versatilidade consoante a finalidade desejada [18]. Podem ser utilizados como termoplásticos clássicos, tendo como características mais distintivas em relação aos outros bioplásticos, uma elevada resistência à humidade (incluindo a sua potencial degradação por hidrólise) bem como à radiação (nomeadamente na gama ultra violeta (UV)) e a sua utilização é viável num grande intervalo de temperaturas (*e.g.*, no caso do PHB entre -30 e 120°C) [3,17]. Em termos de propriedades físicas, os PHAs podem ter um comportamento semelhante a alguns plásticos convencionais como o PP e o PE de baixa densidade, é um polímero com muito potencial pela sua adequação a aplicações variadas e bem definidas [18].

Outra grande vantagem que tem garantido aos PHAs investimento, é a facilidade com que se assegura a sua degradação, sendo compostável à escala doméstica e industrial, biodegradável em ambientes de solo e marinhos e susceptível de digestão anaeróbia, pelo que se degrada com facilidade em pântanos, sistemas sépticos ou unidades de tratamento de resíduos sólidos urbanos [3,19].

Os monómeros de PHA são classificados consoante o seu número de átomos de carbono na cadeia lateral (R) da sua unidade monomérica (ver Figura 1.3). Quando têm menos de 6, são designados PHAs de cadeia curta; de 6 a 14 inclusive, PHAs de cadeia média; com 15 ou mais, PHAs de cadeia longa. Em termos de configuração monomérica o polímero pode ser homopolímero, caso os monómeros sejam todos iguais entre si; ou heteropolímero, caso coexistam monómeros diferentes. Os heteropolímeros mais comuns são compostos por apenas dois monómeros diferentes e são designados copolímeros.

As propriedades dos homopolímeros podem variar desde a rigidez termoplástica quando composto por monómeros de cadeia curta até à ductilidade elastomérica quando os monómeros têm cadeia média/longa. Devido a este contraste tão marcado entre as características conferidas por monómeros de cadeia curta e longa, os heteropolímeros podem ser virtualmente feitos à medida com as propriedades desejadas [3,20].

O homopolímero composto exclusivamente por PHB é um termoplástico com propriedades mecânicas semelhantes ao PP; no entanto, tem uma estrutura muito cristalina (até 85%) que o torna frágil e quebradiço por oposição à grande flexibilidade do PP. No caso de um copolímero de PHB e poli-3-

hidroxivalerato (PHV) (cujo grupo R é maior), o designado poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), é possível manter a robustez conferida pelo PHB e reduzir a matriz cristalina do polímero, conferindo-lhe uma maior ductibilidade e resistência [17,21-23].

1.3.2 Aplicações

O PHA pela sua versatilidade, tem um extenso leque de aplicações, desde o embalamento, as indústrias têxtil, química e alimentar, e até o setor dos combustíveis. Pela sua supracitada resistência à humidade, tem sido utilizado sobretudo como material plástico descartável, principalmente para embalamento mas também para outros tipos de objetos (e.g. recipientes, lâminas de barbear descartáveis, fraldas) [24]. Tem ainda potencial para substituir os sacos de plástico, tanto os utilizados nas compras, como os do lixo, que se degradariam numa fase mais a jusante na cadeia de processamento [25].

Ao ser compostável, este material pode ser utilizado para fins agrícolas como encapsulador de sementes ou de fertilizantes de libertação lenta [26]. Na indústria química pode ser utilizado como matéria prima para fabricar géis, latex ou tintas [27]. Os monómeros de PHA podem ainda ser transformados em biocombustíveis através de uma esterificação com metanol [28].

Outras aplicações interessantes deste tipo de polímero são ao nível farmacêutico e médico. Os 3-hidroxialcanoatos são monómeros que estão naturalmente presentes no corpo de animais, incluindo o *homo sapiens*, sendo portanto comprovadamente biocompatíveis, i.e., não produzem qualquer resposta imunitária nem exercem toxicidade no corpo humano. Tal torna este material um ótimo candidato como constituinte de fibras de sutura, pensos, implantes ou próteses [3,29,30]. Tem sido muito estudado também como suporte para engenharia e reparação de tecidos de variadíssimas naturezas [31,32]. Na indústria farmacêutica já estão desenvolvidos métodos que utilizam microesferas de PHA como sistema de transporte e entrega de drogas hidrofílicas, sendo que à medida que a cápsula é degradada, o fármaco é libertado [33].

1.3.3 Produção microbiana de PHAs

1.3.3.A Culturas puras vs. culturas mistas

A indústria biotecnológica estudou extensivamente a produção de PHAs por culturas puras (CPs) testando um variado leque de substratos. Concluiu-se que as características do polímero produzido variam tanto consoante a bactéria que o produz, como com o substrato utilizado [34]. Geralmente os melhores resultados são obtidos com produções *fed-batch*, em que após a cultura atingir elevada densidade celular, são impostas condições de stress, induzindo a acumulação de PHA. Com este tipo de procedimento foi possível obter conteúdos em polímero de até 90% (base seca) [35-38].

Ainda que as vantagens dos biopolímeros sejam claras em relação aos plásticos convencionais,

ainda não são dominantes no mercado devido ao seu custo elevado. Esta inviabilização económica provém de duas raízes distintas: a primeira relacionada com a fermentação, pelo preço da fonte de carbono para as CPs utilizadas e pela necessidade de manter todo o equipamento estéril; a segunda devido à extração, usualmente feita com solventes organoclorados em grandes quantidades (que também implicam um impacto ambiental considerável) [3,39–42]. Atualmente o valor de mercado do PHA varia entre 1,18 e 6,12 €/kg, ainda bastante superior ao preço dos polímeros convencionais que se situam tipicamente na ordem dos centimos de euro/kg [42–44].

Já há mais de 20 anos que a comunidade científica tem procurado várias alternativas que visam atacar estas inconveniências e tornar o PHA um polímero competitivo. Entre as soluções propostas, há culturas geneticamente modificadas de modo a conseguir maior produtividade, utilização de resíduos/ produtos secundários como substrato e utilização de culturas mistas (CMs) ao invés de puras. Hoje em dia a comunidade científica chegou ao consenso de que a opção mais viável, do ponto de vista económico, é recorrendo a CMs cuja fonte de carbono seja um resíduo/produto secundário, que é exatamente o tipo de produção levada a cabo neste projeto [17].

A produção de PHAs com CMs pressupõe que no fermentador, em vez de haver apenas uma estirpe controlada, exista um *cocktail* de microrganismos que se adaptam ao substrato que está a ser introduzido. As bactérias preferidas para integrar esta mistura têm que ter algumas características distintas: elevada velocidade de crescimento e de síntese polimérica, elevada eficiência na conversão de substrato em PHA, grande capacidade de acumulação de polímero, adaptabilidade a sistemas abertos não estéreis e, por último, apresentarem volume celular relativamente grande com parede celular frágil (para facilitar o *downstream*) [42].

Este método de produção pode dividir-se em 3 fases distintas [45] e está baseado em princípios de seleção natural, em que as condições a que os microrganismos são sujeitos, favorecem os que tenham a capacidade de acumular PHA [46].

- **1:** O substrato é fermentado para o enriquecer em ácidos gordos voláteis (AGVs);
- **2:** As estirpes bacterianas que constituirão o *cocktail* são selecionadas em reatores descontínuos (batch) sequenciais (RBSs);
- **3:** A biomassa enriquecida na fase 2 é alimentada com o substrato fermentado no passo 1, em condições ótimas para que se dê a acumulação de PHA.

A **seleção** das culturas é um passo fulcral para uma produção bem sucedida pois, se a CM obtida não apresentar boa capacidade de produção ou se a sua velocidade de crescimento não for tão elevada quanto o esperado, a produtividade volumétrica do sistema fica limitada *a priori* [17,47].

Usualmente esta seleção é feita sob condições aeróbias onde são alternados períodos de abundância e de escassez de substrato. Nos curtos períodos onde existe substrato abundante, as bactérias com

capacidade de produzir PHA formam os grânulos intracelulares de polímero; seguidamente, quando o substrato disponível é fortemente restringido, consomem-nos, ganhando assim uma vantagem competitiva sobre as restantes estirpes que acabam por ser eliminadas à medida que este ciclo de fases contrastantes é repetido [48,49].

Estando a composição da cultura definida, segue-se a **acumulação** de PHA. Nesta etapa, o objetivo é maximizar a acumulação de bioplástico, para que o alto teor polimérico da biomassa fique assegurado. A cultura selecionada é alimentada com AGVs em condições de deficiência nutricional (nomeadamente azoto e fósforo), para que a fonte de carbono seja maioritariamente utilizada para a produção de polímero, ao invés de estimular o crescimento da cultura; a limitação nutricional serve também para prevenir que outros organismos que não tenham capacidade de produzir PHA se tornem prevalentes [50–52]. Esta restrição potencia uma acumulação de polímero que pode ser até 3 vezes superior quando contraposto com uma acumulação em condições de abundância de nutrientes [51,53].

Quando termina a acumulação, a biomassa é separada do caldo e, usualmente, inativada (tipicamente através de uma acidificação). Assim, é inviabilizado o consumo do polímero na ausência de substrato externo por parte das bactérias [45,54].

Apesar de a produção industrial de PHA ainda se basear em CPs, as CMs são um método que conta com variadíssimos casos de sucessos, onde superou todas as expectativas com produtividades e rendimentos (PHA/substrato) elevados, atingindo conteúdos de PHA de quase 90% em base seca o que mostra que consegue ser tão eficaz quanto a produção com CPs [3,55].

Para além disso, oferece inúmeras vantagens que colocam a produção com CMs como provável método dominante na produção de PHAs num futuro próximo:

- O substrato utilizado é muito barato, podendo até tratar-se de um resíduo, o que permite o tratamento de resíduos ao mesmo tempo que acrescenta valor à cadeia produtiva [42];
- Os custos energéticos também são relativamente baixos já que não são necessárias condições assépticas, *i.e.*, o material, o reator e o substrato não necessitam de estar esterilizados [45,54,56];
- O processo tem maior versatilidade ao ter diferentes microrganismos, podendo produzir diferentes tipos de polímero e adaptar-se a alterações na composição da corrente de alimentação (inevitáveis quando é proveniente de resíduos ou materiais de natureza semelhante) [57–59].

No entanto este método também apresenta algumas desvantagens a ter em conta:

- Os valores de densidade celular atingidos com CMs são habitualmente inferiores em uma ordem de grandeza em relação às culturas puras o que se traduz numa inferior produtividade volumétrica [24,45];
- No *downstream*, a extração do polímero de interesse encontra dificuldades acrescidas. As CMs quando comparadas com CPs são mais resistentes à lise celular, apresentam uma matriz extracelular complexa e contêm muitas impurezas que entraram no sistema pela corrente de alimentação (princi-

palmente no caso de esta ser um resíduo/produto secundário) [42];

- Como já foi referido, ao alterar-se a composição do substrato, a constituição do polímero produzido também varia, o que compromete a reprodutibilidade do processo. Esta variabilidade pode trazer consequências nefastas em termos comerciais, dado que os parceiros a jusante na cadeia de valor podem considerar o fornecedor em causa como pouco fiável [60];

- Usualmente, a produção com CM é favorecida quando o substrato provém de um resíduo. Caso seja essa a situação, o polímero obtido não deve ser utilizado para fins medicinais pois pode ter contaminantes tóxicos [61,62]. Esta inconveniência pode ser eliminada com lavagens posteriores do polímero que garantam a sua qualidade final, implicando um custo acrescido [34].

1.3.3.B Produção com resíduos da indústria do papel

No projeto em que este trabalho se inclui, a biomassa é produzida recorrendo a águas residuais da indústria papelreira. Este substrato é de fácil acesso, abundante e com provas dadas na produção de PHA. Segundo Jiang et al. [63], é possível produzir biomassa com conteúdo de PHA máximo de 77% do qual cerca de 14% (percentagem molar) corresponde a PHV e o restante a PHB.

Apesar destes indicadores positivos, é um método que acarreta algumas dificuldades a nível industrial que necessitam de ser contornadas e não é ainda uma estratégia produtiva rentável [64]. O enriquecimento em AGVs deve ser realizado em modo contínuo para melhor se integrar no processo produtivo geral, o que prejudica a eficiência da fermentação [63,65]. Para o passo seguinte de produção do polímero, a alimentação do substrato pode ser feita de duas formas: filtrando previamente o caldo de fermentação para retirar a biomassa produzida na etapa de produção de AGVs; ou alimentando o substrato contendo esta biomassa. Caso se opte pela primeira alternativa, o custo desta etapa aumenta consideravelmente; caso se opte pela última, simplifica-se o processo mas terá como consequência uma eventual diluição do conteúdo de PHA após o término da fase de acumulação. Esta inconveniência poderia ser contornada ao utilizar um biorreator de membranas que permite uma fermentação em modo contínuo em que o produto da fermentação está livre de biomassa [63].

O substrato proveniente de um efluente da indústria papelreira é, não raras vezes, rico em carbonato de cálcio, que precipita acumulando-se nos sensores (*e.g.* elétrodos de pH e de oxigénio dissolvido) danificando-os, podendo levar a distúrbios nas leituras e consequentemente no controlo da produção. A presença destes precipitados também dificulta o *downstream*.

Por último, a maior limitação da utilização deste tipo de substrato prende-se com a transferência de oxigénio que é, frequentemente, fator limitante para a produtividade do processo [63]. Durante a fase de abundância de fonte de carbono, o oxigénio é rapidamente consumido, chegando a um valor basal determinado pela capacidade de oxigenação do sistema que, em última instância, determina a produtividade final.

A Indústria do papel é bastante relevante em Portugal sendo responsável por mais de 5% de todas as exportações de mercadorias e bens e garante mais de 3000 postos de trabalho diretos [66].

Em termos de consumo de água, é uma indústria com impactos expressivos, gastando até 230 m³ de água por tonelada de papel produzida [67] gerando correntes efluentes consideráveis cuja composição varia consoante o processo e o tipo de madeira utilizados. Para produzir papel é necessário separar as fibras constituintes da madeira, etapa esta designada polpação, sendo o processo *Kraft* utilizado em quase todas as fábricas para atingir este fim [68]. Para otimizar a extração de PHA no final do processo alimentado com estes efluentes, é necessário prever que tipo de impurezas estarão presentes, sendo que algumas, provenientes diretamente da água residual, se mantêm inalteradas ao longo das várias etapas. Os efluentes provêm de distintas fases do processo produtivo abordadas aqui brevemente [67,69].

- **Preparação da madeira:** Terra, cascas e outras sujidades são removidas e a madeira é triturada.
- **Polpação química:** As aparas são cozidas numa solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S); o efluente gerado tem pH elevado e contém lenhina, celulose/hemicelulose, resinas, ácidos gordos, matéria orgânica, compostos halogenados e compostos orgânicos voláteis (COVs) (e.g. alcoóis, acetona, clorofórmio)
- **Lavagem da polpa:** A polpa é lavada múltiplas vezes, a água residual resultante tem ainda características alcalinas e alguma matéria orgânica.
- **Lixiviação da polpa:** Quando a polpa chega a esta fase, contém ainda cerca de 5% de lenhina que é então removida. O efluente gerado apresenta lenhina, carboidratos, matéria orgânica, compostos clorados (orgânicos e inorgânicos) e COVs.

Parte destes resíduos podem ser recolhidos e fermentados com o intuito de enriquecer em AGVs sendo que à chegada ao reator, os compostos orgânicos mais abundantes são o lactato, acetato e glucose que constituem cerca de 30% da carência química de oxigénio (CQO) total [63]. Após a fermentação, o efluente acidificado está enriquecido principalmente em butirato, acetato, propionato e etanol, verificando-se também a presença de outros AGVs minoritários como o succinato, formato e valerato. Passam a representar 60% de toda a CQO solúvel [63,65].

É importante realçar que do efluente inicial, a lenhina não sofre qualquer alteração na etapa de fermentação e, na fase seguinte, também não será degradada pelos microrganismos produtores de PHA. É então de esperar que seja uma impureza maioritária que se mantêm no sistema até à fase do *downstream*.

1.3.4 Recuperação de PHA do caldo de produção

1.3.4.A Processos convencionais

Ao contrário da produção que já foi extensivamente estudada, a extração de PHA do caldo de produção está entre um dos aspetos menos investigados mas com maior impacto no custo final do polímero e nas consequências ambientais do processo. Estudos de avaliação do ciclo de vida (ACV) comparando a pegada de carbono do PHA e de plásticos tradicionais, concluíram que o bioplástico era menos ecológico, mesmo sendo biodegradável e de base biológica; tal deve-se principalmente ao elevado consumo energético do processo, especialmente na fase de *downstream* [44,62,70]. Quando o método de produção recorre a CMs ao invés de CPs, o peso da ineficiência da extração é exacerbado pois, para além de se ter reduzido marcadamente o custo de produção, o custo nominal da extração também aumenta, já que a matriz que envolve o polímero é mais complexa e tanto a concentração de polímero como o conteúdo em PHA são substancialmente menores, fatores estes que dificultam a extração [71].

O *downstream* do PHA é um processo complexo (independentemente da estratégia produtiva) constituído por várias operações unitárias: primeiro, separa-se a biomassa do caldo de fermentação (*e.g.* filtração, centrifugação); segue-se um pré-tratamento que visa facilitar a lise celular (*e.g.* tensoativos, bases, ácidos); por fim procede-se à extração e purificação dos grânulos poliméricos [44].

Para esta última etapa, existem duas estratégias principais: efectuando uma extracção direta com um solvente que dissolve o polímero seletivamente; rompendo as células e solubilizando a camada lípido-proteica que envolve os grânulos, *i.e.* dissolução do material celular não-PHA (MCNP) [72].

A extração direta com solventes é a metodologia mais usada no que toca ao *downstream* do PHA. A viabilidade deste método depende de diversas variáveis, sendo as mais relevantes o rendimento na recuperação de PHA e a facilidade de recuperação/reutilização do solvente [73]. Outro aspeto a ter em conta é a solubilidade do polímero. A maior parte dos PHAs de cadeia curta, como o PHB, cristalizam com facilidade, adquirindo uma estrutura e propriedades que não podem ser previstas com exatidão pela sua composição química, índices de solubilidade, constantes dielétricas, etc. [61,74]. Esta situação faz com que o comportamento de solubilização do polímero seja difícil de prever, não se podendo aplicar diretamente a máxima de que solventes de natureza semelhante à do polímero são adequados [75].

Para aplicação deste método de solubilização do bioplástico, advém a necessidade de uma secagem prévia. Este passo pode ser concretizado através de liofilização ou secagem térmica. A secagem térmica pode causar degradação polimérica, mas é muito mais barata que a liofilização pelo que, para aplicação a nível industrial, é a estratégia preferida [76].

A extração com solventes é um método que se pode dividir em dois passos: um primeiro onde a permeabilidade do invólucro celular é alterada permitindo a solubilização do polímero; um segundo

passo de precipitação para recuperar o plástico do solvente, normalmente induzida pela adição de um álcool (e.g. metanol, etanol) [77,78].

Os solventes que recolhem seletivamente o PHA, usualmente clorados (e.g. clorofórmio, diclorometano), permitem atingir rendimentos de extração e pureza muito elevados, sem provocar danos relevantes no polímero. Para polímeros cuja finalidade requer níveis de segurança elevados têm ainda a vantagem de retirar as endotoxinas bacterianas. No entanto são, na sua maioria, fluídos muito poluentes, voláteis e tóxicos, o que dificulta a sua utilização em larga escala tanto mais que envolvem riscos de incêndio e explosão no seu manuseamento. Outra desvantagem prende-se com o facto de, em soluções poliméricas em que a concentração de PHB excede os 5% (m/v), a viscosidade aumenta de tal maneira que interfere com a remoção das impurezas. São processos muito dispendiosos pois, para além de os solventes serem muito caros e utilizados em grande quantidade (num rácio de até 1:20 para com a biomassa), também exigem um gasto de energia elevado para a secagem prévia e para a recuperação do solvente por destilação [61,77,79-83]. Por último lugar, devido à afinidade entre o solvente e o PHA, o polímero final tem sempre vestígios do solvente, o que pode implicar limitações no processamento subsequente do polímero ou mesmo na utilização final, caso o solvente seja tóxico [4].

Já o método de extração cuja estratégia assenta na lise celular e dissolução do MCNP, tem duas variantes distintas, digestão química e enzimática sendo que a digestão química tem sido preferida ubiquidade e baixo custo dos reagentes [72]. Estes processos são constituídos por várias fases: começam com a adição de um reagente à biomassa enriquecida que solubiliza o MCNP, segue-se a separação do polímero purificado sólido da solução e, por fim, é necessário tratar o efluente gerado [4].

Para o método da digestão química, os reagentes mais utilizados são o hipoclorito de sódio e um tensioativo em combinação. Quando se usa apenas hipoclorito, o polímero é degradado atingindo massas moleculares até 50% inferiores às iniciais; quando se empregam apenas tensioativos, a pureza reduz-se substancialmente mas a degradação do polímero é insignificante [72,82,84-86]. O objetivo é encontrar um equilíbrio no que toca aos reagentes aplicados otimizando o processo, para que o plástico obtido tenha a resistentência e pureza adequadas à finalidade designada.

Este tipo de processo resultou numa redução do custo em 50%, em comparação à extração com solventes; no entanto gera um efluente contaminado com tensioativos muito difícil de tratar [77,82].

A recuperação por digestão enzimática acarreta tipicamente um pré-tratamento térmico e uma lavagem final com tensioativos [87]. Vários tipos de enzimas já foram testados sendo as proteases as mais promissoras [88]. É um método exclusivamente de lise celular, sendo depois necessário aplicar um tratamento complementar para purificar o PHA. É uma técnica de lise atrativa pois pode ser utilizada em condições suaves que não danificam o polímero, no entanto, o custo elevado das enzimas aliado às complexidades complementares do processo fazem com que seja uma técnica preterida [89].

Os métodos de solubilização do MCNP têm também algumas desvantagens a ter em conta, principalmente a nível de pureza. Como a eficiência nunca chega a 100%, e é tipicamente mais baixa do que a da extração com solventes, há sempre constituintes solúveis da biomassa que se mantêm no produto final, facto especialmente relevante quando se tratam de endotoxinas que podem trazer malefícios para o utilizador. Esta questão inviabiliza os produtos extraídos através destes métodos para fins biomédicos.

Apesar de as necessidades energéticas destes processos serem bastante inferiores aos métodos convencionais, o consumo de reagentes/solventes é igual ou superior, aspeto que pode ser revisto ao aplicar técnicas de recuperação de solvente mas que implicariam um acréscimo sobre os gastos energéticos [4].

Existem ainda novos métodos de extração que podem ser adaptados aos PHAs, recorrendo a fluídos supercríticos ou através de sistemas aquosos bifásicos (SABs) que têm tido resultados bastante positivos tanto a nível económico como ambiental.

A extração com fluídos supercríticos tem ganho visibilidade na indústria como método alternativo para a extração de solutos apolares [90–92]. É um método barato, pouco poluente, rápido e simples o que o torna bastante apetecível; para além disso envolve fluídos com propriedades únicas como a conjugação de uma elevada densidade com baixa viscosidade, toxicidade e reatividade [72,92]. Dadas estas vantagens, é uma técnica que tem sido aplicada a muitos materiais apolares, e o PHA não é excepção.

Khosravi-Darani et al. [93] levaram a cabo vários testes concluindo que a aplicação do fluído supercrítico (no caso CO₂) combinada com um pré-tratamento que facilite a lise celular e/ou a purificação (tolueno e hidróxido de sódio), possibilitava a recuperação de 81% do polímero.

A técnica de SABs funciona quando se colocam duas fases aquosas imiscíveis em contacto e o soluto que se quer extrair migra para a fase contrária às impurezas, sendo tipicamente utilizada como operação unitária do processo de extração [94]. Quando aplicada ao PHA (produzido com CPs) recorrendo a uma fase salina de polietilenoglicol (PEG) 8000, alcançou uma notável pureza de 97%. Apesar de ser uma técnica rápida barata e com baixa toxicidade ambiental, acarreta problemas de reproductibilidade e robustez pelo que ainda carece de estudo a nível laboratorial para que possa ser considerada como uma alternativa viável [94–96].

1.3.4.B Extração com processos ecológicos/verdes

Dado o esforço conjunto feito pela comunidade científica para minimizar os impactos ambientais de todo o processo produtivo do PHA, a extração tem vindo a ser otimizada quando aplicada a uma produção com CMs.

Os processos que se baseiam na digestão do MCNPs têm mostrado desempenhos superiores, tanto a nível ambiental como económicos, quando comparados com os métodos de extração com solventes [44]. Considerando que já há registo de níveis de acumulação de polímero que excedem os 70 ou até 80% em base seca, faz todo o sentido focar a remoção apenas na pequena fração de material não polimérico, libertando os grânulos deste; ao invés da extração da grande massa de PHA.

A matéria que se pretende digerir é composta por biomoléculas de diferentes naturezas, o que dificulta o processo, designadamente péptidos, lípidos (principalmente fosfolípidos), peptidoglicano, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN) [15]. Estes compostos são solubilizados pelos agentes empregados libertando os grânulos de PHA que são posteriormente separados da solução de impurezas por filtração, centrifugação ou flotação com floculação [88,97,98]. No entanto, como os grânulos de PHA são estabilizados por uma membrana constituída por lípidos e proteínas, a dissolução não seletiva desta pode perturbar a organização cristalina do polímero tornando-o vulnerável aos agentes digestores [81,99].

Neste tipo de *downstream*, o fator determinante é o conteúdo de PHA da biomassa inicial. Estima-se que, para que o processo seja rentável, o conteúdo polimérico deve ser superior a 60% [100]. Caso o conteúdo seja substancialmente inferior, a separação complica-se resultando em graus de recuperação e de pureza inferiores, bem como num polímero degradado [39,61,101].

Os outros métodos promissores referidos (ver 1.3.4.A), ainda não estão suficientemente desenvolvidos para permitirem aplicar *scale-up* com facilidade restando, então, a adaptação dos métodos de digestão química.

Em termos de impactos ambientais, a literatura indica emissões de CO₂ a variar entre 0,81 e 6,27 kg/kg de PHA por oposição aos 3,93 - 28,71 kg/kg de PHA gerados pela extração com solventes. Os custos de extração aplicando este tipo de técnicas também é chamativo, variando entre 0,24 e 6,61 €/kg de PHA [44,102-104].

A digestão química amiga do ambiente pode ser aplicada com recurso a reagentes que podem ser classificados em três categorias: oxidantes, ácidos e bases.

Após ser sujeito a oxidação, a maior parte do material não-PHA é solubilizado em água. É uma das metodologias mais utilizadas neste tipo de extração [4], sendo o NaClO o agente oxidante mais utilizado. No entanto, é um método que, para conseguir elevada pureza (>97%), requer grandes quantidades de reagente (num rácio superior a 5:1) e que degrada drasticamente o polímero, o que é revelado em análises de polidispersão e massa molecular [72,79,81,105,106]. Esta degradação não pode ser minimizada pela optimização do tempo de contacto, depende apenas da temperatura e da concentração dos reagentes. Ao contrário da maior parte dos agentes empregados na digestão, a sua utilização é favorecida a baixas temperaturas verificando-se maior recuperação e menor degradação. Esta é uma vantagem considerável pois pode ser manuseado à temperatura ambiente com bons resultados o que

simplifica o processo e diminui os custos energéticos associados [107]. É importante também referir que é impossível remover todos os vestígios de hipoclorito do produto final para além de haver possibilidade de formação de compostos halogenados, o que restringe a aplicação do material [61].

A digestão por aplicação de ácidos, induz a saponificação dos lípidos presentes nas várias barreiras lipídicas celulares, desde a parede ao invólucro dos grânulos de PHA [46]. Este efeito aumenta a permeabilidade das membranas permitindo a solubilização do restante MCNP.

Os ácidos mais utilizados para este fim são o sulfúrico (H_2SO_4) e o clorídrico (HCl), tendo-se obtido resultados bastante positivos em termos de recuperação e pureza mas com degradação acentuada do polímero [81]. Esta técnica é, no entanto, vista como uma fraca opção para utilização industrial devido ao poder corrosivo e tóxico destes ácidos que têm que ser manuseados na forma concentrada bem como pela necessidade de utilização de elevadas temperaturas [81,102].

O efeito da aplicação de reagentes alcalinos é semelhante ao dos ácidos, induzindo a saponificação das frações celulares lipídicas [45,46]. Para este tipo de digestão, os reagentes mais utilizados são o NaOH e o NH_4OH . Em geral o hidróxido de sódio tem melhor desempenho, com maior recuperação de PHA, pureza e massa molecular, mas resultando num índice de polidispersão maior (maior variedade no comprimento dos polímeros, indicativa de uma degradação diferencial) [70,108]. Ainda assim, para ambos os reagentes, a degradação do polímero é considerável pois a base aplicada hidrolisa o PHA, situação esta que pode ser minimizada se for possível preservar a estrutura cristalina dos grânulos intracelulares. Tal pode ser alcançado com um pré tratamento com tensoativos (destabilizam a membrana que envolve o grânulo polimérico sem comprometer a estrutura cristalina) ou por liofilização.

Comparando diretamente a soda cáustica com o hipoclorito de sódio (reagente mais utilizado na digestão da MCNPs), conclui-se que geralmente o hipoclorito é mais eficaz e o polímero obtido apresenta melhores propriedades [107,109].

A aplicação destes métodos de recuperação polimérica pode ter resultados contrastantes para diferentes substratos e CMs, pois depende de variadíssimos fatores:

- As estirpes produtoras dominantes (diferente constituição do MCNP)
- Tipo de PHA
- Conteúdo das células em PHA
- Qualidade polimérica requerida (tanto em termos de pureza como de massa molecular/índice de polidispersão)

Pagliano et. al. [4], reuniram um conjunto de resultados comparando as várias técnicas de digestão química e também de extração com tensoativos (técnica que neste capítulo não foi considerada pelos

impactos ambientais supracitados), que são apresentados, a título exemplificativo, nas Figuras 1.4 a 1.6.

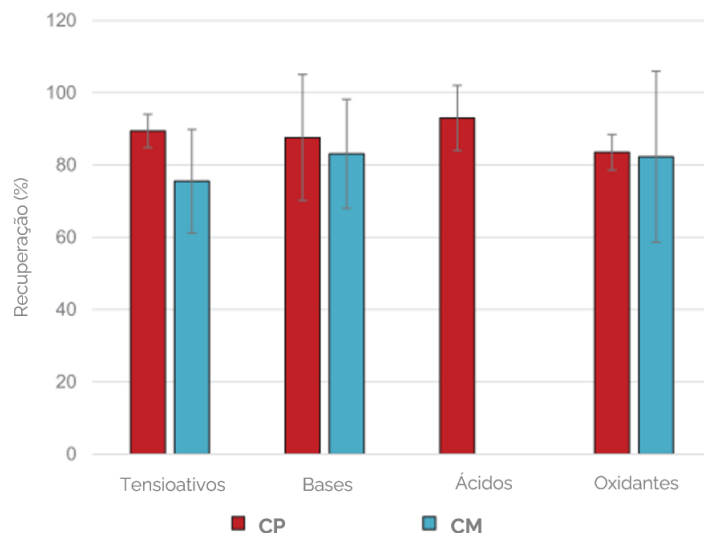


Figura 1.4: Recuperação média (%) de PHA por diferentes métodos de extração a produções com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. [4].

Da Figura 1.4, é possível concluir que a recuperação polimérica pelos diferentes métodos tem uma eficiência similar, tanto para CPs como para CMs, sugerindo que, no que toca à recuperação, qualquer tipo de digestão química é igualmente bem sucedido. Esta recuperação é até superior em relação às obtidas na extração com solventes. Neste compêndio não estão considerados dados de estudos sobre digestão ácida em CMs mas o tipo de comportamento da biomassa, entre tipos de cultura, seria presumivelmente semelhante ao que acontece na digestão básica.

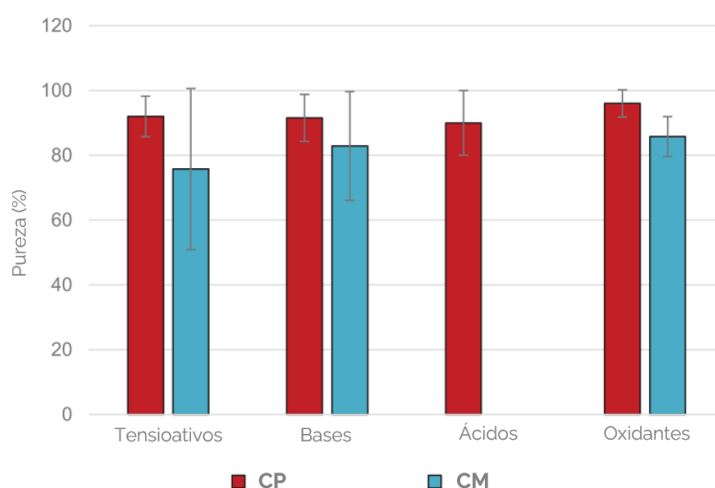


Figura 1.5: Pureza (%) do PHA extraído por diferentes métodos e produzido com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. [4].

Quanto à pureza (Figura 1.5) volta a não haver nenhum tipo de digestão que se destaque. No entanto aqui a diferença entre as culturas puras e mistas é mais acentuada o que se explica pela natureza mais complexa das impurezas, facto este que dificulta a optimização da extração. Ainda assim a pureza final é relativamente elevada, sendo resultados indicativos de que é uma estratégia de extração viável para aplicação à escala industrial.

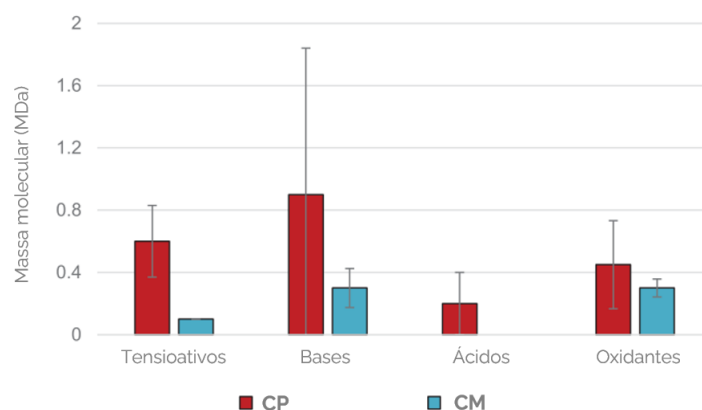


Figura 1.6: Massa molecular média (MDa) do PHA extraído por diferentes métodos e produzido com culturas puras (CP) e mistas (CM), adaptado de Pagliano et. al. [4].

É sabido *a priori* que estas metodologias são quimicamente agressivas provocando deterioração polimérica. Esta degradação é sempre bastante superior no caso da biomassa mista (Figura 1.6) o que confirma a maior resistência das membranas e implica uma necessidade de utilizar condições mais agressivas e, conseqüentemente, mais danosas para o polímero. Este diferencial no que toca à resistência diminui quando é aplicado um oxidante forte, obtendo-se então massas moleculares reduzidas mas semelhantes para ambos os tipos de cultura.

Este parâmetro é determinante na qualidade do polímero e é crucial na aplicabilidade do plástico podendo ser limitante caso as condições não estejam bem otimizadas. De notar ainda que a degradação em extração direta com solventes é insignificante conseguindo-se obter massas moleculares entre 0,8 e 0,9 MDa.

1.3.5 Secagem térmica de PHA

O processo da secagem consiste na eliminação de uma quantidade relativamente pequena de líquido, tipicamente água, presente num material sólido.

Na fase final da extração de PHA é necessário um passo de secagem para facilitar e o manuseamento e o processamento subsequente do produto, melhorar a conservação e o armazenamento e, em alguns casos, reduzir o custo de transporte.

É uma operação complexa porque envolve a interação gás-líquido, controlada por fenómenos de

transferência de calor e de massa em estado transiente. Estes fenômenos ocorrem simultaneamente com processos cinéticos, que produzem alterações físicas, como o encolhimento do sólido, e químicas/bioquímicas, que podem produzir alterações em outras propriedades (e.g. cor, textura, odor).

Todos os procedimentos de secagem aplicados durante o processo em que este trabalho se inclui foram realizados em tabuleiros numa estufa com serpentinas aquecidas e paredes refratárias. Neste tipo de secagem é preciso que haja uma pequena quantidade de ar em movimento para arrastar o vapor que se vai formando impedindo que condense e reumidifique o sólido. Caso o vapor seja constituído por um solvente que não a água, ou no caso de secagem sob vácuo, é necessária a instalação de um equipamento de condensação à saída do gás para recuperar a maior parte do solvente e purificar o ar que será libertado para a atmosfera.

A força motriz do processo advém da humidade (X) contida no sólido que exerce uma pressão de vapor. O sólido em causa vai secando até que a pressão parcial do vapor no gás iguale a pressão de saturação do vapor presente no sólido, atingindo-se o equilíbrio numa certa humidade final (X_f). Esta humidade final do sólido representa a humidade mínima que se pode atingir para as condições de temperatura e humidade do gás utilizado; já a velocidade com que se atinge esta humidade depende também do caudal do gás de secagem, da área de superfície exposta e da pressão de operação.

O comportamento de um sólido durante a sua secagem, para uma determinada condição de temperatura e humidade absoluta do gás de secagem é descrito por uma curva de secagem como a dada na Figura 1.7.

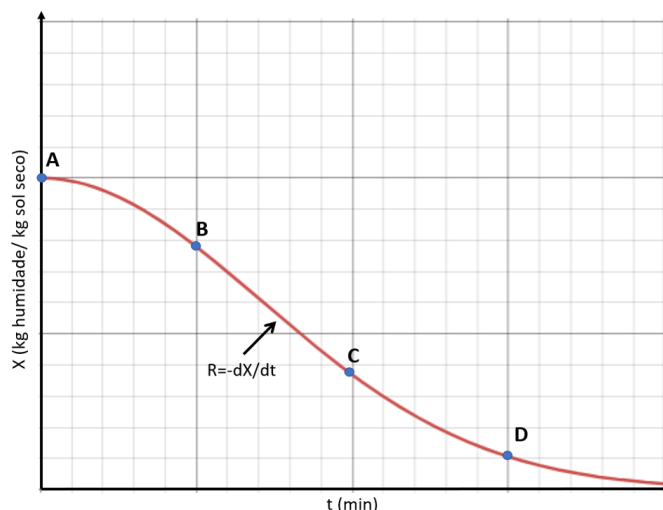


Figura 1.7: Curva de secagem tipo.

O período inicial, representado pelo segmento \overline{AB} , é relativamente curto e representa o período de adaptação durante o qual a temperatura do sólido aumenta ajustando-se às condições de secagem. No

segmento \overline{BC} , a velocidade da secagem é constante ($d^2X/dt^2=0$) e igual ao parâmetro R representado na Figura 1.7. Nesta secção, o sólido tem uma humidade tal que se forma um filme adsorvido na superfície que vai evaporando, o líquido comporta-se como se o sólido não existisse. Se o sólido for poroso, o líquido vai subindo capilarmente alimentando o filme, caso não o seja esta secção é mais rápida e é evaporada apenas a fração que esteja à superfície.

No ponto C da Figura 1.7, é atingida a humidade crítica (X_c) do sólido, um parâmetro característico das condições operatórias aplicadas. Depois de se atingir esta humidade, a velocidade de secagem passa a ser decrescente ($d^2X/dt^2 > 0$). Caso o perfil da secagem mostre que a velocidade de secagem é sempre decrescente então é porque o valor de X inicial é já inferior a X_c . Este valor atinge-se (para um sólido poroso), quando o fluxo de líquido do interior do sólido para a superfície deixa de conseguir igualar a velocidade de evaporação quebrando a camada contínua; a partir deste momento, o fator que limita a velocidade de secagem passa a ser a resistência à transferência de massa neste percurso do líquido no interior poroso do sólido.

Os PHAs são termoplásticos, no entanto, têm uma baixa resistência térmica. Esta característica traz limitações a diferentes fases do processo para além da secagem (da biomassa após a fase de acumulação e antes da extração e do produto final recuperado), designadamente no processamento do polímero purificado, dificultando a expansão da expressão deste polímero nos mercados [110]. Esta questão é especialmente limitante nesta última fase do processo, visto que o ponto de fusão é muito elevado, por vezes até superior à temperatura de degradação, tal devendo-se à coesa estrutura cristalina do polímero. Mesmo quando se trata de um co-polímero, como o PHBV, onde se esperaria que a introdução de monómeros diferentes perturbasse a cristalinidade, verificou-se um surpreendente isomorfismo entre as diferentes unidades que teve como consequência uma estrutura cristalina forte mas ainda assim de coesão inferior à do PHB. Quanto maior for a coesão da estrutura cristalina, maior será a resistência à degradação térmica e mais elevado será o ponto de fusão [111-114].

Chen et. al. [114] reportaram uma série de ensaios onde observaram a degradação de PHB e PHBV (5%(m/m) PHV) através de uma análise de massa molecular e de polidispersão, quando sujeitos a diferentes tratamentos térmicos em que variaram a temperatura e o tempo.

O comportamento foi muito diferente entre o polímero e o co-polímero. Para o PHB, a degradação é insignificante (inferior a 6% em termos de massa molecular) até aos 100°C; aos 130°C, após um tratamento térmico rápido de 10 minutos, o polímero manteve-se estável; quando se prolongou o tratamento para 30 minutos a redução da massa molecular atingiu mais de 40%. A partir daí, existiu sempre degradação que é tanto maior quanto maior foi o tempo do tratamento.

Já para o PHBV, independentemente da temperatura, quanto maior o tempo de tratamento, maior foi a degradação. Também se verificou maior sensibilidade a temperaturas relativamente baixas, e.g. a 100°C verificou-se uma degradação da massa molecular em cerca de 10% depois de 1 hora e de 20%

depois de 6 horas. Este comportamento acentuou-se para temperaturas mais elevadas.

Para minimizar esta limitação, já foram testadas várias estratégias como a formação de misturas poliméricas ou misturas com outros materiais, entre outros, nanopartículas e *organoclays*. No entanto, são estratégias aplicáveis apenas na fase de processamento do polímero purificado pelo que, para as eventuais secagens feitas no *down* e /ou *upstream*, continua a ser inevitável ter em consideração esta característica [115,116].

1.4 Motivação e objetivos

A nível industrial, o paradigma em vigor ainda inclui um *upstream* com culturas puras e um *downstream* com solventes (maioritariamente clorados).

No entanto, a estratégia produtiva com culturas mistas e cujo substrato é composto por materiais residuais, já está bem estabelecida e é, indubitavelmente o futuro na produção de PHAs pois permite o tratamento dos resíduos ao mesmo tempo que acrescenta à cadeia produtiva. Seria ainda interessante continuar o estudo extensivo da fase de acumulação, de como os vários parâmetros envolvidos influenciam a quantidade e, sobretudo, a qualidade do polímero. Para este fim, podem aplicar-se as técnicas mais recentes, cada vez mais evoluídas e fiáveis, de monitorização *online* e *in situ* que têm o potencial de revelar novos dados que nos ajudem a entender mais a fundo os mecanismos bioquímicos que regulam e influenciam a acumulação polimérica intracelular. Depois de atingir um maior nível de compreensão, será possível melhor controlar e garantir a reproductibilidade da produção, podendo o potencial fornecedor produzir a preços competitivos, ganhando simultaneamente um *status* de confiabilidade, essencial para que o material em si tenha sucesso no mercado.

Já na extração, métodos que permitam o *scale-up* e que sejam simultaneamente pouco poluentes ainda estão por aperfeiçoar, mas tem havido um esforço conjunto por parte da comunidade científica neste aspeto, é apenas uma questão de tempo até que se obtenham estratégias optimizadas que permitam extrair polímero produzido por biomassa mista com substratos residuais. Quando tal for uma realidade, existirão condições para estabelecer um novo paradigma e tornar os PHAs polímeros competitivos, com uma grande expansão na quota do mercado que ocupam.

Este trabalho está inserido num projeto Europeu, iniciativa com diversas vertentes onde o objetivo comum é acelerar a transição para uma economia circular na UE estabelecendo bases científicas que permitam, nomeadamente no contexto das indústrias papelarias e agroalimentar. A participação da equipa do BIOENG tem como objetivo (primeiro a nível laboratorial e depois à escala piloto) desenvolver um processo de extração do polímero com recurso a reagentes ecológicos. A montante, a biomassa é produzida em Itália pelo parceiro produtivo através dum processo em que o substrato provém de águas residuais da indústria papelaria e a cultura é mista; o polímero extraído segue para o parceiro a

jusante em Espanha, onde é processado, originando um filme plástico que se destina à produção de *bag-in-boxes*.

O nosso objetivo foi otimizar no laboratório a extração, ensaio após ensaio, de forma a que o *scale-up* fosse viável e, por fim, confirmar esses resultados à escala piloto.

Para cumprir o objetivo foi necessário primeiramente estudar e caracterizar a biomassa de interesse (secção 3.1). Depois, fizeram-se alguns testes de extração preliminares de carácter exploratório que analisam a resposta do polímero e das impurezas a variadas estratégias de extração. Nesta fase, descrita na secção 3.2, foram também identificadas as impurezas maioritárias. Seguidamente, nos sub-capítulos 3.3.1 e 3.3.2 testaram-se diferentes métodos de extração assentes em sólidas bases teóricas com o objetivo de remover especificamente as impurezas resistentes às soluções de extração anteriormente aplicadas. Por fim, a estratégia que apresentou melhores resultados foi alterada e otimizada para simultaneamente ser eficaz na remoção das impurezas mas também viabilizar um aumento de escala com boas perspetivas de aplicação ao nível industrial (3.3.3 e 3.3.4).

De forma paralela à optimização da extração procedeu-se ainda à tentativa da optimização da produção colaborando com a parceira produtora (3.4) e também se aplicou uma extração à escala piloto (3.5).

Por fim, na secção 3.6 fizeram-se ainda ensaios preliminares para estudar a secagem do produto de extração para que o PHA possa ser processado e incorporado num produto.

2

Materials e Métodos

Conteúdo

2.1	Processo e biomassa de estudo	27
2.2	Moagem	28
2.3	Estudo das consequências do processamento pós-produção	28
2.4	Extração laboratorial	29
2.5	Extração piloto	30
2.6	Secagem	31
2.7	Quantificação e caracterização do PHA	32

2.1 Processo e biomassa de estudo

O processo produtivo (2.1) foi executado com base nas técnicas expostas com maior detalhe no capítulo 1. A produção da biomassa é assegurada por uma parceira italiana, que utilizou uma fração de um efluente da indústria papelreira como substrato.

O primeiro passo consistiria na fermentação do efluente (acidificação do substrato), para concretizar o enriquecimento em ácidos gordos voláteis (AGVs) que constituem o substrato da cultura microbiana mista (CM) presente no biorreator de acumulação, no entanto, este passo foi dispensado pelo parceiro produtor e o efluente foi alimentado diretamente.



Figura 2.1: Esquema geral das operações unitárias do processo produtivo executado pela empresa parceira produtora até chegar à Universidade NOVA

Após a fermentação, a biomassa rica em PHA é separada do caldo de fermentação através de uma centrifugação assistida com um coagulante (poliamida). O sólido resultante é acidificado com ácido acético (AA) para inativar as células preservando o teor polimérico e, de seguida seco em tabuleiros numa estufa a 60°C durante vários dias (>3). Em algumas produções não se incluiu o passo de acidificação como tentativa de simplificar e embaratecer o processo.

Na NOVA, a biomassa é recebida na forma de pedaços secos e por vezes até carbonizados/caramelizados como se pode ver na secção direita da Figura 2.2.



Figura 2.2: Biomassa em pedaços e após moagem do lado esquerdo; *close-up* sobre fragmentos queimados à direita.

Cada lote tinha entre 75 g e 4 kg de biomassa seca envolvidos em papelão. Os pedaços tinham tamanhos bastante variáveis, tendo os mais pequenos menos de um milímetro e os maiores cerca de 15 cm; a maioria tinha entre 1 e 10 cm. O teor de PHA dos lotes varia entre 10 e 30%, do qual entre 30 a 40% é PHV. A humidade era de aproximadamente 5%, no entanto o grau de secagem não era uniforme, característica mais visível nos pedaços de maior dimensão onde o cerne não estava totalmente seco.

2.2 Moagem

Para processar a biomassa que chega às instalações do grupo BIOENG, pode-se recorrer a dois métodos de moagem: manualmente ou com um moinho, escolhidos consoante a quantidade de biomassa presente no lote. Em geral quando era necessário quantificar a amostra a moagem é aplicada manualmente, quando o objetivo é aplicar processos extrativos sobre a amostra, uma maior quantidade é necessária e a moagem era aplicada no moinho.

No caso de a quantidade não justificar o uso do moinho, procede-se de forma manual atingindo um produto fragmentado com recurso a um pilão e um almofariz e uma seleção final com um coador com uma malha de 1,5 mm que seleciona os fragmentos.

Quando o lote é maior, utiliza-se um moinho de martelos Dietz DR80b/29 com 220 V, 50 Hz e 1,1 kW com uma malha de seleção de aproximadamente 1 mm.

Depois de moída, a biomassa é recolhida para um recipiente de vidro ou saco de plástico e é guardada ao abrigo da luz solar a 20°C.

2.3 Estudo das consequências do processamento pós-produção

No processo produtivo do projeto IGREEN, após a produção há um passo de inativação com AA e uma secagem a 60°C aplicada durante mais 72 h. Para estudar o efeito deste processamento na qualidade do polímero, procedeu-se a um ensaio em que um processamento semelhante foi aplicado a uma biomassa produzida na instalação piloto da Universidade NOVA com CMs e um substrato derivado de resíduos alimentares.

Neste ensaio foi recolhida a biomassa fresca diretamente do reator e dividiu-se em três frações, a primeira manteve-se inalterada, a segunda sofreu inativação com ácido acético e a última foi também inativada com ácido sulfúrico. Esta inativação foi feita adicionando o ácido e controlando o pH da mistura com um sensor, o pH da biomassa fresca inicial medido foi de 7,84; com o ácido sulfúrico atingiu-se um pH de 1,98; para a acidificação feita com AA, o pH mínimo obtido foi de 4,31.

Depois, cada fração foi novamente dividida em três partes, a primeira manteve-se fresca, a segunda foi seca a 60°C durante aproximadamente 24 h, a última foi liofilizada.

A todas as biomassas que sofreram os diferentes métodos de processamento foram ainda aplicadas duas estratégias de extração, digestão básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h com agitação de 200 rpm) e digestão oxidativa (NaClO 8,97% a 30°C por 3,4 h com agitação de 200 rpm). A biomassa foi repartida em parcelas de 400 mg (peso seco) por tubos *falcon* de 50 mL, onde se adicionam 20 mL da solução de extração obtendo uma concentração de aproximadamente 20 g de biomassa/L. Depois da digestão, a mistura é centrifugada por 10 min com um efeito centrífugo de 9300 g a 20°C, o sobrenadante é

descartado e o sólido recuperado é ressuspenso e lavado em 20 mL de água sendo depois a mistura sujeita a uma nova centrifugação onde se volta a descartar o sobrenadante.

As pesagens foram efetuadas com recurso a uma balança digital Sartorius CPA 225 D com sensibilidade de 0,00001 g, o sensor de pH utilizado foi o Thermo Scientific Orion Dual Star e a centrífuga foi a Sartorius Sigma 3-16K.

Para a formulação das soluções de extração e de inativação foi utilizado NaOH sólido Labchem, H₂SO₄ Honeywell de pureza 95,0-97,0%, Ácido acético glacial Fisher Chemical, H₂O₂ Fisher Chemical 60% m/v e NaClO Acros Organics 10-15%.

2.4 Extração laboratorial

O método de extração foi sofrendo alterações ao longo do trabalho, seguindo o processo de optimização. Cada condição foi aplicada em triplicado, salvo raras excepções em que, por questões de quantidade de biomassa disponível, não foi possível fazê-lo.

Para os ensaios de extração, a biomassa moída foi repartida em frações de 400 mg (peso seco) por tubos *falcon* de 50 mL, onde se adicionam 20 mL da primeira solução de extração (ácida) obtendo uma concentração de aproximadamente 20 g de biomassa/L. A mistura é incubada durante um período que varia entre 5 minutos e 3 horas numa placa com agitação e temperatura constante (agitação de 200 rpm; a temperatura aplicada variou entre 30 e 80°C, consoante o ensaio).

Seguidamente, a mistura é centrifugada por 10 min com um efeito centrífugo de 9300 g a 20°C, o sobrenadante é descartado e o sólido recuperado é ressuspenso e lavado em 20 mL de água sendo depois a mistura sujeita a uma nova centrifugação onde se volta a descartar o sobrenadante.

Segue-se uma ressuspenso com micropipeta do sólido em 20 mL da segunda solução de extração (básica) e incubada por um período que varia entre 48 min e 1 hora numa placa com agitação e temperatura constante (agitação de 200 rpm; a temperatura aplicada foi 30 ou 50°C, consoante o ensaio).

Por fim, a mistura é centrifugada por 10 min com um efeito centrífugo de 9300 g a 20°C, o sobrenadante é descartado e o sólido recuperado é ressuspenso e lavado em 20 ou 40 mL de água ou etanol, sendo depois a mistura sujeita a uma nova centrifugação onde o sobrenadante é descartado novamente e o sólido recolhido.

Depois da optimização da extração procedeu-se ao estudo da secagem. Para estes ensaios, o processo extrativo foi semelhante ao descrito anteriormente, mas, para se obter uma quantidade de produto de extração suficiente, os reatores a nível laboratorial passaram a ser tubos Nalgene de 48 mL, onde as soluções de extração são adicionadas obtendo uma concentração de aproximadamente 20 g de biomassa/L. A suspensão é incubada numa placa com agitação e temperatura constante (agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C)

As diferentes soluções de extração e de lavagem utilizadas no processo extrativo acima descrito encontram-se sumarizadas na tabela 2.1:

Tabela 2.1: Listagem das soluções de extração e de lavagem aplicadas

Solução de extração
Solução aquosa de ácido acético 40%
Solução aquosa de peróxido de hidrogénio 4,3%
Solução aquosa de ácido acético 50% e peróxido de hidrogénio 15%
Solução aquosa de hidróxido de sódio 0,84 M
Solução aquosa de peróxido de hidrogénio 2,5% e hidróxido de sódio 0,35 M
Solução aquosa de peróxido de hidrogénio 2,5% e hidróxido de sódio 0,84 M
Solução aquosa de ácido acético 10% e peróxido de hidrogénio 3%
Solução aquosa de ácido sulfúrico de 0,47; 0,5; 0,94 e 1,87 M
Solução de hipoclorito de sódio 6,5%
Etanol 20%
Solução de lavagem
Água destilada
Etanol 70%

As pesagens foram efetuadas com recurso a uma balança digital Sartorius CPA 225 D com sensibilidade de 0,00001 g. A humidade das amostras foi determinada na balança de secagem Mettler Toledo HB 43.

A centrífuga utilizada nos ensaios de optimização da extração foi a Sartorius Sigma 3-16K; já para o estudo da secagem recorreu-se à centrífuga Sartorius Sigma 4-16KS.

Para a determinação prática de quantidade de reagente a utilizar com o objetivo de neutralizar uma solução e para controlar o pH em alguns testes extrativos aplicados, foi utilizado o sensor de pH Thermo Scientific Orion Dual Star e as tiras de teste de pH MQuant®Supelco®.

Para a formulação das soluções de extração foi utilizado NaOH sólido Labchem, H₂SO₄ Honeywell de pureza 95,0-97,0%, Etanol Honeywell de pureza \geq 99,8%, Ácido acético glacial Fisher Chemical, H₂O₂ Fisher Chemical 60% m/v e NaClO Acros Organics 10-15%.

2.5 Extração piloto

Na instalação piloto, a extração foi efetuada num reator de 100L em aço inoxidável. Uma massa de 3 kg de biomassa (proveniente de vários lotes) foi submetida a um tratamento de digestão básica, numa concentração de 20 g de biomassa/L. A biomassa foi dividida em duas frações, extraídas de forma separada, já que o reator não tinha capacidade para processar a totalidade da biomassa apenas em um *batch*. A primeira, foi aplicada em 1 kg de biomassa, na segunda extraíram-se os 2 kg restantes.

Na primeira extração, digeriu-se a biomassa em 50 L de solução NaOH (0,84 M) a 30°C por 0,8 h com agitação das pás a 363 rpm. Depois, a mistura foi recolhida para recipientes de 10 L onde a

biomassa se acumulou no fundo e se retirou o excesso da solução, com recurso a uma bomba manual. A mistura húmida obtida foi centrifugada com um caudal de processamento de aproximadamente 22 L/h e uma velocidade de rotação de 20 000 rpm ($\pm 10\%$).

O sólido recuperado foi realimentado ao reator e lavado com 137,5 L de água da rede pública, depois de sedimentar no fundo do vaso reacional por 15 min, retirou-se parte da água de lavagem e, por fim, recuperou-se o produto de reação húmido que voltou a ser sujeito a uma centrifugação análoga à descrita acima.

Para a segunda extração, 2 kg de biomassa foram digerida em 100L de solução NaOH (0,84 M) a 30°C por 0,8 h com agitação das pás a 363 rpm. Depois, deixou-se a mistura repousar por 40 min sedimentando o produto da digestão, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sólido com aproximadamente 150 L de água da rede municipal e, recuperou-se o produto da extração húmido para os recipientes de 10 L. Por fim, o sólido foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente e recolhido.

Ambos os produtos de extração foram secos em tabuleiros a 55°C durante sensivelmente 24 h numa estufa Memmert BE 200 com circulação de ar natural.

A centrifuga contínua utilizada foi a CEPA Z 41.

2.6 Secagem

Para secar o produto da extração fizeram-se alguns testes preliminares sobre a 60, 70 e 105°C. A humidade inicial das amostras foi determinada na balança de secagem Mettler Toledo HB 43.

Já para a construção das curvas de secagem, utilizaram-se caixas de petri como suporte e foi aferida a massa das amostras com recurso à balança Kern ALJ310-4A com uma sensibilidade de 0,0001 g. Cada pesagem foi efetuada a quente sem recurso a exsicador voltando cada amostra à estufa da forma mais célere possível.

No ensaio a 60°C, as amostras consistiram em discos de 4,5 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, as pesagens foram efetuadas de 5 em 5 minutos inicialmente e de 10 em 10 a partir do minuto 110. Para o ensaio conduzido a 70°C, as amostras consistiram em discos de 3 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, as pesagens foram efetuadas de 5 em 5 minutos inicialmente e de 10 em 10 a partir do minuto 50. Já para o ensaio a 105°C, as amostras consistiram em discos de 4 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura, as pesagens foram efetuadas de 3 em 3 minutos inicialmente e de 5 em 5 a partir do minuto 60.

Para os ensaios a 60 e 70°C foi utilizada uma estufa Memmert BE 200 com circulação de ar natural. Já para o ensaio a 105°C, a estufa empregada foi uma Memmert UN30 com circulação de ar natural.

Como pré tratamento recorreu-se a um micro-ondas Whirlpool MD 111 e um *output* de 250 W.

2.7 Quantificação e caracterização do PHA

A cromatografia gasosa (CG) foi a técnica aplicada para quantificar o polímero presente, tanto nas amostras de biomassa como de produto de extração. Permite ainda caracterizar a composição monomérica (conteúdo em PHB e PHV). Todas as amostras sólidas analisadas foram previamente liofilizadas num liofilizador ScanVac CoolSafe 110-4.

As curvas de calibração foram obtidas com recurso a PHBV comercial da Sigma-Aldrich (teor de PHV de 12% molar). Os padrões variaram entre os 0 e 3,79 g/L de PHBV e, foi utilizado o padrão interno hidroxidecanoato (HD).

As retas de calibração obtidas, relacionam o quociente entre a concentração de cada monómero e o padrão interno com o quociente entre as área do picos correspondentes ao monómero de interesse e ao padrão interno.

Para esta análise seguiu-se o procedimento de metanólise descrito por Cruz et al. ^[117] com ligeiras modificações:

Uma massa de 1,3 - 2 mg de biomassa ou produto de extração seca/liofilizada é digerida a 100°C por 3,5h em tubos de digestão de vidro, com 1 mL de metanol ácido com 20% v/v de ácido sulfúrico (metanol Fisher Chemical de pureza $\geq 99,8\%$ e ácido sulfúrico Honeywell de pureza 95,0-97,0%) e 1 mL de clorofórmio (Honeywell de pureza $\geq 99,8\%$), com o padrão interno HD numa concentração de 1,00062 g/L. Em todas as análises efetuadas, foi incluída uma amostra da biomassa inicial IS201105, objeto dos ensaios de extração e que permite também comparar a fiabilidade da análise, servindo como controlo.

Depois de arrefecer à temperatura ambiente, é adicionado a cada tubo 1mL de água formando duas fases separadas, uma com o clorofórmio e o metanol e outra com a água. Para promover o contacto entre essas fases, a mistura é submetida a 30 segundos de agitação em vortex. Depois da agitação, a fase aquosa contém a água, o metanol e as impurezas na forma de suspensão e a fase orgânica, é composta por uma solução de PHAs em clorofórmio.

A fase orgânica é então recolhida e transposta para um *vial* com *beads* higroscópicas utilizando uma pipeta de *pasteur*. As *beads* absorvem qualquer resíduo de água que subsista, para não interferir com a análise na CG.

O cromatógrafo utilizado é o *Chromatograph Trace 1300, Thermo Scientific* com a coluna Restek (60 m, 0,53 mm de diâmetro interno, filme com 1 μm de espessura, Crossbond, Stabilwax). O gás transportador utilizado é o hélio com um caudal de 1 mL/min e uma pressão constante de 14,50 psi.

De cada amostra são injetados 2,0 μL que permanecem na coluna por 32 min. Quanto ao perfil térmico, a temperatura inicial é de 40°C e nos primeiros 3 minutos aumenta gradualmente em 20°C/min até chegar aos 100°C. Do minuto 3 até ao 21, a temperatura continua a aumentar, mas agora a um

ritmo de 3°C/min, no fim desta fase atinge-se a temperatura de 155°C. Por fim, até aos 32 min, o perfil de aquecimento volta a ser idêntico ao da primeira fase com um gradiente térmico de 20°C/min atingindo-se a temperatura final máxima de 220°C.

Para caracterizar as amostras quanto à natureza do seu conteúdo procedeu-se ainda à análise de sólidos voláteis aplicada de forma convencional [118].

É importante referir que, para os cálculos efetuados com os valores da quantificação por CG, não se considerou a humidade dos sólidos pois o teor de humidade era semelhante para todas as amostras (aproximadamente 5%):

A massa de PHA de cada amostra, é considerada como a soma dos monómeros HB e HV como representado na equação 2.1:

$$\text{PHA(g)} = \text{PHB} + \text{PHV} \quad (2.1)$$

Já a massa de material não polimérico foi calculado como constituindo a restante parte da amostra inicial (M_{biomassa}) que não é PHA (2.2):

$$\text{MCNP(g)} = M_{\text{biomassa}} - \text{PHA} \quad (2.2)$$

O teor de PHA (%PHA) correspondente é calculado ao dividir a concentração polimérica pela massa de amostra (M_{total}) colocada no tubo de digestão (2.3):

$$\% \text{PHA} (\% \text{m/m}) = \frac{\text{PHA}}{M_{\text{total}}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

A recuperação é determinada por um quociente. No numerador multiplica-se o teor de PHA do produto de extração (%PHA_{produto}) pela respetiva massa extraída seca (M_{produto}); o denominador consiste no produto entre a %PHA da biomassa inicial (%PHA_{biomassa}) e a respetiva massa utilizada no ensaio de extração (M_{biomassa}):

$$\% \text{PHA recuperado} (\% \text{m/m}) = \frac{\% \text{PHA}_{\text{produto}} \cdot M_{\text{produto}}}{\% \text{PHA}_{\text{biomassa}} \cdot M_{\text{biomassa}}} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Já para comparar as diferentes estratégias extrativas entre si bem como com a biomassa inicial, os valores para a massa de PHA e para a MCNP são normalizados. A equação 2.5 mostra o cálculo para o caso do PHA, para a MCNP calcula-se de forma análoga.

$$\text{PHA}_{\text{normalizado}} (\text{g/g}) = \frac{\% \text{PHA} \cdot M_{\text{produto}}}{M_{\text{biomassa}}} \quad (2.5)$$

3

Resultados & Discussão

Conteúdo

3.1	Análise comparativa da biomassa de estudo	37
3.2	Processo extrativo - resultados prévios de enquadramento	44
3.3	Ensaio de otimização da Extração	46
3.4	Alterações no processamento da biomassa	62
3.5	Ensaio piloto	63
3.6	Secagem do PHA extraído	68

3.1 Análise comparativa da biomassa de estudo

No processo produtivo, a acidificação da biomassa é feita com recurso a um ácido fraco: **AA**; ao invés do que aconteceria numa inativação acídica tradicional, onde se recorre a um ácido forte. Esta decisão foi tomada pois noutra vertente do projeto no qual este trabalho se inclui, a biomassa é incluída na fórmula de uma ração para gado, já que tem um potencial efeito prebiótico. Se um ácido forte fosse empregado, teria um efeito tóxico nos animais podendo deixar sequelas.

Em termos de acumulação, a biomassa recebida tinha um teor de PHA que variava entre 10 e 30 % , do qual entre 30 a 40% é PHV. Para os ensaios de optimização da extração no laboratório, utilizou-se sempre a mesma biomassa, IS201105, considerada uma biomassa tipo que representa o processo, com um teor de PHA e de humidade de aproximadamente 24% e 5,4% respetivamente. Do polímero presente, cerca de 34% era constituído por PHV

Estes valores são indicativos de que a produção não foi totalmente optimizada já que são bastante inferiores aos registados na literatura tanto para produções com CMs como especificamente para produções com substratos provenientes de água residual da pasta de papel [35–38,63,119]. Esta questão é especialmente preocupante pois a extração por métodos que assentam na digestão da MCNP encontram dificuldades acrescidas para teores poliméricos mais reduzidos, como supracitado, a literatura indica que para conteúdos inferiores a 60%, o processo não é rentável [61,100]. A biomassa é constituída por 71,9% de material orgânico e 28,1% de inorgânico, o que significa que as impurezas presentes são maioritariamente orgânicas, compondo 63% do material não polimérico que se pretende retirar.

Os testes de extração preliminares revelaram que algo curioso acontecia em todos os ensaios, quando aplicado qualquer método de extração, metade do polímero era perdido, incluindo no controlo, que consistia numa incubação com água. Mesmo com uma única lavagem, o comportamento é idêntico tal como mostra a Figura 3.1 que representa os resultados obtidos a partir de um ensaio em que se lavaram as biomassas e tanto o sólido como a água de lavagem foi liofilizada e quantificada com CG. A Biomassa produzida na instalação piloto da NOVA (à esquerda em tons alaranjados) não perdeu polímero, já nas amostras correspondentes à biomassa de interesse (à direita em tons azulados), a perda de metade de todo o polímero é consistente em todas as amostras e o balanço de massa é fechado pelo polímero arrastado na água de lavagem.

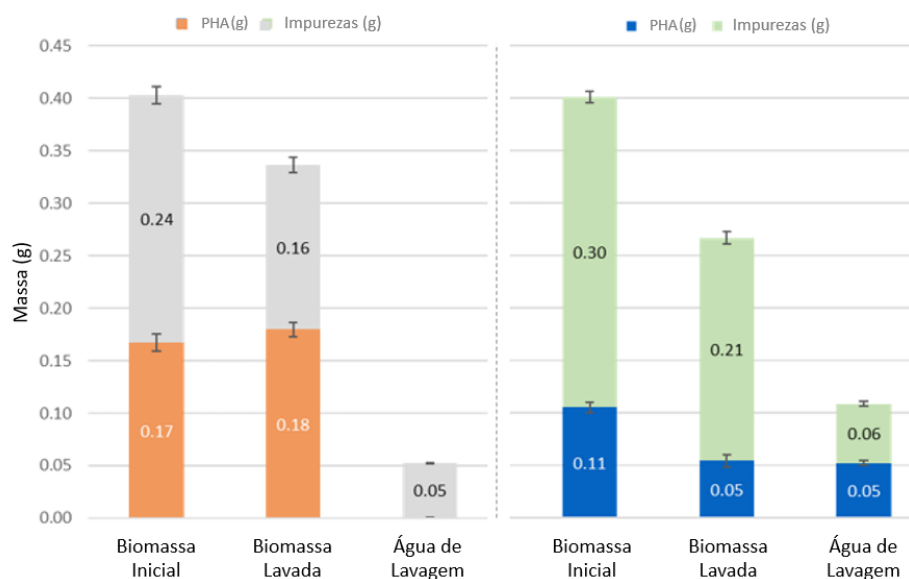


Figura 3.1: Diferença de comportamento da biomassa quando sujeita a uma lavagem com H₂O. Biomassa NOVA (à esquerda a laranja) e de estudo (à direita a azul), dados cedidos pela equipa da NOVA ID.

Este comportamento sugere que cerca de metade do polímero chega com a capacidade de se dissolver na água de lavagem. Ora, para o PHA solubilizar em água, o polímero necessita de estar já degradado na forma de monómeros/oligómeros, pois o grânulo polimérico não é solúvel [120,121].

Já quando se analisa a perda de impurezas solúveis, esta é semelhante entre as duas biomassas, uma lavagem retira aproximadamente 20% das impurezas. Nada se pode inferir quanto à causa da degradação do polímero também afetar as impurezas pois, como as biomassas são produzidas com substratos e com metodologias distintas, a natureza e características das impurezas também o serão.

Procedeu-se também à análise da massa molecular e do índice de polidispersão do polímero na biomassa recebida para averiguar sobre o estado de degradação da mesma. Esta análise foi feita por um parceiro estrangeiro da faculdade, o Centre Interfacultaire des Biomatériaux da Université de Liege. Os resultados dessa análise estão na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Resultados da análise de massa molecular e polidispersão da biomassa de estudo e NOVA ID

Amostra	Massa Molecular (g/mol)	Índice de Polidispersão
NOVA ID	263 117	2,00
SK 1	83 950	3,69
SK 2	75 512	3,72
SK 3	81 999	4,19

O primeiro dado, NOVA ID, é referente a um polímero produzido nas instalações piloto da NOVA ID a partir de um substrato proveniente de um resíduo de polpa de frutas e extraído com clorofórmio. Serve como um termo de comparação já que é um PHA que não está degradado e apresenta um valor

de massa molecular dentro do intervalo expectável (200-600 kDa) [122].

É importante ainda referir que as amostras do polímero de estudo analisadas foram purificadas a partir do *batch* IS201105 através de: (SK1) Extração Soxhlet com clorofórmio e precipitação com etanol puro; (SK2) Extração com clorofórmio e filtração (poro de 0,45 μm); (SK3) Extração com uma pré lavagem com H_2O , clorofórmio e filtração (poro de 0,45 μm). Nestas extrações, a PA adicionada na centrifugação após a acumulação não é selecionada, pelo que influencia os resultados, tanto de massa molecular, como de polidispersão. O impacto deste contaminante pode influenciar os dados de massa molecular tanto aumentando-os como diminuindo já que não foram partilhados quaisquer dados sobre a poliamida (PA) utilizada; já no índice de polidispersão, a adição de outro polímero com uma massa molecular distinta vai sempre ser um fator que aumenta a variabilidade de massa molecular, contribuindo para aumentar o valor deste indicador.

O desvio provocado pela presença de PA não é suficiente para justificar um decréscimo na massa molecular em uma ordem de grandeza, estes valores baixos podem ainda estar associados a uma produção de PHA na forma de polímeros de cadeia mais curta. Prova-se então que a elevada e inesperada solubilidade do PHA se deve efetivamente ao seu estado de forte degradação; os elevados valores do índice de polidispersão são mais uma evidência que valida essa observação.

Esperar-se-ia que na SK3, ao aplicar uma pré-lavagem, uma grande parte do PHA degradado seria solubilizado e retirado pelo que se obteria um maior valor de massa molecular e um menor índice de polidispersão. No entanto a massa molecular quantificada foi semelhante à das outras amostras e o índice de polidispersão foi ainda maior.

Estes dados são preocupantes pois o tratamento subsequente de extração (a desenvolver pela equipa da NOVA) irá degradar um pouco mais o polímero de interesse podendo restringir ou mesmo inviabilizar a aplicação final pretendida pelo parceiro a jusante na cadeia de valor.

Do processo produtivo aplicado, três particularidades se destacam como possíveis causas desta característica invulgar: A presença da poliamida na secagem, a acidificação com um ácido fraco e a secagem prolongada.

A presença da poliamida foi rapidamente descartada como fonte de degradação pois já tinha sido aplicado um processamento sem a adição deste componente verificando-se a mesma degradação e diminuindo drasticamente a recuperação de biomassa na centrifugação.

Ao inativar a biomassa com um ácido fraco, o pH típico de inativação (<3) não é atingido. Teorizou-se então que esta acidificação poderia não ser forte o suficiente e que os microrganismos, não estando num estado de inativação total, poderiam degradar o PHA por ação enzimática. Também foi sugerida uma terceira hipótese: sabe-se que quando sujeito a tratamento térmico prolongado, o PHBV não é especialmente resistente [114], por isso, a forma como se aplica a secagem pode induzir a degradação térmica do polímero.

Para esclarecer se alguma das teorias propostas era verdadeira, fez-se um teste com uma biomassa produzida na instalação piloto da Universidade NOVA com CMs e um substrato derivado de resíduos alimentares, que foi prontamente disponibilizada pelos colegas do BIOENG. Para este ensaio comparou-se a acidificação com ácido sulfúrico e acético e observou-se o impacto de uma secagem prolongada a 60°C (tal como procede a empresa encarregada pela produção neste processo). Os resultados deste conjunto de testes estão retratados de forma completa no Anexo A.

De todos os resultados foi feita uma seleção mais restrita onde fica patente o efeito da acidificação, representados na Figura 3.2 e Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Diferentes tratamentos aplicados a diferentes amostras no ensaio com a biomassa NOVA ID. A numeração corresponde ao gráfico da Figura 3.2

1	Biomassa não-acidificada liofilizada
2	Biomassa não-acidificada lavada liofilizada
3	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa não-acidificada, liofilizado
4	Biomassa acidificada com ácido acético liofilizada
5	Biomassa acidificada com ácido acético lavada liofilizada
6	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa acidificada com ácido acético, liofilizado
7	Biomassa acidificada com ácido acético fresca
8	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico liofilizada
9	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico lavada liofilizada
10	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa acidificada com ácido sulfúrico, liofilizado
11	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico fresca

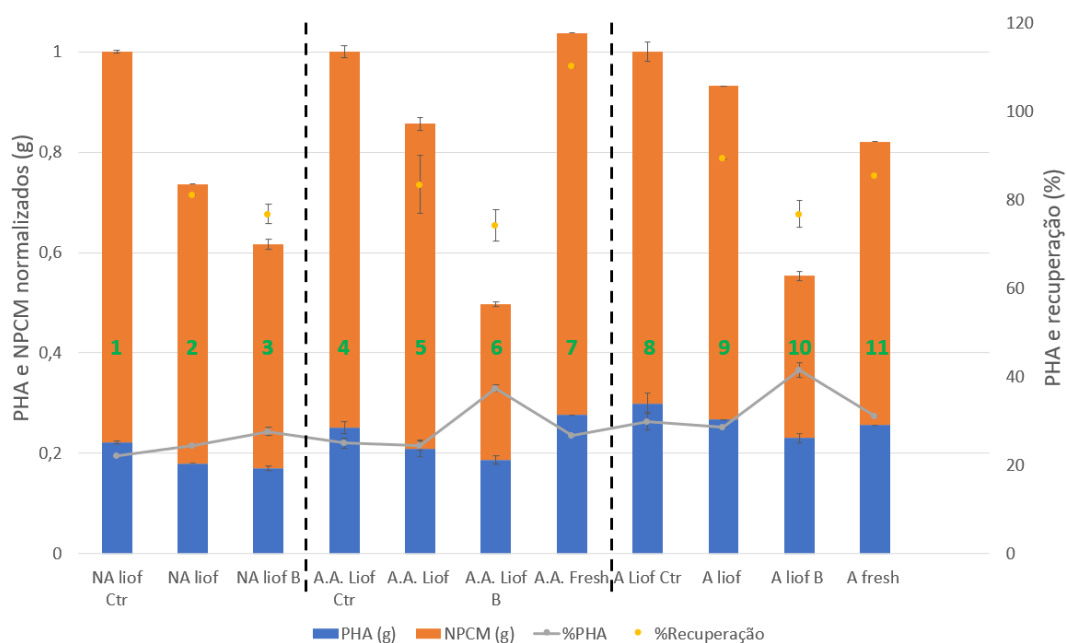


Figura 3.2: Biomassa NOVA sujeita a diferentes tipos de inativação ácida e de secagem. No primeiro setor encontram-se as amostras que não foram acidificadas (NA); no segundo, as acidificadas com ácido acético (AA); no terceiro, as acidificadas com ácido sulfúrico (A).

Ao analisar o controlo de cada setor da Figura 3.2 podemos concluir que, com uma acidificação, é possível reduzir de forma eficaz a degradação do polímero por parte da biomassa após a acumulação. Para este efeito tanto o ácido forte como o fraco foram bem sucedidos conservando uma maior quantidade de polímero em relação às amostras não acidificadas, notando-se ainda uma maior preservação do material de interesse na acidificação com o ácido sulfúrico.

Quando aplicada uma lavagem ou uma extração básica (aplicada nas condições optimizadas para outra biomassa NOVA), vê-se que o comportamento do polímero é muito semelhante para as estratégias de acidificação contrastantes. A única diferença reside na quantidade inicial relativa de impurezas, que é menor com ácido sulfúrico. Este cenário pode estar relacionado com a maior reatividade do ácido, que pode ter uma ação inadvertida sobre algumas impurezas; no entanto, a diferença não é considerável encontrando-se dentro da margem conferida pelas barras de erro. Esta aparente vantagem inicial é esbatida após o tratamento de digestão básica onde, à condição fortemente acidificada (10), corresponde um teor final de 41,5%, apenas 4 pontos percentuais acima do valor correspondente para quando a acidificação é feita com recurso a AA.

O ensaio, do ponto de vista da acidificação, confirmou que é um passo necessário no processo, principalmente quando a biomassa tem um processo de secagem longo e de seguida viaja para Portugal, para só então ser submetida a extração [121]. Já quanto à hipótese teorizada sobre a degradação extrema do polímero poder estar relacionada com o tipo de acidificação foi descartada, não se tendo encontrado qualquer evidência que apontasse nesse sentido.

Quando se analisam a Tabela 3.3 e a Figura 3.3 com o objetivo de comparar o efeito do tratamento térmico, surgem mais observações interessantes, especialmente quando o foco incide nas amostras acidificadas, já que para qualquer perda relevante de PHA se exclui o consumo por parte dos microrganismos.

Tabela 3.3: Diferentes tratamentos aplicados a diferentes amostras no ensaio com a biomassa NOVA ID. A numeração corresponde ao gráfico da Figura 3.3

1	Biomassa não-acidificada liofilizada
2	Biomassa não-acidificada lavada liofilizada
3	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa não-acidificada, liofilizado
4	Biomassa não-acidificada lavada seca
5	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa não-acidificada, seco
6	Biomassa acidificada com ácido acético liofilizada
7	Biomassa acidificada com ácido acético lavada liofilizada
8	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa acidificada com ácido acético, liofilizado
9	Biomassa acidificada com ácido acético seca
10	Biomassa acidificada com ácido acético lavada seca
11	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa acidificada com ácido acético, seco
12	Biomassa acidificada com ácido acético fresca
13	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico liofilizada
14	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico lavada liofilizada
15	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico seca
16	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico lavada seca
17	Produto de extração básica (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h) de biomassa acidificada com ácido sulfúrico, seco
18	Biomassa acidificada com ácido sulfúrico fresca

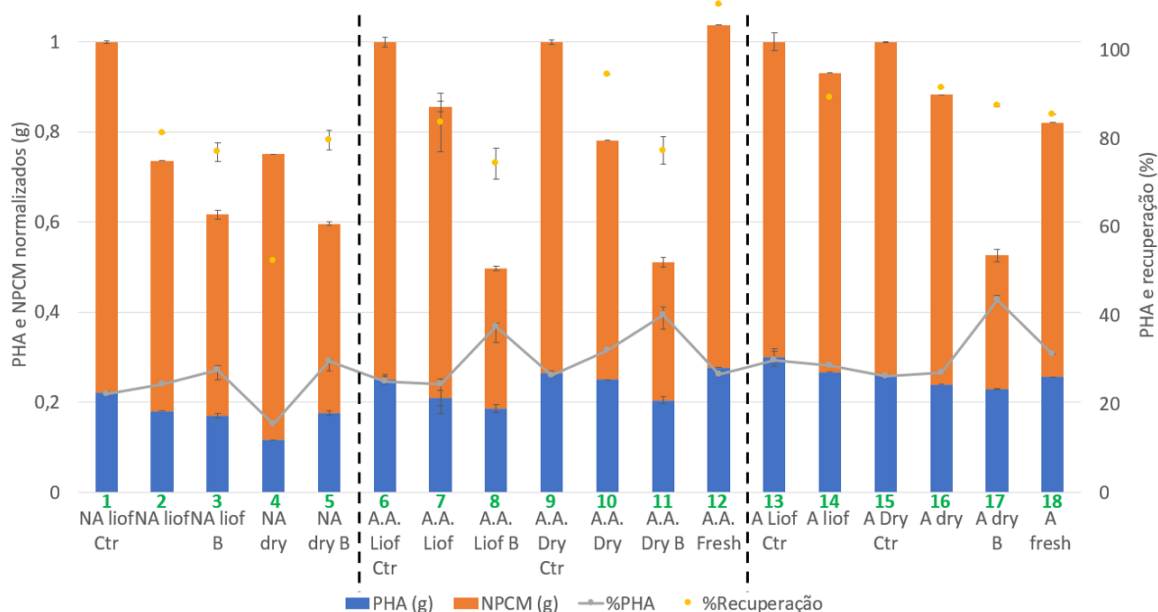


Figura 3.3: Biomassa NOVA sujeita a diferentes tipos de secagem e de inativação ácida. No primeiro setor encontram-se as amostras que não foram acidificadas (NA); no segundo, as acidificadas com o ácido acético (AA); no terceiro, as acidificadas com ácido sulfúrico (A).

Em relação à biomassa liofilizada, a biomassa seca acidificada com o ácido acético tem até um aparente aumento do teor polimérico em 1,4% (diferença contida dentro do intervalo limitado pelas barras de erro) enquanto a do ácido sulfúrico decresce em 3,8%. Já quando se analisa o PHA perdido por uma lavagem depois da secagem (Dry Ctr vs. Dry), a biomassa acidificada pelo ácido acético apresenta uma recuperação de 94,5%, superior aos 91,6% obtida na biomassa acidificada fortemente. São resultados que sugerem que a secagem tem um efeito de degradação mais acentuado até quando se acidifica com ácido sulfúrico do que com ácido acético, e ainda que essa degradação é bastante leve, tendo como repercussão uma degradação (até ao estado solúvel) de menos de 10% do polímero.

Para se analisar o efeito do tratamento térmico sobre o polímero, é necessário ainda referir que a secagem, foi feita a 60°C em pequenas placas onde uma fina camada de biomassa foi colocada. Estas condições fizeram com que as amostras secassem de forma relativamente rápida tendo o tratamento térmico durado menos de 24 h.

Quando contraposto com o tratamento aplicado no processamento aplicado à biomassa de estudo, é bastante mais suave com um rácio de área de contacto/massa bastante maior. Por isso, aliado ao importantíssimo fator de serem biomassas completamente distintas, as conclusões não podem ser diretamente extrapoladas.

Ainda assim, os resultados da Figura 3.3 permitem confirmar que a secagem degradou o polímero, perdendo-se uma pequena parte para a água de lavagem. É verosímil considerar que o tratamento

ainda mais prolongado aplicado no projeto no qual este trabalho se inclui potencia este efeito, justificando pelo menos parte da degradação que efetivamente se verifica. No entanto pelas condições e biomassa diferentes, e também pela degradação leve que se observa, este ensaio não comprovou a teoria de que a fonte da degradação estava na secagem.

3.2 Processo extrativo - resultados prévios de enquadramento

No início dos trabalhos de extração ainda não havia biomassa do projeto disponível, os primeiros testes foram aplicados em biomassa disponível no laboratório produzida a partir de polpa de fruta.

Quando as primeiras remessas com a biomassa de interesse chegaram com um teor de PHA de 13,3% e humidade de 18,2%, a extração relativamente funcional já conseguida para a biomassa NOVA, não era aplicável com sucesso para a biomassa do projeto no qual este trabalho se inclui. Então uma bateria de testes preliminares exploratórios foi aplicada.

Como um dos principais objetivos é aplicar a extração a uma maior escala, evitaram-se processos a temperaturas relativamente elevadas ou com reagentes tóxicos e poluentes. Descartou-se então a digestão ácida já que a literatura indica que só é funcional a temperaturas mais elevadas o que implica um aquecimento e um conseqüente consumo energético expressivo [81, 102, 123].

Fizeram-se testes com digestão básica (NaOH), tratamento oxidativo (NaClO) e ainda variações da digestão básica com um tensoativo (SDS) e um álcool (Etanol). Os resultados indicaram que o tratamento oxidativo era ligeiramente mais eficaz que o tratamento básico e que a digestão básica aliada aos aditivos supracitados não confere qualquer melhoria palpável na pureza ou recuperação do polímero. Como a utilização de hipoclorito de sódio a nível industrial acarreta o risco da formação de compostos halogenados tóxicos, priorizou-se a otimização da estratégia com digestão básica.

Escolhida então a estratégia principal de extração, optimizaram-se as condições tendo-se destacado duas semelhantes entre si: A primeira utilizando NaOH 0,84 M durante 0,8 h a 30°C e a segunda incubando a biomassa com NaOH 0,14 M durante 4,3 h a 30°C. Como o objetivo é potenciar um *scale-up* nas condições mais favoráveis possíveis, optou-se pela primeira condição que permite uma extração mais célere.

Para garantir que durante as incubações os reagentes contactavam com a biomassa, estabeleceu-se uma agitação constante de 200 rpm, transversal a todos os ensaios executados.

Tinha-se optado por uma digestão básica com NaOH 0,84 M à "temperatura ambiente"(30°C), em que as condições ótimas foram obtidas quando a biomassa foi incubada por 0,8 h, *i.e.* 48 min. Com esta extração obtém-se um produto com um teor de PHA e uma recuperação de aproximadamente 17 e 36%, respetivamente.

As impurezas restantes são predominantemente orgânicas (60-65%), destas, sabe-se que parte será biomaterial proveniente dos microrganismos produtores de PHA, outra vem arrastada pelo substrato derivado do efluente da indústria papelreira, e por fim terá ainda uma pequena fração de PA. Das impurezas que vêm arrastadas pelo substrato, a lenhina é uma boa candidata a ser um dos contaminantes predominantes, como foi mencionado capítulo 1, já que é um dos principais compostos removidos nos processos da indústria papelreira e é um polímero hidrofóbico, tal como o PHA, com uma estrutura molecular complexa que o torna resistente à degradação química e biológica. O método de digestão básica está extensivamente estudado em relação à MCNP, no entanto para impurezas de natureza distinta a eficácia deste método é bastante variável; assim sendo, averiguou-se se havia vestígios de lenhina no produto de extração (PdE) ao analisá-lo no microscópio.

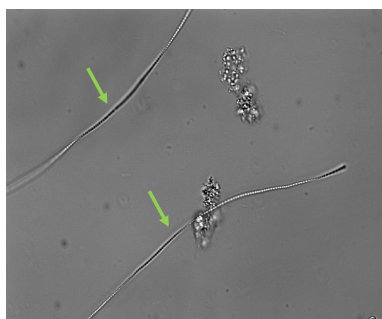
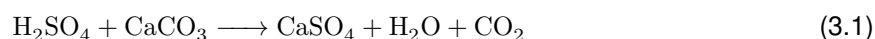


Figura 3.4: Produto de extração proveniente da biomassa de interesse analisado ao microscópio com uma ampliação de 100x, com a presença de filamentos de lenhina destacada.

Esta análise confirmou a hipótese proposta verificando-se a presença de múltiplos fragmentos filamentosos de lenhina, destacados na Figura 3.4.

Quando às impurezas inorgânicas, que ainda assim perfazem até 40% do total de matéria seca, teorizou-se que seriam primariamente constituídas por carbonato de cálcio, pelo que seria facilmente retirado por uma acidificação com, *e.g.* ácido sulfúrico:



Na reação (3.1), o ácido reage com o carbonato sólido originando um sal, água e dióxido de carbono na forma de gás.

Esta teoria é suportada por testes de Differential Scanning Calorimetry (DSC) e Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), que indicam fortemente a presença deste carbonato (resultados não apresentados), e também pela evidência da libertação de gás aquando do contacto com um ácido forte (H_2SO_4) como mostra a Figura 3.5.

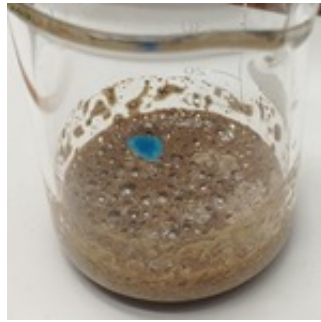


Figura 3.5: Biomassa em contacto com H_2SO_4 . Nota para a pinta azul que é apenas uma marca do copo utilizado e não faz parte da amostra em causa.

3.3 Ensaios de optimização da Extração

3.3.1 Ensaio preliminar de eliminação de lenhina e $CaCO_3$

Foi projetada uma nova bateria de ensaios, os primeiros em que participei, que visavam especificamente as impurezas realçadas na secção anterior: a lenhina e o carbonato de cálcio. As condições foram aplicadas em triplicado e estão descritas na Tabela 3.4, os resultados estão representados na Figura 3.6.

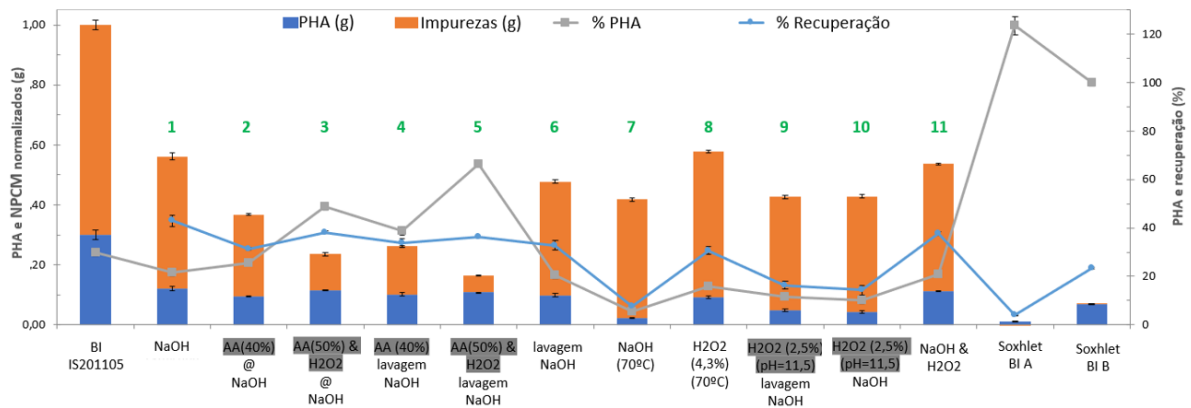


Figura 3.6: Ensaio 1: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração.

As legendas destacadas a cinzento, indicam uma pré-incubação de 2 horas e 4 mL. A indicação "@" traduz uma centrifugação e a descarga subsequente do sobrenadante.

No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.

As últimas duas amostras apresentam duas extrações soxhlet aplicadas à biomassa de estudo

Tabela 3.4: Condições aplicadas no ensaio 1, cujos resultados estão representados na Figura acima (3.6).

1	Extração com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h seguido de uma lavagem com água (40 mL). Pré-incubação com 4 mL de AA 40% a 80°C por 2 h seguido de uma centrifugação, o pellet é
2	recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
3	Pré-incubação com 4 mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 80°C por 2 h seguido de uma centrifugação, o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 4 mL de AA 40% a 80°C por 2 h seguida de uma lavagem (40 mL) O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
5	Pré-incubação com 4 mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 80°C por 2 h seguido de uma lavagem (40 mL), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
6	Extração com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h precedido e seguido de uma lavagem com água (40 mL).
7	Extração com 20 mL de NaOH 0,84 M a 70°C por 0,8 h seguido de uma lavagem com água (40 mL).
8	Extração com 20 mL de H ₂ O ₂ 4,3% a 70°C por 0,8 h seguido de uma lavagem com água (40 mL).
9	Pré-incubação com 4 mL H ₂ O ₂ 2,5% e NaOH 0,35 M a 80°C por 2 h seguido de uma lavagem (40 mL) e uma incubação com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
10	Pré-incubação com 4 mL H ₂ O ₂ 2,5% e NaOH 0,35 M a 80°C por 2 h seguido de uma incubação com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
11	Incubação com 20 mL de H ₂ O ₂ 2,5% e NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.

Numa vista geral, volta a verificar-se sempre uma perda superior a 50% do polímero em relação à biomassa inicial (BI). Se considerarmos que metade do polímero se perde devido à degradação imputada pelo processo, pode-se considerar que a maioria dos tratamentos degrada o PHA de forma semelhante, provocando uma perda extra de cerca de 10%. A condição número 6, serviu apenas para testar se uma pré-lavagem seria benéfica verificando-se uma diminuição tanto na recuperação como no teor polimérico.

Atentando agora nas condições 2 e 4, pode-se concluir que uma lavagem entre a pré-incubação ácida e a digestão básica é benéfica, traduzindo-se num aumento significativo tanto do teor polimérico como da recuperação. Esta diferença explica-se não só pela maior eficácia na remoção das impurezas dissolvidas em cada fase mas também por a lavagem remover mesmo as quantidades vestigiais de ácido nas amostras, minimizando a reação ácido-base que neutralizaria parte da soda cáustica, maximizando o efeito deste reagente. Em relação ao tratamento básico simples, consegue-se um aumento do teor de PHA de 22 para 39% com uma redução na recuperação polimérica inferior a 10%.

Os testes 3 e 5 mostraram que mesmo utilizando uma condição ácida mais agressiva (AA aumentou a concentração de 40 para 50%) aliado a um agente oxidante (peróxido de hidrogénio), a degradação do polímero é menor, mostrando recuperações maiores do que nas condições discutidas no parágrafo

anterior. A lavagem volta a ter um impacto positivo e consegue obter-se um teor polimérico de 66%.

As condições 7,9 e 10 mostraram que a aplicação de uma digestão básica a temperaturas mais elevadas (70 e 80°C)^[124] tem um efeito muito agressivo sobre o polímero de interesse desgastando-o fortemente. Na condição 8, testou-se um tratamento a pH=11,5 apenas com peróxido de hidrogénio a uma temperatura relativamente elevada. Os resultados também inviabilizam esta estratégia já que se obteve uma menor recuperação e teor polimérico nestes testes quando comparados com a digestão básica otimizada à temperatura ambiente (condição 1). Note-se que as condições aplicadas nos testes 8,9 e 10 foram determinadas antecipadamente no laboratório, num tubo sem biomassa, para que se atingisse um pH de 11,5^[125]. Ainda assim, nos testes 9 e 10, o pH registado foi de 10,9, possivelmente por parte dos iões OH⁻ que conferiam a basicidade num tubo sem biomassa ter reagido na digestão da MCNP.

Para o ensaio 8, por lapso, não foi adicionado NaOH para ajustar o pH pelo que a concentração de biomassa foi de 34,5 g/L ao invés dos tradicionais 20 g/L. Não obstante, esta condição permitiu averiguar sobre o efeito do peróxido como agente extrativo de forma isolada (com aquecimento), concluindo-se que tem uma ação bastante restrigente permitindo recuperar apenas 30,7% do polímero e obtendo um conteúdo polimérico inferior ao da BI. É possível que esta degradação se deva em parte à incubação com uma temperatura de 70°C, que tem a capacidade de degradar o PHA^[114].

Os testes 11 sugerem que um tratamento básico e oxidativo simultaneamente também não é uma estratégia ganhadora, tanto a recuperação como o teor polimérico são ligeiramente inferiores aos obtidos com uma digestão básica simples (1).

3.3.2 Ensaio de optimização de eliminação de lenhina e carbonato de cálcio

Tendo em conta os resultados obtidos, desenhou-se um novo ensaio com o objetivo de otimizar este tipo de extração e também testar algumas condições que permitam facilitar a extração e o seu futuro aumento de escala. As condições foram aplicadas em triplicado e estão descritas na Tabela 3.5, os resultados finais estão representados na Figura 3.7.

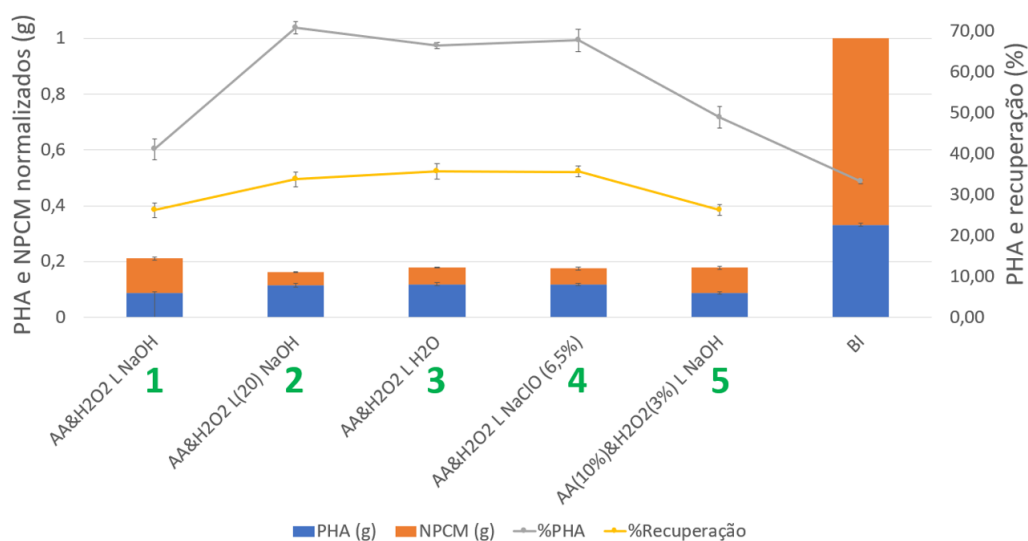


Figura 3.7: Ensaio 2: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com água.

Tabela 3.5: Condições aplicadas no ensaio 2, cujos resultados estão representados na Figura acima (3.7).

1	Pré-incubação com 4mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 30°C por 2h seguido de uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
2	Pré-incubação com 4 mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 80°C por 2h seguido de uma lavagem com 20 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 20 mL de água.
3	Pré-incubação com 4 mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 80°C por 2h seguido de uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 4 mL de AA 50% e H ₂ O ₂ 15% a 80°C por 2h seguido de uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 40 mL de NaClO 6,5% a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
5	Pré-incubação com 4mL de AA 10% e H ₂ O ₂ 3% a 30°C por 2h seguido de uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.

Em geral este ensaio produziu resultados bastante positivos. A primeira condição testada tinha como objetivo baixar a temperatura da pré-incubação de 80 para 30°C mas a recuperação de 26% e um teor polimérico de 41% ficaram bastante desfasados dos ensaios com uma pré-incubação a 80°C. Observando os resultados referentes aos ensaios 2 e 3, pode-se concluir que com lavagens com apenas 20 mL ao invés dos 40 mL habituais são obtidas melhorias no desempenho da extração com um aumento de aproximadamente 4% no teor polimérico e uma subida na recuperação polimérica superior a 10%. A condição 2, a melhor deste ensaio contou com uma %PHA de 70,8±1,5% e uma recuperação de 33,7±1,8%.

Nos testes 4, analisou-se a pré-incubação aliada a uma extração oxidativa com hipoclorito de sódio.

Os resultados foram semelhantes aos alcançados com uma extração básica pelo que, pelas razões já discutidas, não foi uma opção contemplada em ensaios seguintes.

Por fim, nos testes 5, a tentativa de reduzir a quantidade de reagentes necessárias foi claramente mal-sucedida obtendo tanto conteúdo como recuperações poliméricas baixíssimas.

Estes ensaios, ainda que construídos sobre sólidas bases científicas desvirtuam o objetivo da extração do processo que permita um aumento de escala. É utilizada uma longa pré-incubação com aquecimento (2 h a 80°C) e com uma concentração relativamente elevada de ácido acético (50%), um reagente relativamente caro. Por estas questões sugeriu-se trocar o ácido acético por um ácido forte como o sulfúrico mas a mistura com ácidos fortes e peróxido de hidrogénio é extremamente corrosiva e potencialmente explosiva sendo comumente denominada por solução piranha. Logo o uso deste tipo de misturas foi descartado.

Visto que este tipo de abordagem não pôde ser seguida, apesar de ter demonstrado resultados prometedores; decidiu-se que o próximo passo seria testar a possibilidade de incluir pré-incubação ácida sem peróxido de hidrogénio no processo de extração.

3.3.3 Ensaios de acidificação preliminares

O ácido forte (disponível a um preço acessível) escolhido para a pré-incubação ácida foi o ácido sulfúrico (H_2SO_4) que daqui para a frente será apenas designado por **A**. No primeiro ensaio testou-se uma pré-incubação rápida de 5 min com o objetivo de dissolver e retirar apenas o carbonato. Três concentrações foram utilizadas: 2,5; 5 e 10% o que corresponde a 0,47; 0,94 e 1,87 M respetivamente.

As condições estão sintetizadas na Tabela 3.6 e os resultados do ensaio representados na Figura 3.8

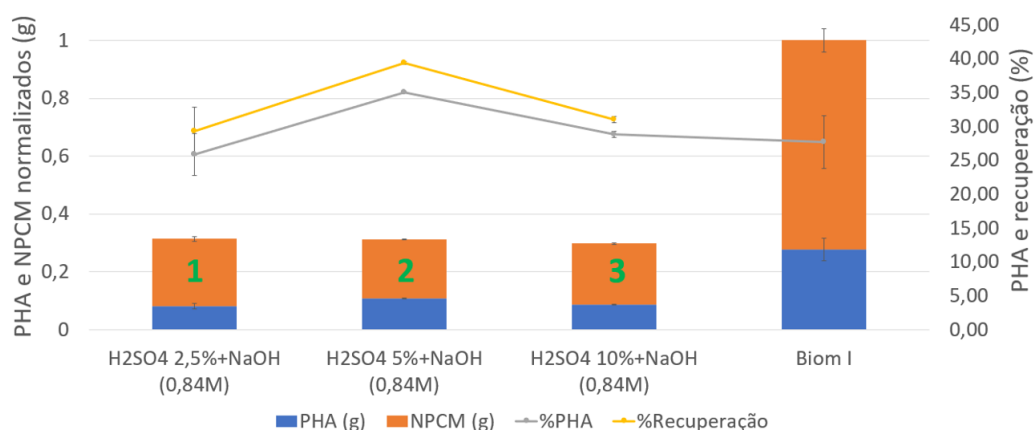


Figura 3.8: Ensaio 3: biomassa (IS201 105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.

Tabela 3.6: Sumário das condições aplicadas no ensaio 3, primeiro ensaio preliminar com uma incubação ácida com ácido sulfúrico (ácido sulfúrico (A)).

1	Pré-incubação com 20 mL de A 2,5% a 30°C por 5 min, segue-se uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
2	Pré-incubação com 20 mL de A 5% a 30°C por 5 min, segue-se uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
3	Pré-incubação com 20 mL de A 10% a 30°C por 5 min, segue-se uma lavagem com 40 mL de água. O pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.

Destes resultados pode-se concluir que para uma pré-incubação de 5 min, a concentração mais vantajosa é a de 5% atingindo um teor de PHA de $35,1 \pm 0,1\%$ e uma recuperação polimérica de $39,4 \pm 0,2\%$. Em relação à BI, o produto da extração foi enriquecido poliméricamente em 7,4%. Quando foi aplicado uma concentração de A de 2,5 e 10% os resultados foram semelhantes entre si e com um desempenho ligeiramente inferior à concentração intermédia.

Nesta fase do projeto discutiu-se uma nova estratégia. Apesar de a digestão ácida ter sido uma hipótese desconsiderada *a priori*, agora, com evidências que apontam para uma necessidade forçada de incluir uma incubação ácida, o uso de ácidos fortes torna-se provável. Incluíram-se então testes nos ensaios que se seguem que exploram a possibilidade de uma digestão ácida, podendo até substituir a digestão básica já otimizada.

A exploração desta nova possibilidade começou com a análise da extração obtida apenas com a incubação rápida testada anteriormente. Os resultados desse ensaio estão representados na Figura 3.9 e as condições aplicadas estão expressas na Tabela 3.7

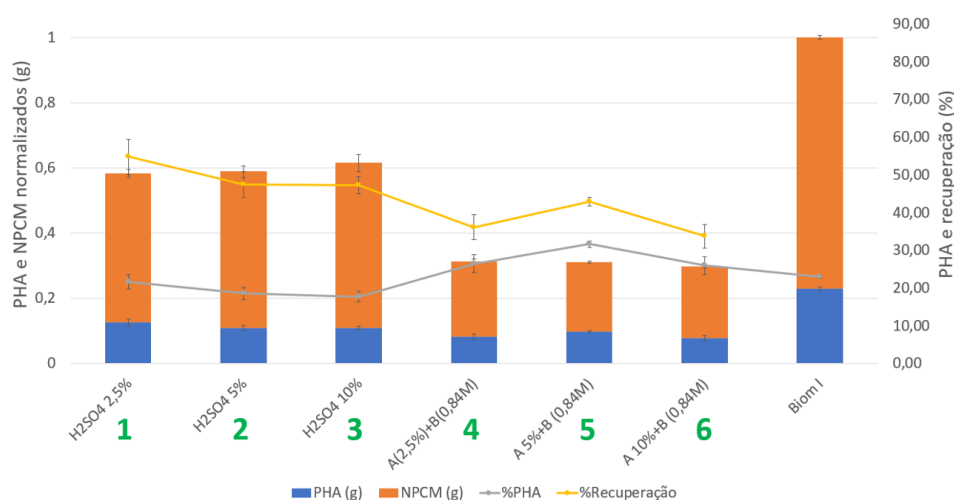


Figura 3.9: Ensaio 4: biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.

Tabela 3.7: Condições aplicadas no ensaio 4, segundo ensaio preliminar com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.

1	Incubação com 20 mL de A 2,5% a 30°C por 5 min, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
2	Incubação com 20 mL de A 5% a 30°C por 5 min, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
3	Incubação com 20 mL de A 10% a 30°C por 5 min, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 20 mL de A 2,5% a 30°C por 5 min, segue-se uma centrifugação onde o pellet é recolhido, lavado com 40 mL de H ₂ O e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
5	Pré-incubação com 20 mL de A 5% a 30°C por 5 min, segue-se uma centrifugação onde o pellet é recolhido, lavado com 40 mL de H ₂ O e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.
6	Pré-incubação com 20 mL de A 10% a 30°C por 5 min, segue-se uma centrifugação onde o pellet é recolhido, lavado com 40 mL de H ₂ O e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado com 40 mL de água.

Quando se comparam os resultados do tratamento estritamente ácido com o tratamento misto anteriormente aplicado, conclui-se que a recuperação é favorecida mas o teor é menor. Este comportamento justifica-se pelo tratamento mais completo digerir uma maior fração das impurezas, aumentando o teor polimérico; mas também, por ser um tratamento mais longo e mais agressivo, desgasta uma maior quantidade de PHA traduzindo-se numa menor recuperação. Quando se comparam as melhores condições de cada tipo de tratamento aplicadas neste ensaio observa-se um aumento do teor polimérico de 21,6 para 31,6% e uma diminuição da recuperação de 54,7 para 42,8%, do tratamento ácido para o misto respetivamente. Em relação à BI, o produto da extração foi enriquecido em 8,6%.

Analisando apenas os testes onde se aplicou apenas uma incubação ácida, os resultados são um pouco surpreendentes. A condição que demonstrou uma maior eliminação de impurezas corresponde à menor concentração (1), tanto a recuperação como o teor polimérico ($54,7 \pm 4,7\%$ e $21,6 \pm 1,9\%$ respetivamente) foram superiores quando comparados com as condições mais concentradas. Este resultado é diferente do que seria esperado tendo em conta os resultados da pré-incubação ácida articulada com a incubação básica, onde a condição intermédia tinha saído favorecida.

Dado estes resultados incongruentes, escolheu-se como concentração ótima a mais baixa já que mesmo no tratamento misto a diferença não foi muito marcada (de aproximadamente 5% para ambos os indicadores), implica uma utilização de metade do reagente e condições mais suaves de tratamento, tanto para o polímero como para os potenciais trabalhadores da unidade industrial. Os 2,5% correspondem a uma concentração de 0,47 M e a concentração selecionada para os testes subsequentes foi ligeiramente superior: 0,5 M.

3.3.4 Ensaios de acidificação (optimização)

Definida a concentração a utilizar nesta pré-incubação ou até potencial digestão ácida, faltava estudar e definir o efeito do tempo desta incubação o que foi feito no próximo ensaio que classifiquei como o

primeiro dos ensaios de otimização, cujas condições e resultados estão retratados na Figura 3.10 e Tabela 3.8.

É importante referir também que a partir deste ensaio, houve vários testes extra feitos pela equipa da NOVA ID a pedido do parceiro responsável pela produção com o intuito de melhorar o seu processo, nomeadamente a fase de secagem para que as condições da biomassa/polímero viabilizassem o processo extrativo.

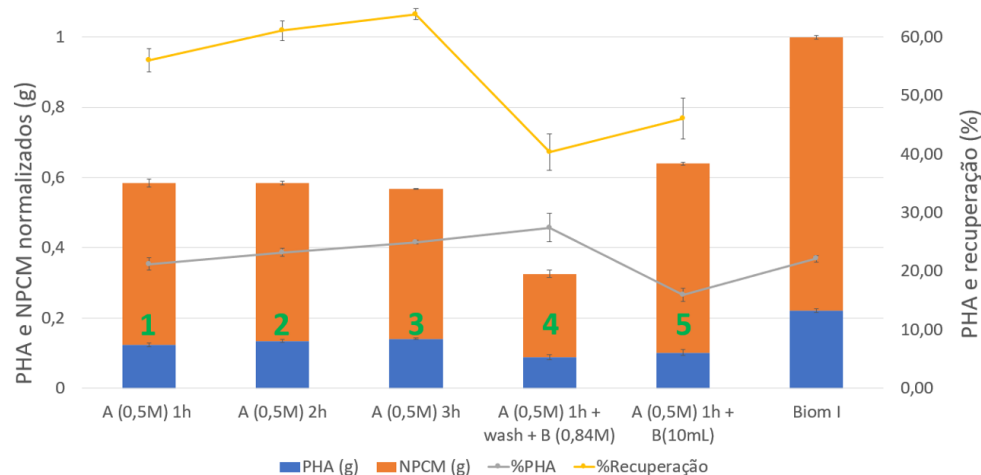


Figura 3.10: Ensaio 5: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.

Tabela 3.8: Condições aplicadas no ensaio 5, primeiro ensaio de otimização com uma pré-incubação com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.

1	Incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
2	Incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 2 h, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
3	Incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 3 h, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Por fim, o produto é lavado de novo com 40 mL de água.
5	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, segue-se um acerto da acidez até pH 10 com 10 mL de NaOH. Por fim o produto é lavado com 40 mL de água.

Analisando as primeiras três condições aplicadas, com uma digestão ácida à temperatura ambiente (30°C), cada hora de incubação traz um benefício para ambos os parâmetros analisados. O conteúdo polimérico aumenta aproximadamente 2% a cada hora extra na incubação, já a recuperação acresce sensivelmente 4% por hora. Estes resultados, quando comparados com o tratamento misto são menos vantajosos pelo que se pôs término aos testes de digestão estritamente ácida a frio.

Se compararmos com os dados do ensaio anterior vemos que o aumento do tempo de incubação de 5 min para 1 hora implicou um teor polimérico ($21,6 \pm 1,9\%$ e $21,4 \pm 1,0\%$ respetivamente) e uma recuperação semelhantes ($54,7 \pm 4,7\%$ e $56,1 \pm 2,0\%$). Estas subtis diferenças sustentam a ideia de

que a presença do ácido está a agir apenas como um pré-tratamento sobre as impurezas inorgânicas (*i.e.* carbonato de cálcio) e não como um agente digestor.

A condição 4 foi aplicada para testar o pré-tratamento ácido com 1 hora, uma lavagem intermédia e o tratamento básico. Foi a condição que obteve melhores resultados deste ensaio com um teor polimérico de $27,5 \pm 2,4\%$ e uma recuperação de $40,3 \pm 3,1\%$ do polímero inicial. Em relação à BI, o produto da extração foi enriquecido poliméricamente em 11,5%.

Quando comparado com a condição do ensaio anterior semelhante, mas com uma incubação por 5 min (A 0,47M, condição 4), obteve-se uma melhoria no teor polimérico e na recuperação de aproximadamente 1 e 4,3%. Apesar de não ser uma melhoria muito expressiva, considerou-se a incubação de 1 h com uma lavagem intermédia a condição a otimizar, já que garante o efeito do ácido a nível laboratorial sem consequências relevantes na qualidade no polímero e minimiza possíveis erros/desvios viabilizando a comparação dos resultados entre diferentes ensaios. Para efeitos de aumento de escala, admite-se uma redução no tempo da pré-incubação ácida.

Por fim, a condição 5, foi inspirada na literatura que sugere um acerto a pH 10 antes da centrifugação [46, 81, 126], este foi efetuado com a adição de 10 mL de uma solução de NaOH 2 M. No entanto, como este acerto implica uma neutralização de um ácido forte com uma base forte, é difícil ter uma sensibilidade que garanta um pH final de 10, já que depois de atingido o ponto de equivalência, basta uma quantidade muito pequena de base para se atingir um pH superior a 12 [127].

Os produtos obtidos apresentam menor recuperação e conteúdo polimérico que os produtos 1 que receberam o mesmo tratamento sem o acerto na acidez. Ainda assim fez-se uma observação curiosa neste ensaio, nas centrifugações finais o pellet compactava muito bem sendo o sobrenadante retirado sem qualquer perda. Já quando a centrifugação era aplicada a um meio ácido, a compactação do pellet não era tão bem sucedida soltando-se sempre parte do sólido depositado no fundo do *falcon*.

No ensaio que se segue aplicou-se ainda uma incubação estritamente ácida, desta feita a uma temperatura um pouco mais elevada, de 50°C que expectavelmente terá resultados mais favoráveis em relação à digestão ácida a temperaturas menores [81, 102, 128]. Também se aplicou uma pós-incubação com etanol em condições já testadas antes da minha integração na equipa, e uma tentativa de reduzir a quantidade de soda cáustica utilizada.

Os resultados estão explicitados na Figura 3.11 e as condições aplicadas na Tabela 3.9

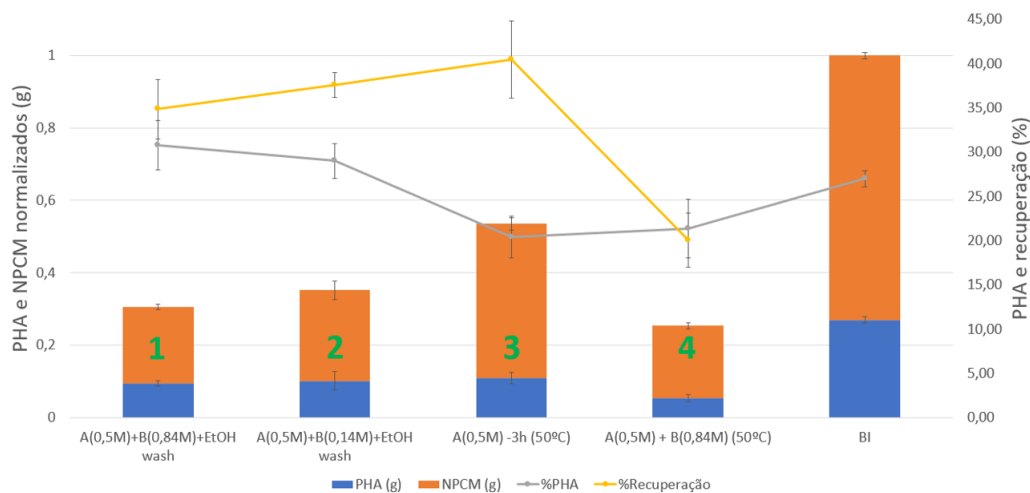


Figura 3.11: Ensaio 6: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água.

Tabela 3.9: Condições aplicadas no ensaio 6, terceiro ensaio preliminar com ácido sulfúrico (A). Início do estudo da possibilidade da aplicação de uma digestão puramente ácida.

1	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 30°C por 0,8 h. Este produto volta a ser centrifugado e o pellet é sujeito a uma pós-incubação com 20 mL EtOH 20% a 30°C por 1,5 h. Por fim o produto é lavado de novo com 40 mL de água.
2	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,14 M a 30°C por 0,8 h. Este produto volta a ser centrifugado e o pellet é sujeito a uma pós-incubação com 20 mL EtOH 20% a 30°C por 1,5 h. Por fim o produto é lavado de novo com 40 mL de água.
3	Incubação com 20 mL de A 0,5 M a 50°C por 3 h, seguido de uma lavagem com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 50°C por 1 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M a 50°C por 0,8 h. Por fim o produto é lavado de novo com 40 mL de água.

Neste ensaio a aplicação da condição 1 teve como objetivo testar o efeito de uma pós incubação com álcool (etanol). Quando comparado com a condição aplicada no ensaio anterior em que a extração foi igual mas sem a pós incubação, conclui-se que este passo extra aumenta o conteúdo polimérico em cerca de 3,4% mas a recuperação desce 5,5%. É uma técnica que acrescenta um passo extrativo relativamente demorado mas que não traz claros benefícios.

A condição 2 visa explorar a possibilidade de diminuir a quantidade de soda necessária à extração. Utilizou-se a concentração que tinha obtido os melhores resultados no tratamento puramente básico (0,14 M com uma incubação de 4,3 h) *ex aequo* com o tratamento que se tem aplicado (0,84 M 0,8 h), desta feita utilizou-se o tempo de extração menor de 48 min. Como esperado obteve-se uma maior recuperação e um menor teor polimérico quando comparado com a condição correspondente com o tratamento básico mais concentrado. O teor polimérico obtido foi de $29,0 \pm 2,0\%$ e a recuperação de

37,6±1,4%.

Os resultados 3 e 4 foram obtidos a partir da biomassa IS201105 numa circunstância de temperatura mais elevada, 50°C. A condição 3 teve como objetivo testar uma digestão estritamente ácida a quente com a concentração e tempo de incubação que no ensaio anterior teve melhores resultados. Ainda assim obteve-se um conteúdo de PHA bastante inferior ao atingido com o tratamento misto apesar de demonstrar que é uma estratégia mais branda para o polímero degradando-o menos a temperaturas mais altas do que os tratamentos básicos à temperatura ambiente com uma recuperação de 40,5±4,4%. A última condição volta a demonstrar que a digestão básica com aquecimento é um tratamento extremamente agressivo para o polímero, esta degradação está patente na recuperação de apenas 20,1±3,1%.

Todas as estratégias aplicadas neste ensaio foram então descartadas.

O próximo objetivo para o qual se apontaram as baterias foi suprimir a lavagem intermédia entre os tratamentos ácidos e básicos, para simplificar o *scale-up*. Primeiro aplicou-se apenas uma condição num ensaio rápido de carácter exploratório e depois já se fizeram testes mais extensivos. Para este primeiro ensaio, com o objetivo de estudar a possibilidade de substituir a lavagem intermédia por uma neutralização, acertou-se o pH através da neutralização prática determinada experimentalmente no laboratório por titulação (com 9,6 mL de NaOH 2 M corrigindo o volume final com 0,4 mL de água perfazendo 30mL) e, incubou-se por 48 min a 30°C. Esta segunda incubação tem a característica de ter uma concentração de biomassa de 13,3 g/L ao invés dos 20g/L habituais (condição esta previamente otimizada). Os resultados obtidos estão espelhados na Figura 3.12

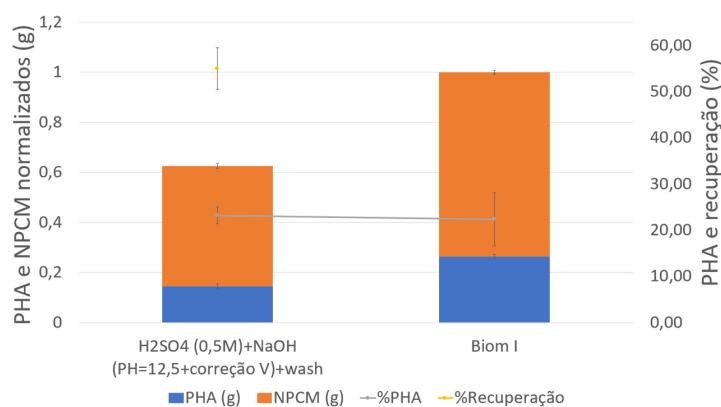


Figura 3.12: Ensaio 7: Biomassa (IS201105) sujeita a um teste extrativo.

Apesar de, em princípio, o NaOH adicionado ter neutralizado o ácido, uma medição do pH com o sensor não foi conclusiva variando a leitura sem estabilizar totalmente mas aproximando-se de um valor intermédio de 6,5; no entanto ao mergulhar uma fita indicadora de pH na mistura, o resultado atestou o carácter básico da mistura sugerindo um pH superior a 10. Esta dificuldade na leitura do sensor

verificou-se noutras amostras depois de terem sofrido uma incubação a 30°C pelo que em princípio será a leitura desviada. A extração teve como efeito um enriquecimento da biomassa inferior a um ponto percentual em termos de conteúdo polimérico (22,4% na BI e 23,2 no PdE) já a recuperação foi de 55,0%, bastante superior às recuperações atingidas nos ensaios anteriores (inferiores a 45%). Esta conjugação de resultados confirma que o efeito da digestão provém da concentração do reagente (neste caso o NaOH) e não meramente do pH já que nem as impurezas nem o material polimérico é degradado.

Tal como esperado, a extração não foi efetiva mas, ainda assim, estes testes constituíram uma boa fundação para os últimos testes com pré-incubação ácida. É ainda importante ainda referir que para este ensaio, ao contrário de todos os anteriores, o suporte para a extração foi alterado: em vez dos *falcon* de 50 mL, foram utilizados *nalgene* de 48 mL e fundo redondo.

Este ensaio teve que ser dividido em dois dias pelo que foram feitos dois controlos iguais entre si, o controlo 1 referente ao primeiro dia e o 2 ao segundo. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 3.13 e as condições aplicadas, ensaio na Tabela 3.10.

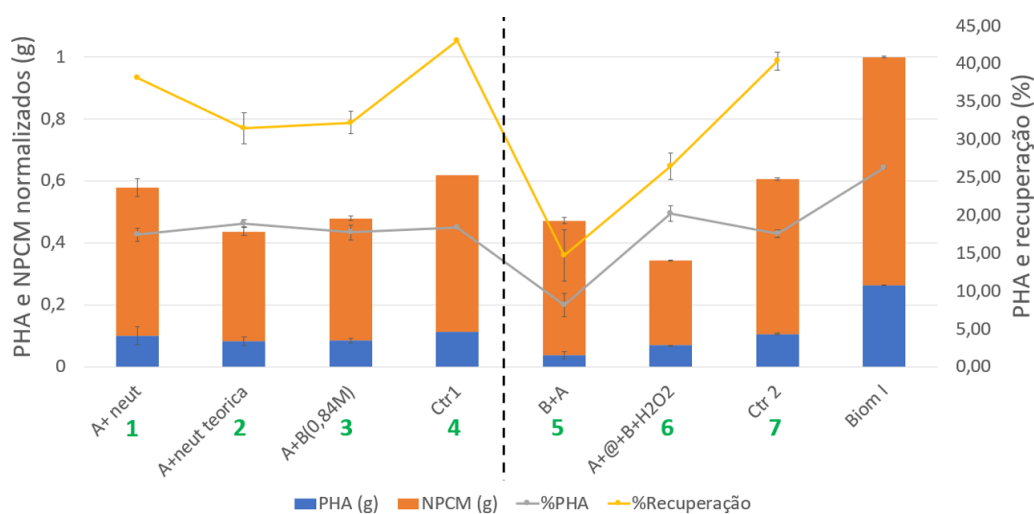


Figura 3.13: Ensaio 8: Biomassa (IS201105) sujeita a diferentes tipos de extração. No fim de todas as extrações há uma lavagem com 40 mL de água. A secção à esquerda refere-se aos testes efetuados no primeiro dia e à direita aos do segundo dia.

Tabela 3.10: Condições aplicadas no ensaio 8, quarto ensaio de otimização com uma incubação com ácido sulfúrico (A).

1	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, acertou-se o pH através da neutralização prática (9,6 mL de NaOH 2M). Segue-se uma incubação a 30°C por 0,8 h e lava-se o produto obtido com 40 mL de água.
2	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, acertou-se o pH através da neutralização teórica (10 mL de NaOH 2M). Segue-se uma incubação a 30°C por 0,8 h e lava-se o produto obtido com 40 mL de água.
3	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 30°C por 1 h, adicionou-se depois NaOH de forma a obter uma concentração final de 0,84 M de OH ⁻ (17,24 mL). A mistura é incubada a 30°C por 0,8 h e lava-se o produto obtido com 40 mL de água.
4	Pré-incubação com 20 mL água a 30°C por 1 h e, seguidamente, incubada com 40 mL de água a 30°C por 0,8 h. Por fim, lava-se o produto obtido com 40 mL de água.
5	Incubação com 20 mL de NaOH 0,84 M a 50°C por 0,8 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e submetido a uma pós-incubação com 20 mL de A 0,5 M por 1 h. Por fim o produto é lavado com 40 mL de água.
6	Pré-incubação com 20 mL de A 0,5 M a 50°C por 1 h, segue-se uma lavagem com 40 mL (água), o pellet é recolhido e incubado com 20 mL de NaOH 0,84 M e H ₂ O ₂ 2,5% a 30°C por 0,8 h. Por fim o produto é lavado de novo com 40 mL de água.
7	Pré-incubação com 20 mL água a 30°C por 1 h e, seguidamente, incubada com 40 mL de água a 30°C por 0,8 h. Por fim, lava-se o produto obtido com 40 mL de água.

Neste ensaio é importante esclarecer como cada condição foi aplicada, salientando algumas consequências das estratégias utilizadas e que diferenciam estes últimos dois ensaios de todos os referidos anteriormente.

Tal como está descrito na Tabela acima, nas condições 1,2 e 3 procedeu-se à aplicação de uma pré-incubação acídica com 20 mL de ácido sulfúrico 0,5 M. Ora este volume faz com que se obtenha uma concentração ótima de biomassa na mistura de 20 g/L já que a massa inicial pesada para cada *nalgene* foi de 400 mg. Agora na segunda incubação em qualquer um destes testes, o volume total é superior, já que apenas se adiciona uma certa quantidade de uma solução de NaOH 2M diluindo a concentração de biomassa: Para as segundas incubações temos então uma concentração de biomassa de:

- Condição 1: 13,5 g/L
- Condição 2: 13,3 g/L
- Condição 3: 10,7 g/L

Esta concentração vai diminuindo de condição para condição e desviando-se cada vez mais do valor ótimo.

Um dado ainda indicativo do efeito da adição da base é o valor do pH após a sua adição e depois da incubação. Estes valores são respetivamente 12,04 e 12,01 para a condição 1; 11,91 e 11,87 para a condição 2; 12,42 e 12,31 para a condição 3. Apesar destes valores terem sido medidos a quente o

que diminui a exatidão das medições, pode ver-se que o pH diminui sempre durante a incubação o que indica que parte dos iões OH^- reagem na digestão da MCNP.

Uma análise geral destes resultados permite verificar que este ensaio foi mal sucedido já que nenhuma das condições aplicadas resultou numa melhoria do teor polimérico em relação à biomassa inicial. No entanto as perdas de PHA foram muito superiores ao esperado tendo mesmo no caso dos controlos, perdendo cerca de 60% do polímero apenas pelo contacto com água, valor este superior aos 50% verificado anteriormente. Esta ineficiência de todas as extrações pode estar relacionada com a mudança de vaso de reação, a forma arredondada pode impactar o efeito da agitação traduzindo-se numa maior perda do polímero de interesse. Como o valor do conteúdo polimérico da biomassa inicial está de acordo com o que se espera, a perda de PHA ocorreu efetivamente. Ainda assim, apesar de estes resultados não serem comparáveis com os ensaios anteriores, é possível compará-los entre si.

Surpreendentemente, nos ensaios do primeiro dia, a melhor condição foi a nº2 onde se aplicou o acerto de pH com a neutralização teórica. Esperar-se-ia que a condição mais favorável seria a terceira onde a segunda incubação foi feita num ambiente básico bastante mais concentrado (0,84 M). Esta divergência prende-se pela diferença volumétrica na incubação em que a condição 3 mais desviada do valor óptimo de 20 g de biomassa/L. Entre a condição 1 e 2, o factor dominante que favorece a última é a maior quantidade de base adicionada, que compensa a ligeira diferença volumétrica que favorece a condição 1.

Em relação à segunda parte do ensaio, o objetivo já foi explorar novas alternativas mantendo a lavagem intermédia.

Os primeiros testes aplicados (5) tiveram um resultado muito interessante: ao trocar a ordem das incubações, incubação básica e pós-incubação ácida, a degradação do polímero é muito grande obtendo uma recuperação de apenas $14,7 \pm 3,3\%$. Tal acontece pois a incubação básica causa a disrupção da camada lipídica proteica que protege os grânulos de PHA, a ação do ácido que se segue, mesmo a "frio", causa degradação do polímero.

Por fim, a condição 6 foi a mais favorável do ensaio (teor polimérico de $20,24 \pm 1,0\%$ e recuperação de $26,5 \pm 1,7\%$) mas, como foi dito anteriormente não é possível comparar a eficácia desta extração com os anteriores.

3.3.5 Balanço geral e conclusões

Os primeiros ensaios com uma pré-incubação com ácido acético foram bastante prometedores tendo-se obtido no **Ensaio 2** o melhor resultado quando aplicada uma pré-incubação a quente (80°C) com uma mistura de ácido acético e peróxido de hidrogénio seguida de uma incubação à temperatura ambiente (30°C) com hidróxido de sódio tendo sido aplicada duas lavagens (20 mL), entre as incubações e no

final. O produto desta extração tinha um teor polimérico de $70,8 \pm 1,5\%$ e recuperou $33,7 \pm 1,8\%$ do polímero presente na biomassa inicial. Infelizmente esta foi também a extração mais bem sucedida de todos os ensaios em que participei com o produto mais puro.

Adaptando a estratégia ao objetivo de viabilizar a extração a nível industrial começou-se por definir a concentração de ácido sulfúrico a aplicar na pré-incubação. Das condições testadas 0,97M foi a mais favorável quando aplicada com o complemento da digestão básica mas preterida quando aplicada de forma isolada. Nesse cenário a condição mais diluída de 0,47 M destacou-se. Escolheu-se então 0,50 M como o valor a utilizar nas incubações subsequentes.

No **Ensaio nº 5** definiu-se o tempo da pré-incubação em 1 hora. Apesar de a caracterização dos produtos de extração não demonstrar claramente que esta incubação mais longa traz vantagens em relação a uma rápida incubação de 5 minutos, decidiu-se prolongar este passo para minimizar possíveis erros que seriam potenciados pela rápida pré-incubação. Ainda assim para efeitos de *scale-up* aplicar-se-ia uma incubação mais rápida.

Foi também neste ensaio que se obteve o melhor PdE nesta secção dos trabalhos onde se aplicou uma acidificação com ácido sulfúrico, pela condição 4, onde se empregou uma pré-incubação com ácido sulfúrico seguida de uma incubação com NaOH. Fizeram-se ainda duas lavagens (40 mL), entre as duas incubações e no final. O produto desta extração tinha um teor polimérico de $27,5 \pm 2,4\%$ e recuperou $40,3 \pm 3,1\%$ do polímero presente na biomassa inicial.

Este ensaio permitiu ainda concluir que qualquer lavagem ou centrifugação com descarga do sobrenadante acarreta menos perdas de material se for feita em ambiente básico.

Tendo sido esta a extração com melhor desempenho e que proporciona um aumento de escala simples foi ainda executada uma análise à natureza das impurezas nesta amostra. Os resultados estão retratados na Figura 3.14 e quantificados na Tabela 3.11.

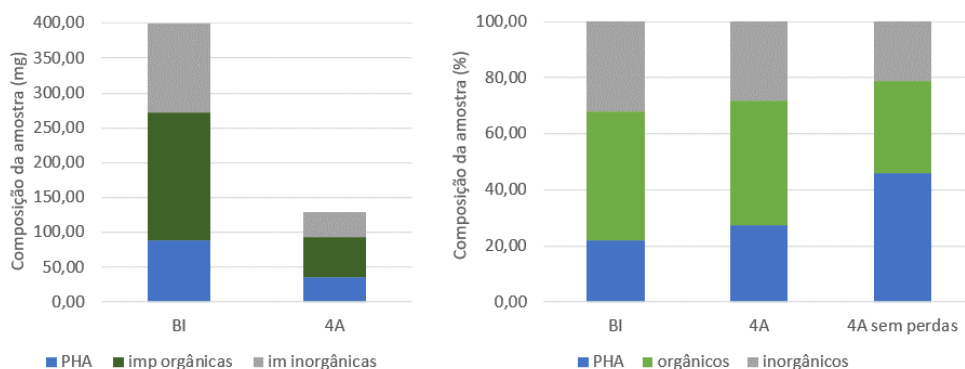


Figura 3.14: Análise quantitativa e qualitativa da natureza das amostras e das suas impurezas. No primeiro gráfico está demonstrado o efeito da degradação do processo extrativo desde a biomassa inicial (BI) ao produto da extração (4A).

O segundo grafismo permite comparar a composição das amostras; à esquerda está a biomassa inicial; no centro o produto da extração 4 do ensaio 5 (réplica A); à direita uma simulação da extração se metade do polímero inicial não estivesse numa forma solúvel e se mantivesse intacto.

Tabela 3.11: Caracterização da natureza do conteúdo das amostras e da simulação (sim) provenientes da análise retratada na Figura 3.14

	BI	4A	4A(sim)
%PHA	22,2	27,5	46,0
%Impurezas Orgânicas	45,7	44,2	33,0
%Impurezas Inorgânicas	32,1	28,3	21,0

Apesar de o conteúdo e tipo de impurezas se manter praticamente inalterado, não se pode considerar que a extração aplicada seja tão ineficiente como é sugerido, já que metade do polímero é perdido por estar degradado. Supondo que todo esse polímero se manteria intacto, simulou-se o resultado que se obteria, representado pela coluna mais à direita do gráfico à direita e que melhor representa o efeito da extração sobre as impurezas. Apesar de os resultados não poderem ser extrapolados de forma direta como foi feito no gráfico, já que se não existisse degradação prévia, o comportamento geral do polímero diferente; fica a simulação que indica que a extração aplicada degradou parte considerável da MCNP.

O ensaio que se seguiu, o nº 6, é um compêndio de sugestões fracassadas. Foi a partir destes resultados que se afastou por definitivo a proposta da digestão estritamente ácida.

Por fim, nos **Ensaio 7 e 8** testou-se a possibilidade de suprimir a lavagem intermédia entre as duas incubações antagónicas mas para além de não ter sido bem sucedida, os testes que visavam continuar a optimização da estratégia viável até então (5 e 6 do derradeiro ensaio) apresentaram valores muito abaixo do esperado impossibilitando a sua comparação com os resultados obtidos nos ensaios antecedentes.

Em geral a optimização da extração que permita um aumento de escala exequível de forma simples e rentável não foi bem sucedida. O método da digestão da MCNP é sugerido para facilitar a dissolução de impurezas que tipicamente copõem a minoria do biomaterial, contrapondo a técnica usual em que o polímero (tipicamente o material prevalente) é dissolvido e, posteriormente, recuperado. No entanto o teor polimérico inferior a 30% presente na biomassa recebida sugere que esta técnica não é a mais adequada uma vez que o PHA está presente em clara minoria.

Para além do mais, metade do polímero encontra-se numa forma solúvel pelo que é impossível ser recuperado através deste método já que será sempre perdido por arrastamento do material digerido. Deu-se o caso insólito de , para a maioria das condições aplicadas, a água de lavagem liofilizada ter um teor polimérico superior ao PdE.

Por estas particularidades do projeto, considero a tentativa da equipa NOVA para optimizar esta extração um esforço inglório que estava condenado ao fracasso desde o primeiro momento. A esperança residia na perspectiva do parceiro responsável pela produção conseguir optimizar a acumulação e reformular o processamento após a produção para que a biomassa chegasse enriquecida e o polímero

estivesse nas melhores condições aquando da sua chegada a Portugal. A acumulação não foi alterada e, para solucionar o último problema mencionado, foram feitos diversos testes nos quais a NOVA teve o papel de quantificar o polímero presente nas várias amostras enviadas e que abordarei brevemente na próxima secção.

3.4 Alterações no processamento da biomassa

Várias foram as amostras quantificadas com o objetivo de otimizar o processo na empresa parceira a montante, nomeadamente na fase de secagem onde, em princípio reside a principal fonte de degradação. Para muitas das amostras testadas não se sabia quais as condições aplicadas, para outras foi-nos disponibilizada a informação necessária para interpretar os resultados e averiguar sobre os progressos efetuados.

Na imagem 3.15 estão os resultados obtidos pela quantificação de amostras referentes a biomassas secas e depois lavadas num dos ensaios representativo tanto do tipo de alterações efetuadas como do impacto que têm no processo. A quantidade de polímero recuperada permite-nos inferir sobre o estado de degradação do polímero.

O tipo de secagem empregada e a aplicação ou não de uma lavagem estão descritos na Tabela 3.12.

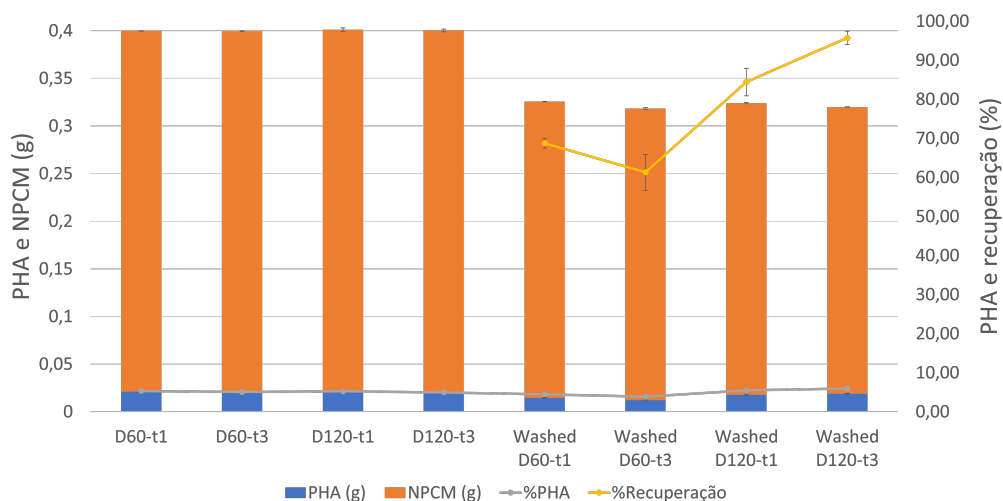


Figura 3.15: Quantificação do PHA das amostras no sentido de melhorar o processo produtivo.

Tabela 3.12: Processamento efetuado nas amostras analisadas. Secagem pelo parceiro produtor e lavagens NOVA.

D60-t1	Biomassa seca a 60°C com uma altura de filme de 1 cm
D60-t3	Biomassa seca a 60°C com uma altura de filme de 3 cm
D120-t1	Biomassa seca a 120°C com uma altura de filme de 1 cm
D120-t3	Biomassa seca a 120°C com uma altura de filme de 3 cm
Washed D60-t1	Biomassa seca a 60°C com uma altura de filme de 1 cm lavada
Washed D60-t3	Biomassa seca a 60°C com uma altura de filme de 3 cm lavada
Washed D120-t1	Biomassa seca a 120°C com uma altura de filme de 1 cm lavada
Washed D120-t3	Biomassa seca a 120°C com uma altura de filme de 3 cm lavada

Os conteúdos poliméricos deste ensaio variaram entre 3,87% e 5,93%, valores tão baixos que nada se pode concluir deste ensaio, as recuperações foram todas bastante elevadas entre 61,3 e 95,7%.

Desde que este tipo de testes começou que o teor polimérico das amostras passou a ser muito baixo, o que inviabilizou qualquer tipo de conclusão em relação à otimização ao processo. Como se esperava que o conteúdo se mantivesse ou até aumentasse, os padrões utilizados nas análises de quantificação de PHA por CG cobriam uma zona de concentração de PHB/PHV mais elevada, pelo que a maioria dos resultados obtidos estão já abaixo do padrão mais diluído. Este baixo conteúdo de PHA também significa que tanto o comportamento do sólido na secagem como as consequências imputadas ao polímero ocorrem de forma distinta em relação à biomassa utilizada pelo que qualquer conclusão atingida nestes ensaios teria, posteriormente, de ser confirmada replicando os testes numa biomassa com um maior teor polimérico.

Ainda assim, neste ensaio é possível observar uma tendência de aumento da recuperação para as amostras secas a 120°C, o que sugere que uma secagem mais rápida a uma temperatura relativamente elevada acaba por danificar menos o polímero do que uma secagem mais prolongada a uma temperatura inferior. A MCNP teve uma solubilização semelhante para as diferentes condições de secagem, indicativa de que este processamento não teve nenhum efeito de degradação considerável sobre as impurezas insulúveis ou, se houve degradação, esta ocorreu de igual forma.

Até ao momento da entrega deste trabalho, o cenário mantém-se idêntico sem qualquer sinal indicador de uma melhoria processual por parte do parceiro produtor.

3.5 Ensaio piloto

Enquanto estávamos ainda numa fase inicial da otimização da extração houve pressão por parte dos parceiros do projeto para fazer um ensaio à escala piloto, mesmo obtendo um produto de baixa qualidade, para que os parceiros a jusante no processo tivessem material para testar o seu método de processamento e aplicação final.

Para este ensaio utilizou-se uma extração com digestão puramente básica com NaOH (0,84 M) a

30°C por 0,8 h onde a biomassa se encontra numa concentração de 20 g/L seguido de uma lavagem. O objetivo é disponibilizar 1 kg de PdE para o parceiro a jusante na cadeia de valor poder utilizar, para tal partiu-se de 3 kg de biomassa. Como não existia biomassa IS201105 suficiente para este ensaio, misturaram-se vários *batches* selecionados dos que tinham maior teor de PHA. As biomassas selecionadas e a mistura final estão listadas na Tabela 3.13:

Tabela 3.13: Biomassa utilizada no ensaio piloto

Biomassa	Massa (kg)	%PHA
IS201130	0,38	25,5±2,0
IS201217-A1	0,68	27±8,5
IS201217-A-1&2	0,3	28,4±0,3
IS201217-NA-2&3	0,51	29,6±1,0
IS210112-NA-1&2	0,3	29±0,1
IS210112-NA-2	1,39	24,9±1,4
BI piloto	3,56	25,1

Com esta mistura de biomassas procedeu-se a dois ensaios, um primeiro de carácter exploratório para confirmar que toda a extração era efetuada de acordo com o planeado e, caso acontecesse algum imprevisto não se perder toda a biomassa disponível; e um segundo com uma maior quantidade de biomassa. Numa análise por CG posterior quantificou-se esta biomassa obtendo a %PHA a apresentada na Tabela 3.13, próxima do valor calculado com uma média ponderada a partir da mistura de biomassas, de 26,7%.



Figura 3.16: Reator utilizado para a extração do ensaio piloto. A: motor de agitação; B1-3 válvulas de descarga.

Para a primeira extração utilizou-se 1 kg de BI piloto e incubou-se com uma solução de 50 L de

NaOH 0,84 M e água da rede municipal com agitação no reator da Figura 3.16.

O produto da digestão recolhido foi centrifugado, realimentado ao reator e ressuspendido em 100L de água (concentração de 10 g de biomassa/L). Depois de a agitação cessar, o sólido sedimentou durante 15 min e mediu-se o pH do sobrenadante com uma fita lendo-se $11 < \text{pH} < 12$ o que sugere que ainda há uma presença de NaOH relevante na mistura. Procedeu-se então a uma nova lavagem, sem centrifugação; removeram-se 37,5 L de sobrenadante pela válvulas B1/2 e voltou-se a aferir o reator até aos 100L e agitou-se a mistura por 5 min. O pH do sobrenadante decresceu ligeiramente para aproximadamente 11 e o processo prosseguiu com uma sedimentação diretamente no vaso reacional desta feita, o sobrenadante foi retirado pelas válvulas B1/2 e, depois com uma bomba peristáltica. A transferência do produto da extração para os recipientes foi difícil pois o *design* do reator não era apropriado tendo-se perdido uma pequena parte do sólido de interesse nesta fase.

A mistura recolhida foi novamente centrifugada e o PHA purificado foi seco em tabuleiros a 55°C por aproximadamente 24 h.

Na aplicação deste protocolo constatou-se que na lavagem, o produto da primeira centrifugação não ficava totalmente ressuspendido notando-se alguns aglomerados aquando da retirada definitiva do material do reator. Como tal, pela perda de eficiência na lavagem e pelo moroso processo de centrifugação, decidiu-se suprimir o passo de centrifugação intermédio e substituí-lo por três lavagens extra, a aplicar na segunda extração.

Para a extração à escala piloto final aplicaram-se então a 2 kg de BI piloto digestão básica em 100 L de solução (concentração de 20 g de biomassa/L). Depois da digestão e de a biomassa digerida sedimentar no fundo do reator por 40 min, extraiu-se o excesso de solução pelas válvulas B1, B2 e com uma bomba peristáltica. Lavou-se o sólido 4 vezes ressuspendendo com 85 L de água (concentração de 23,5 g de biomassa/L) retirando sempre o excesso de sobrenadante pelas válvulas B1 e B2. Por fim o produto da extração foi centrifugado e seco procedendo de forma análoga à primeira extração.

Os produtos da extração foram analisados e quantificados estando os resultados expostos na Figura 3.17

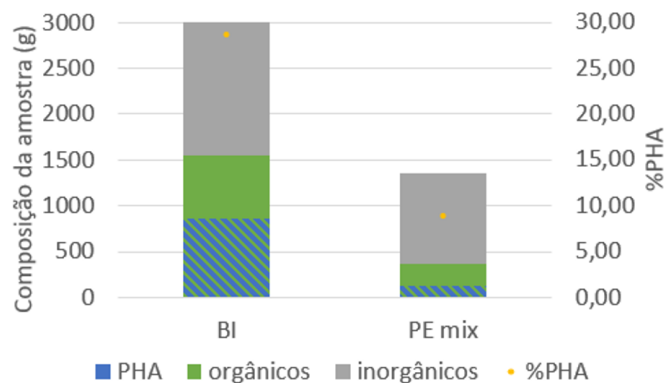


Figura 3.17: Resultados da análise da natureza de conteúdo e da quantificação de PHA da extração à escala piloto

A partir dos 3 kg da BI piloto, obtiveram-se 1348,60 g de PdE com $8,17 \pm 0,4\%$ de PHA provenientes das duas extrações. Apesar da estratégia extrativa a que a biomassa foi sujeita ter sido ligeiramente alterada, as análises que caracterizam os dois produtos de extração tiveram resultados praticamente iguais. Como seria de esperar, a extração foi pouco efetiva na digestão das impurezas inorgânicas visto que não houve nenhum pré-tratamento ácido que solubilize o carbonato de cálcio.

Ainda assim, nestes resultados, a característica desta extração que mais se destaca é a quantidade tão pequena de polímero que se conseguiu recuperar, tendo apresentado uma recuperação de apenas 22,1%, valor bastante inferior ao obtido no laboratório com a extração correspondente em que a recuperação excede os 35%. Esta diferença poderia estar relacionada com a degradação maior do que o esperado das biomassas aplicadas, até porque algumas não sofreram acidificação (identificadas com NA na Tabela 3.13). Para verificar se a fonte desta perda de PHA reside na degradação extra imputada aos batches utilizados fez-se um ensaio de lavagem da mistura de biomassas; lavou-se também o produto da extração para confirmar que a secagem aplicada não degradou ainda mais o polímero restante. Os resultados estão na Figura 3.18



Figura 3.18: Resultados da quantificação de PHA da extração à escala piloto e da lavagem das amostras, na Figura identificadas com o sufixo *washed*.

A lavagem da BI piloto resultou numa perda de 57,5% do polímero, ligeiramente superior aos habituais 50% mas ainda assim não é suficiente para justificar uma perda tão acentuada.

Outro resultado interessante e inesperado foi que o valor de conteúdo polimérico da BI ($18,0 \pm 1,8\%$) foi bastante inferior à média ponderada aplicada à mistura de biomassas que a constituem (26,7%). Esta drástica variação explica-se pela não homogeneidade das biomassas, que dificulta uma amostragem representativa.

A lavagem final aplicada ao produto da extração produziu uma redução de apenas 0,67%, diferença que se encontra dentro da margem de erro dos resultados. Demonstra-se então que a secagem aplicada não degradou o polímero purificado.

Outro fator que pode ter contribuído para as maiores perdas do material de interesse neste ensaio reside nas próprias características de uma extração à escala piloto. Em primeiro lugar é um ensaio em que é mais difícil controlar todas as condições em relação a um ensaio laboratorial, o que abre espaço para uma maior fonte de erros. Depois, neste ensaio houve um maior número de trocas de recipiente para transferir a biomassa para a centrífuga ou até voltando a realimentá-la ao reator, para além do rendimento da centrifugação que é mais uma fonte de perdas relevante, já que o sobrenadante descartado apresentava uma turbidez considerável.

Foi então um ensaio em que o produto final tinha uma pureza e conteúdo polimérico muito baixo (%PHA inferior à da BI) mas ainda assim conseguiu-se obter a massa de produto necessária para fornecer ao parceiro a jusante.

3.6 Secagem do PHA extraído

Apesar de a extração não estar otimizada fizeram-se ensaios preliminares para estudar o método de secagem a executar no fim do processo de extração. A composição do produto não é ainda semelhante a um eventual PHA purificado que viabilize o *scale up*, no entanto pode já estudar-se o impacto da secagem sobre a qualidade do polímero. É importante ainda referir que para os ensaios conduzidos a 60 e a 70°C, dois dos três tabuleiros da estufa estavam ocupados com uma grande quantidade de biomassa a secar. Esta particularidade torna a humidade do ambiente de secagem muito elevada, tanto que a água ia condensando e pingando para o exterior na zona da dobradiça da porta.

A extração sobre a qual se trabalhou nestes testes foi a que apresentou melhores resultados no último ensaio extrativo (nº 8), onde se aplicou uma pré incubação ácida com ácido sulfúrico, seguindo-se uma neutralização com dosagem teórica de NaOH após a qual se voltou a aplicar uma incubação e, por fim, uma lavagem com água. Foram aplicadas três condições de extração distintas, incluindo uma delas, um pós-tratamento:

- **Ctrl:** Condição controlo em que se aplicou a uma pré-incubação acídica com 20 mL de A 0,5 M (por 1 h a 30°C) seguida de uma neutralização teórica (com 10 mL de NaOH 2 M), incubou-se a mistura básica (por 0,8 h a 30°C) e, por fim, lavou-se o produto com 20 mL de água.
- **EtOH:** Pré-incubação acídica com 20 mL de A 0,5 M (por 1 h a 30°C) seguida de uma neutralização teórica (com 10 mL de NaOH 2M), incubou-se a mistura básica (por 0,8 h a 30°C) e por fim lavou-se o produto com 20 mL de etanol (70%).
- **MW:** Pré-incubação acídica com 20 mL de A 0,5 M (por 1 h a 30°C) seguida de uma neutralização teórica (com 10 mL de NaOH 2M), incubou-se a mistura básica (por 0,8 h a 30°C) e depois lavou-se o produto com 20 mL de água. Por fim, imediatamente antes da secagem, aplicou-se um aquecimento no micro-ondas (duração variável consoante o ensaio).

No primeiro ensaio a secagem foi feita a 70°C, cada amostra foi colocada numa placa de petri e distribuída na forma de um disco compacto com 3 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura. Na condição que implica o tratamento com o micro-ondas ^[129,130], o polímero foi sujeito a um tratamento de 6 minutos.

A curva de secagem foi construída por pesagens sequenciais e apresenta-se na Figura (3.20):

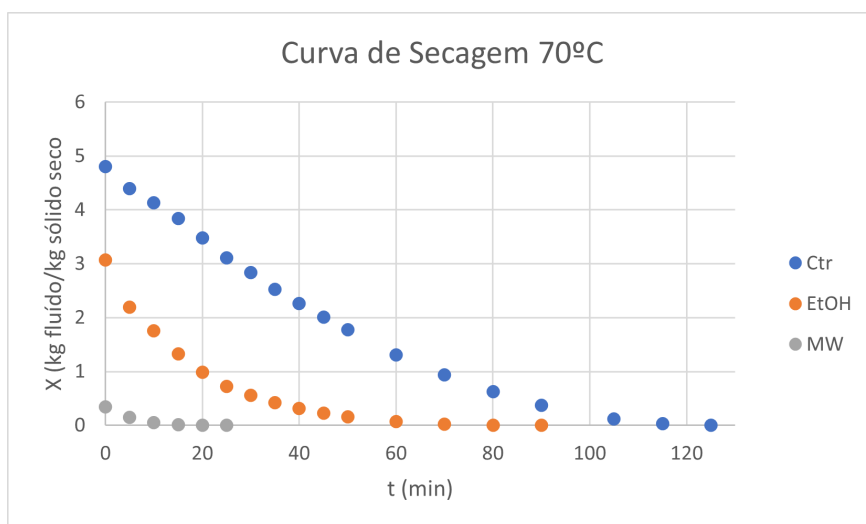


Figura 3.19: Curva de secagem a 70°C.

Para este ensaio, foi determinada *a priori* na balança de secagem a humidade (X) inicial para cada amostra, tendo-se determinado como 86,1% para as amostras Ctr e MW e de 65,0% (X de etanol) para a amostra EtOH, no entanto as massas secas finais obtidas foram bastante desfasadas da estimativa calculada a partir destes valores. Em nenhuma das amostras foi identificado um período de adaptação pois é muito pequeno quando comparado com a escala imposta pelo processo de secagem, particularidade transversal a todos os ensaios. Apenas a amostra Ctr apresentou um período com velocidade de secagem constante ($R=0,058 \text{ kg H}_2\text{O}\cdot\text{kg sólido seco}^{-1}\text{min}^{-1}$) com uma X_c de aproximadamente 1,31 kg $\text{H}_2\text{O}/\text{kg sólido seco}$. Tanto a amostra EtOH como MW têm uma X inicial inferior a X_c , logo, a velocidade de secagem é sempre decrescente.

Atingiu-se uma X de aproximadamente 0 ao minuto 115 para a amostra Ctr, 60 para a amostra EtOH e 10 para a MW. Ainda assim a amostra MW tem uma massa inicial de PdE bastante menor pois o prolongado pré-tratamento no micro-ondas fez com que uma parte considerável do sólido fosse projetado da caixa, logo não é um resultado que permita comparar esta técnica com as restantes.

No segundo ensaio, a secagem foi conduzida a 60°C, cada amostra a secar foi colocada numa placa de petri e distribuída na forma de um disco compacto com 0,5 cm de altura. O diâmetro do sólido húmido foi de 4,5 cm para as amostras MW e EtOH e de 3,5 cm para a amostra Ctr. Na condição MW foi aplicado um pré-tratamento da secagem com um micro-ondas por 1,5 min com uma tampa que não permitiu que a biomassa fosse projetada para fora. Foi determinado o conteúdo de humidade inicial na balança de secagem obtendo-se 85,4% para as amostras lavadas com água e 74,7% para amostra com etanol.

A curva de secagem foi construída por pesagens sequenciais e apresenta-se na Figura 3.20.

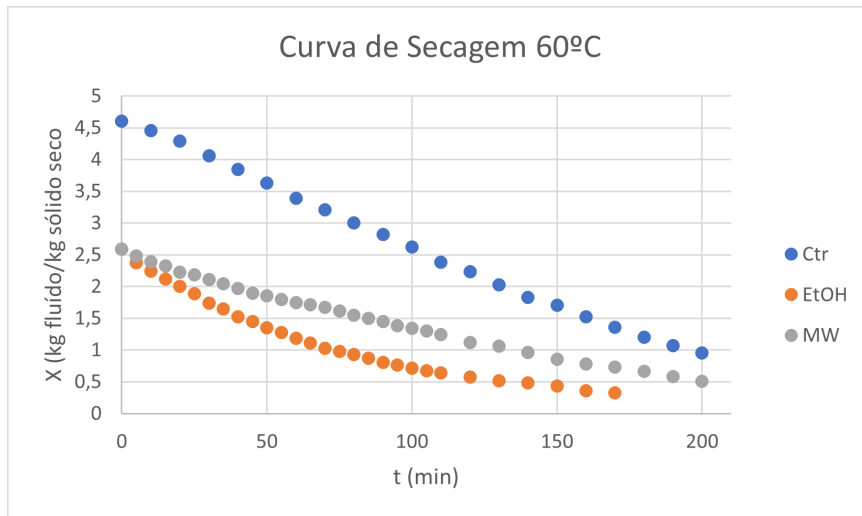


Figura 3.20: Curva de secagem a 70°C.

Desta feita, apesar de ser aplicada uma temperatura apenas 10°C inferior à do primeiro ensaio, a velocidade da secagem é muito mais lenta. Não se conseguiu aplicar a secagem até ao fim pois, por razões de segurança, não me foi permitido permanecer sozinho mais tempo no laboratório para terminar o ensaio.

Para as amostras Ctr e MW não se encontrou claramente nenhum ponto de inflexão indicativo da X_c , já para a amostra EtOH atingiu-se a humidade crítica de $1,53 \text{ kg H}_2\text{O} \cdot \text{kg sólido seco}^{-1}$, na zona de velocidade de secagem constante, $R=0,027 \text{ kg H}_2\text{O} \cdot \text{kg sólido seco}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Para a condição Ctr a velocidade de secagem foi de $0,018 \text{ kg H}_2\text{O} \cdot \text{kg sólido seco}^{-1} \text{ min}^{-1}$; para a MW de $0,010 \text{ kg H}_2\text{O} \cdot \text{kg sólido seco}^{-1} \text{ min}^{-1}$

A amostra de MW mesmo com a tampa perdeu uma pequena parte do sólido que aderiu de tal forma à cobertura que não foi possível voltar a juntar ao bolo na sua totalidade, ainda assim foi uma fração de sólido muito mais pequena em comparação com a massa perdida no primeiro ensaio. Quando comparado o resultado desta amostra com a Ctr é possível concluir que o tratamento no micro-ondas lhe confere uma humidade inicial bastante inferior (4,61 para 2,59 kg de $\text{H}_2\text{O}/\text{kg}$ sólido seco) mas ao longo do tempo, o diferencial na velocidade de secagem faz com que esta dissimilitude fique esbatida.

Para o último ensaio testou-se a secagem a 105°C, já que a literatura e os ensaios de optimização da secagem por parte do parceiro produtor (Figura 3.15) sugerem que uma secagem rápida a uma temperatura mais elevada permite uma maior conservação do polímero. Cada amostra foi colocada numa placa de petri e distribuída na forma de um disco compacto com 4 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura. Na condição MW foi aplicado um pré-tratamento da secagem com um micro-ondas por 1,5 min com uma tampa que não permitiu que a biomassa fosse projetada para fora. Foi determinado o conteúdo de humidade inicial na balança de secagem obtendo-se 83,2% para as amostras lavadas com

água e 68,4% para amostra com etanol.

A curva de secagem foi construída por pesagens sequenciais e apresenta-se na Figura 3.21.

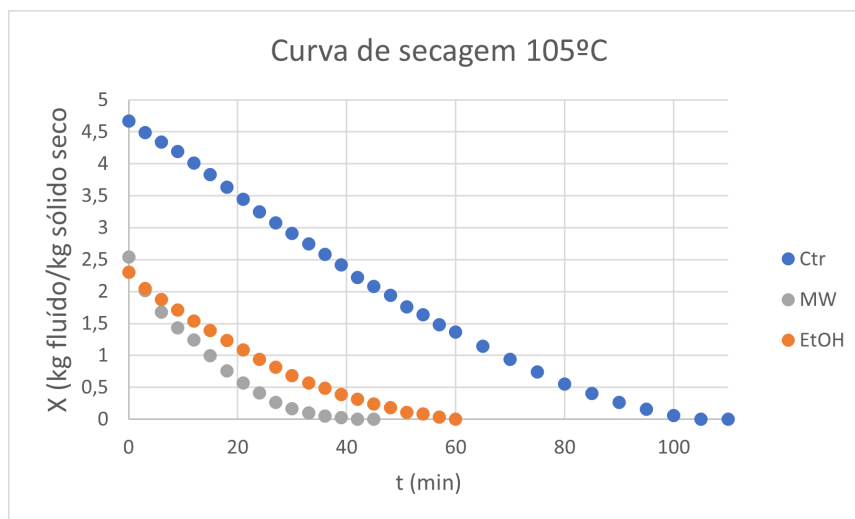


Figura 3.21: Curva de secagem a 105°C.

Os resultados foram surpreendentes, na medida em que esta secagem a 105°C não foi muito mais rápida do que no ensaio a 70°C, mesmo considerando que a massa aplicada nas amostras é um pouco maior.

Neste ensaio o pré-aquecimento com micro-ondas permitiu que esta fosse a secagem mais rápida com uma velocidade de secagem até à humidade crítica ($X_c=0,57$ kg H₂O·kg sólido seco⁻¹) de 0,09 kg H₂O·kg sólido seco⁻¹min⁻¹, secando completamente depois de 33 min.

A amostra lavada com etanol teve um período de secagem constante a $R=0,05$ kg EtOH·kg sólido seco⁻¹min⁻¹ decrescendo depois de atingir X_c para uma humidade de 0,81 kg EtOH·kg sólido seco⁻¹ decrescendo depois a velocidade de secagem até ao fim do processo após 54 min de tratamento.

Por fim, a condição Ctr apresenta a maior X inicial e é também a última amostra a secar completamente, tal como acontece em todos os ensaios já que é a única amostra cujo processamento pré-secagem não sofreu nenhuma alteração para acelerar este passo. O período de velocidade de secagem constante com $R= 0,05$ kg H₂O·kg sólido seco⁻¹min⁻¹ é bastante dominante estendendo-se pela secagem até atingir o ponto de humidade crítica a aproximadamente 1,37 kg H₂O·kg sólido seco⁻¹. A amostra fica totalmente seca depois de 100 min.

Este ensaio teve um carácter meramente exploratório e o seu principal objetivo foi averiguar sobre a degradação imputada pelas diferentes secagens. No entanto, as análises que permitiriam concluir sobre esse assunto não puderam ser concretizadas pois o aparelho de CG avariou no início de agosto de 2021 continuando indisponível até ao fim dos trabalhos.

Também se consideram que os resultados deste ensaio não são extrapoláveis para a aplicação destas estratégias em maior escala já que a secagem foi feita aplicada a discos relativamente pequenos de PdE enquanto em grande escala seriam sempre placas maiores pelo que seria necessário a implementação de um sistema de agitação mecânica que altera completamente a forma como os fenómenos de transferência de massa ocorrem.

Ainda assim, estes ensaios mesmo com algumas características que dificultam a comparação entre si, permitiu avaliar as estratégias aplicadas.

Nas zonas de velocidade de secagem constante=R, as amostras lavadas com etanol perdem humidade mais rapidamente já que o etanol é mais volátil que a água. As amostras com a segunda velocidade de secagem constante maior foram as Ctr pois entram na estufa com uma X inicial superior, logo, a força motriz do processo de secagem (a pressão de vapor exercida pela humidade contida no sólido) é mais forte.

Foi ainda possível quantificar o conteúdo em PHA das amostras utilizadas no primeiro ensaio (70°C). Os resultados dessa quantificação estão descritos na Figura 3.22.

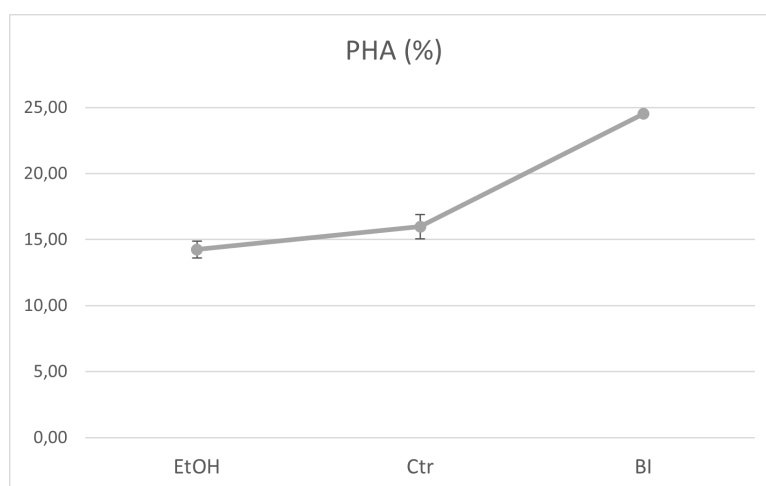


Figura 3.22: Caracterização do PdE aplicado no primeiro ensaio de secagem (70°C)

Estes resultados estão alinhados com o ensaio extrativo nº 8, que indica que a lavagem com etanol traz uma maior ineficiência à extração, traduzindo-se numa redução do conteúdo polimérico final de 1,73% o que, para conteúdos tão baixos, tem um grande impacto. Esta contrariedade associada à maior complexidade da secagem com etanol, que envolve obrigatoriamente uma estratégia de recuperação deste vapor, e o maior custo deste líquido em comparação com a água permite-nos concluir que não é uma estratégia favorável.

As amostras que sofreram um pré-tratamento no micro-ondas (MW), apresentaram um disco desfeito (3.23) pelo que o rácio massa/área de contacto diminuiu favorecendo a secagem.

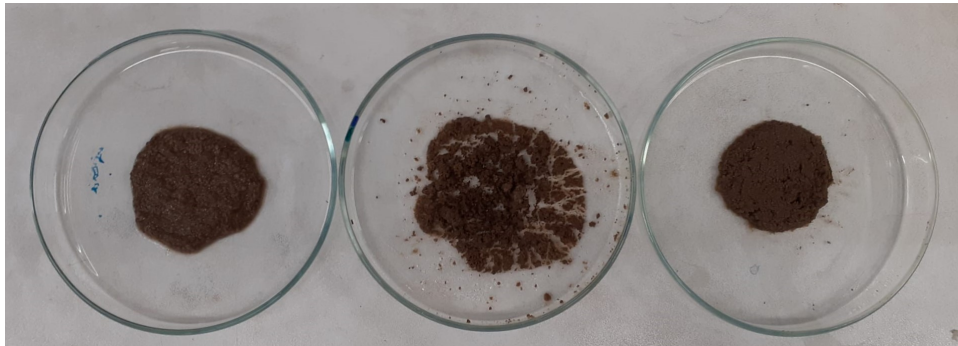


Figura 3.23: Fotografia das amostras de secagem referente ao ensaio a 105°C. Da esquerda para a direita: Ctr, MW e EtOH

Esta característica faz com que os resultados obtidos sejam pouco fiáveis e extrapoláveis. O pré-tratamento com micro-ondas também demonstrou ser uma técnica pouco prática em termos de viabilização de um aumento de escala pois para que o tratamento ser efetivo, uma grande quantidade de sólido é projetado sendo uma técnica difícil de aplicar.

Em termos de uma análise estritamente das curvas de secagem aliado a estas considerações mencionadas anteriormente, a melhor condição de secagem seria a que corresponde à amostra Ctr a 70°C sem qualquer pré-tratamento. No entanto, é essencial averiguar quanto à degradação imputada pelo tratamento térmico já que é aconselhado aplicá-lo a uma temperatura inferior a 60°C para reduzir o impacto na degradação [114].

4

Conclusão e perspectivas futuras

Não foi possível desenvolver um processo ecológico para extrair o polímero de interesse da biomassa disponível que viabilizasse o aumento da escala do processo.

As tentativas de otimização foram claramente condicionadas pelas características da biomassa aliadas à estratégia de extração que assenta na digestão da MCNP que está desenvolvida para extrair PHA a partir de biomassas com elevado conteúdo polimérico [61,100]. Para além disso, a decisão do parceiro produtivo de suprimir o enriquecimento do substrato em ácidos gordos voláteis introduz uma elevada variação em termos de fonte de carbono disponível para os microrganismos produtores de PHA, comprometendo assim a reprodutibilidade geral do processo produtivo inviabilizando o sucesso deste ao nível industrial.

Ainda assim conseguiu-se PHA com uma pureza de $70,8 \pm 1,5\%$ e uma recuperação de $46,7 \pm 0,7\%$ quando extraído com uma pré-incubação com ácido acético e peróxido de hidrogénio seguida de uma digestão básica (condição 2 do 2º ensaio). No entanto este tipo de extração não viabiliza claramente um aumento de escala.

Na bateria de ensaios cujas condições viabilizam o *scale-up*, a melhor condição foi a nº 5 do ensaio 5 obtendo-se um produto com um conteúdo de PHA de $27,5 \pm 2,4\%$ e recuperou $40,3 \pm 3,1\%$ do polímero de interesse presente na biomassa inicial.

A qualidade do polímero purificado apresenta uma massa molecular relativamente baixa (inferior a 80 000 g/mol) e o conteúdo de PHV é relativamente elevado. Tipicamente o PHBV contém entre 10 e 20% de PHV, neste caso tem aproximadamente 30% o que lhe confere uma elevada ductilidade e baixa robustez [17,21–23]. Dadas estas características, as aplicações do PHA de interesse ficam muito restringidas.

É ainda importante referir que a técnica de quantificação do polímero aplicada, cromatografia gasosa (CG) é uma técnica bastante sensível sendo que a mesma amostra quando analisada em diferentes corridas apresenta resultados com desvios substanciais entre si, como se pode ver pelo valor de conteúdo polimérico da biomassa inicial IS201105 analisada em praticamente todas as corridas referidas nesta dissertação e que varia entre 22,96 e 33,20%.

Para reduzir os erros que esta técnica acarreta é utilizado um padrão interno (HD) que tem uma importância de relevo já que o solvente utilizado é muito volátil, ao utilizá-lo, o impacto da evaporação de clorofórmio no erro na determinação do rácio entre as concentrações monoméricas é minimizado. O perfil de aquecimento do cromatógrafo tem uma variação de perfil isocrático, com uma zona central onde a variação da força motriz é menor. Esta região é onde se espera que os componentes de interesse sejam reconhecidos e assim garantir uma maior margem entre os mesmos, com picos mais separados e definidos, mais fácil e preciso será o seu reconhecimento e quantificação.

Procedeu-se ainda a um ensaio à escala piloto aplicando uma digestão puramente básica, onde se confirmou a tendência já conhecida na comunidade científica de que num ensaio em maior escala existe

uma dificuldade acrescida no controlo das variáveis, perdendo-se uma maior quantidade de polímero quando comparado uma extração semelhante à escala laboratorial.

Em termos de secagem fizeram-se apenas ensaios preliminares que permitiram descartar duas estratégias de processamento que visavam facilitar a secagem: uma lavagem no fim da extração com etanol, líquido mais volátil do que a água e um pré-aquecimento com micro-ondas. A temperatura favorecida foi a de 70°C, secando a amostra controlo (Ctr) em 115 minutos, a secagem a 105°C foi apenas 13% mais rápida secando completamente em 100 min. O ensaio em que se aplicou o processamento a 60°C foi manifestamente mais lento tendo sido interrompido aos 200 minutos com uma humidade ainda considerável.

No âmbito do projeto no qual este trabalho se inclui, é pouco provável que se consigam obter resultados prometedores já que para isso seria necessário que o parceiro produtor fosse bem sucedido nos seus esforços para melhorar a acumulação e a secagem sendo que o único impacto positivo dos ensaios de adaptação do processo foi a redução do conteúdo de PHV para valores entre os 20 e os 30%. Sem melhorias significativas na primeira fase do processo, não há condições para que as fases subsequentes consigam resultados que excedam as expectativas.

Ainda assim este tipo de estratégia extrativa ecológica tem dado mostras de sucesso por todo o mundo, inclusive no grupo BIOENG da NOVA ID quando aplicado a biomassas com elevados teores poliméricos. Apesar de este projeto não ter conseguido, ainda, obter resultados positivos, não significa que a digestão da MCNP e, especificamente, a digestão básica, não seja um método com potencial e acredito que poderá mesmo ser prevalente na indústria do PHA dentro de alguns anos.

Bibliografia

- [1] “Bioplastics market data, in: European bioplastics e.v.” <https://www.european-bioplastics.org/market/>, 2020, consultado a 09/08/2021.
- [2] “Bioplastics market data report (short version)in: European bioplastics e.v.” https://docs.european-bioplastics.org/conference/Report_Bioplastics_Market_Data_2020_short_version.pdf, 2020, consultado a 09/08/2021.
- [3] Z. A. Raza, S. Abid, and I. M. Banat, “Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications,” *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 126, no. January 2017, pp. 45–56, 2018.
- [4] G. Pagliano, P. Galletti, C. Samorì, A. Zaghini, and C. Torri, “Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, no. February, pp. 1–28, 2021.
- [5] B. Kennedy, “*History 101*, temporada 1, episódio 4, plastics,” 2020.
- [6] PlasticsEurope, “Plastics - the facts 2020,” 2020.
- [7] D. Carrington, “Microplastics revealed in the placentas of unborn babies,” 22 Dez, 2020.
- [8] E. Commission, “A european strategy for plastics. tech. rep.” 2018.
- [9] ““a line in the sand- ellen macarthur foundation launches new plastics economy global commitment to eliminate plastic waste at source,” <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/news/a-line-in-the-sand-ellen-macarthur-foundation-launch-global-commitment-to-eliminate-plastic-pollution-at-the-source>, 2018, consultado a 09/08/2021.
- [10] Portugal, “Lei n.º 77/2019. disponibilização de alternativas à utilização de sacos de plástico ultraleves e de cusetes em plástico nos pontos de venda de pão, frutas e legumes;,” *Diário da República*, 2019, consultado a 09/08/2021. [Online]. Available: <https://dre.pt/home/-/dre/124346828/details/maximized>

- [11] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, and F. Schué, "Terminology for biorelated polymers and applications (iupac recommendations 2012)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, 2012.
- [12] S. Lambert and M. Wagner, "Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead," *Chemical Society Reviews*, vol. 46, no. 22, pp. 6855–6871, 2017.
- [13] "Facts and figures- european bioplastics," https://www.docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Facts_and_figures.pdf, 2019, consultado a 10/08/2021.
- [14] S. Y. Lee, "Plastic bacteria? progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria," *Trends in Biotechnology*, vol. 14, no. 11, pp. 431–438, 1996.
- [15] G. Brauneegg, G. Lefebvre, and K. F. Genser, "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects," *Journal of Biotechnology*, vol. 65, no. 2-3, pp. 127–161, 1998.
- [16] J.-Y. Chee, S.-S. Yoga, N.-S. Lau, S.-C. Ling, R. M. Abed, and K. Sudesh, "Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (pha): converting renewable resources into bioplastics," *Current research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2, pp. 1395–1404, 2010.
- [17] M. Reis, M. Albuquerque, M. Villano, and M. Majone, *Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks*, second ed. Elsevier B.V., 2011, vol. 6. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00464-5>
- [18] K. Sudesh, H. Abe, and Y. Doi, "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters," *Progress in Polymer Science*, vol. 25, no. 10, pp. 1503–1555, 2000.
- [19] T. Cooper, "Developments in bioplastic materials for packaging food, beverages and other fast-moving consumer goods," *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods*, pp. 108–152, 2013.
- [20] J. Lu, R. C. Tappel, and C. T. Nomura, "Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates)," *Journal of Macromolecular Science®, Part C: Polymer Reviews*, vol. 49, no. 3, pp. 226–248, 2009.
- [21] T. Keshavarz and I. Roy, "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 321–326, 2010.
- [22] S. Bayarı and F. Severcan, "Ftir study of biodegradable biopolymers: P (3hb), p (3hb-co-4hb) and p (3hb-co-3hv)," *Journal of Molecular Structure*, vol. 744, pp. 529–534, 2005.

- [23] Y. Wang, R. Chen, J. Cai, Z. Liu, Y. Zheng, H. Wang, Q. Li, and N. He, "Biosynthesis and thermal properties of phbv produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [24] G.-Q. Chen, "A microbial polyhydroxyalkanoates (pha) based bio-and materials industry," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 8, pp. 2434–2446, 2009.
- [25] Muhammadi, Shabina, M. Afzal, and S. Hameed, "Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications," *Green Chemistry Letters and Reviews*, vol. 8, no. 3-4, pp. 56–77, 2015.
- [26] E. Akaraonye, T. Keshavarz, and I. Roy, "Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 85, no. 6, pp. 732–743, 2010.
- [27] C. Reddy, R. Ghai, V. Kalia *et al.*, "Polyhydroxyalkanoates: an overview," *Bioresource Technology*, vol. 87, no. 2, pp. 137–146, 2003.
- [28] X. Gao, J.-C. Chen, Q. Wu, and G.-Q. Chen, "Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 768–774, 2011.
- [29] J. Zhang, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova, L. F. da Silva, and G.-Q. Chen, "Polyhydroxyalkanoates (pha) for therapeutic applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 86, pp. 144–150, 2018.
- [30] B. H. Rehm, "Polyester synthases: natural catalysts for plastics," *Biochemical Journal*, vol. 376, no. 1, pp. 15–33, 2003.
- [31] M. Koller, "Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (pha): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications," *Molecules*, vol. 23, no. 2, p. 362, 2018.
- [32] Z.-W. Dai, X.-H. Zou, and G.-Q. Chen, "Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion," *Biomaterials*, vol. 30, no. 17, pp. 3075–3083, 2009.
- [33] C. W. Pouton and S. Akhtar, "Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 18, no. 2, pp. 133–162, 1996.
- [34] T. Volova, E. Shishatskaya, V. Sevastianov, S. Efremov, and O. Mogilnaya, "Results of biomedical investigations of phb and phb/phv fibers," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 16, no. 2, pp. 125–133, 2003.

- [35] S. Y. Lee, J.-i. Choi, and H. H. Wong, "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 25, no. 1-3, pp. 31–36, 1999.
- [36] E. Grothe, M. Moo-Young, and Y. Chisti, "Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, no. 1-2, pp. 132–141, 1999.
- [37] A. Steinbüchel and T. Lütke-Eversloh, "Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 16, no. 2, pp. 81–96, 2003.
- [38] H. Pakalapati, C. K. Chang, P. L. Show, S. K. Arumugasamy, and J. C. W. Lan, "Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 126, no. 3, pp. 282–292, 2018.
- [39] J.-i. Choi and S. Y. Lee, "Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation," *Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 6, pp. 335–342, 1997.
- [40] G. N. Lee and J. Na, "Future of microbial polyesters," *Microbial Cell Factories*, vol. 12, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [41] W. N. Chaudhry, N. Jamil, I. Ali, M. H. Ayaz, and S. Hasnain, "Screening for polyhydroxyalkanoate (pha)-producing bacterial strains and comparison of pha production from various inexpensive carbon sources," *Annals of Microbiology*, vol. 61, no. 3, pp. 623–629, 2011.
- [42] G. Mannina, D. Presti, G. Montiel-Jarillo, J. Carrera, and M. E. Suárez-Ojeda, "Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review," *Bioresource Technology*, vol. 297, no. October 2019, p. 122478, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>
- [43] F. Valentino, F. Morgan-Sagastume, S. Campanari, M. Villano, A. Werker, and M. Majone, "Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers," *New Biotechnology*, vol. 37, pp. 9–23, 2017.
- [44] M. Saavedra del Oso, M. Mauricio-Iglesias, and A. Hospido, "Evaluation and optimization of the environmental performance of PHA downstream processing," *Chemical Engineering Journal*, no. July, p. 127687, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127687>
- [45] C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H. N. Gavala, and M. A. Reis, "Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production," *Bioengineering*, vol. 4, no. 2, pp. 1–43, 2017.

- [46] M. R. Kosseva and E. Rusbandi, "Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 107, pp. 762–778, 2018.
- [47] M. Koller, "Advances in polyhydroxyalkanoate (pha) production," *Bioengineering*, 2017.
- [48] M. Albuquerque, C. Torres, and M. Reis, "Polyhydroxyalkanoate (pha) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection," *Water Research*, vol. 44, no. 11, pp. 3419–3433, 2010.
- [49] J. M. Dias, P. C. Lemos, L. S. Serafim, C. Oliveira, M. Eiroa, M. G. Albuquerque, A. M. Ramos, R. Oliveira, and M. A. Reis, "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product," *Macromolecular Bioscience*, vol. 6, no. 11, pp. 885–906, 2006.
- [50] C. S. Oliveira, C. E. Silva, G. Carvalho, and M. A. Reis, "Strategies for efficiently selecting pha producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities," *New Biotechnology*, vol. 37, pp. 69–79, 2017.
- [51] G. Montiel-Jarillo, J. Carrera, and M. E. Suárez-Ojeda, "Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of ph and n and p concentrations," *Science of the Total Environment*, vol. 583, pp. 300–307, 2017.
- [52] L. Marang, Y. Jiang, M. C. van Loosdrecht, and R. Kleerebezem, "Impact of non-storing biomass on pha production: an enrichment culture on acetate and methanol," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 71, pp. 74–80, 2014.
- [53] W. Tu, D. Zhang, and H. Wang, "Polyhydroxyalkanoates (pha) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by mixed microbial cultures: the link between phosphorus and pha yields," *Waste Management*, vol. 96, pp. 149–157, 2019.
- [54] L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. G. Albuquerque, and M. A. Reis, "Strategies for pha production by mixed cultures and renewable waste materials," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, no. 4, pp. 615–628, 2008.
- [55] M. Albuquerque, V. Martino, E. Pollet, L. Avérous, and M. Reis, "Mixed culture polyhydroxyalkanoate (pha) production from volatile fatty acid (vfa)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on pha productivity, composition and properties," *Journal of Biotechnology*, vol. 151, no. 1, pp. 66–76, 2011.

- [56] G. Carvalho, A. Oehmen, M. G. Albuquerque, and M. A. Reis, "The relationship between mixed microbial culture composition and pha production performance from fermented molasses," *New Biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 257–263, 2014.
- [57] S. Bengtsson, A. R. Pisco, P. Johansson, P. C. Lemos, and M. A. Reis, "Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures," *Journal of Biotechnology*, vol. 147, no. 3-4, pp. 172–179, 2010.
- [58] P. C. Lemos, L. S. Serafim, and M. A. Reis, "Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding," *Journal of Biotechnology*, vol. 122, no. 2, pp. 226–238, 2006.
- [59] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, and P. Lant, "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates," *Progress in Polymer Science*, vol. 38, no. 3-4, pp. 536–583, 2013.
- [60] C. Du, J. Sabirova, W. Soetaert, and S. Ki Carol Lin, "Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials," *Current Chemical Biology*, vol. 6, no. 1, pp. 14–25, 2012.
- [61] M. Koller, H. Niebelschütz, and G. Braunegg, "Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass," *Engineering in Life Sciences*, vol. 13, no. 6, pp. 549–562, 2013.
- [62] M. Koller, D. Sandholzer, A. Salerno, G. Braunegg, and M. Narodoslawsky, "Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly (hydroxyalkanoates) from whey," *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 73, pp. 64–71, 2013.
- [63] Y. Jiang, L. Marang, J. Tamis, M. C. van Loosdrecht, H. Dijkman, and R. Kleerebezem, "Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic," *Water Research*, vol. 46, no. 17, pp. 5517–5530, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.028>
- [64] A. Raschka, M. Carus, and S. Piotrowski, "Renewable Raw Materials and Feedstock for Bioplastics," *Bio-Based Plastics: Materials and Applications*, pp. 331–345, 2014.
- [65] S. Bengtsson, J. Hallquist, A. Werker, and T. Welander, "Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and ph on volatile fatty acids production," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 40, no. 3, pp. 492–499, 2008.
- [66] C. de Ambiente Ordenamento do Território, "A indústria papeleira portuguesa," 16 Fev, 2016.
- [67] D. Pokhrel and T. Viraraghavan, "Treatment of pulp and paper mill wastewater - A review," *Science of the Total Environment*, vol. 333, no. 1-3, pp. 37–58, 2004.
- [68] C. J. Biermann, *Essentials of pulping and papermaking*. Academic press, 1993.

- [69] R. Kumar, S. Singh, and O. V. Singh, "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 35, no. 5, pp. 377–391, 2008.
- [70] Y. Jiang, G. Mikova, R. Kleerebezem, L. A. van der Wielen, and M. C. Cuellar, "Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture," *AMB Express*, vol. 5, no. 1, 2015.
- [71] S. Y. Lee and J.-i. Choi, "Effect of fermentation performance on the economics of poly (3-hydroxybutyrate) production by *Caldwellia latus*," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, no. 1-3, pp. 387–393, 1998.
- [72] B. Kunasundari and K. Sudesh, "Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates," *Express Polymer Letters*, vol. 5, no. 7, pp. 620–634, 2011.
- [73] G. Chen, G. Zhang, S. Park, and S. Lee, "Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 1, pp. 50–55, 2001.
- [74] M. Terada and R. Marchessault, "Determination of solubility parameters for poly (3-hydroxyalkanoates)," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 25, no. 1-3, pp. 207–215, 1999.
- [75] J. H. Hildebrand, "A critique of the theory of solubility of non-electrolytes." *Chemical Reviews*, vol. 44, no. 1, pp. 37–45, 1949.
- [76] S. Hu, A. G. McDonald, and E. R. Coats, "Characterization of polyhydroxybutyrate biosynthesized from crude glycerol waste using mixed microbial consortia," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 129, no. 3, pp. 1314–1321, 2013.
- [77] N. Jacquelin, C.-W. Lo, Y.-H. Wei, H.-S. Wu, and S. S. Wang, "Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates)," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, no. 1, pp. 15–27, 2008.
- [78] J. Ramsay, E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie, and B. Ramsay, "Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents," *Biotechnology Techniques*, vol. 8, no. 8, pp. 589–594, 1994.
- [79] C. Samorì, F. Abbondanzi, P. Galletti, L. Giorgini, L. Mazzocchetti, C. Torri, and E. Tagliavini, "Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery," *Bioresource Technology*, vol. 189, pp. 195–202, 2015.
- [80] M. H. Madkour, D. Heinrich, M. A. Alghamdi, I. I. Shabbaj, and A. Steinbüchel, "Pha recovery from biomass," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 9, pp. 2963–2972, 2013.

- [81] J. Yu and L. X. Chen, "Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass," *Biotechnology Progress*, vol. 22, no. 2, pp. 547–553, 2006.
- [82] "Pubchem patent summary for us-7514525-b2, recovery and purification of polyhydroxyalkanoates - national center for biotechnology information," <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-7514525-B2>, 2021, consultado a 17/08/2021.
- [83] I. M. Tamer, M. Moo-Young, and Y. Chisti, "Disruption of *alcaligenes latus* for recovery of poly (β -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 37, no. 5, pp. 1807–1814, 1998.
- [84] J. Ramsay, E. Berger, B. Ramsay, and C. Chavarie, "Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment," *Biotechnology Techniques*, vol. 4, no. 4, pp. 221–226, 1990.
- [85] Z. Dong and X. Sun, "A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *azotobacter chroococcum*," *Chinese Science Bulletin*, vol. 45, no. 3, pp. 252–256, 2000.
- [86] B. Colombo, J. Pereira, M. Martins, M. A. Torres-Acosta, A. C. Dias, P. C. Lemos, S. P. Ventura, G. Eisele, A. Alekseeva, F. Adani, and L. S. Serafim, "Recovering PHA from mixed microbial biomass: Using non-ionic surfactants as a pretreatment step," *Separation and Purification Technology*, vol. 253, no. April, 2020.
- [87] "Separation process. united states united states patent us19890374567," <http://europepmc.org/article/PAT/US4910145>, 30 Jun 1989, consultado a 18/08/2021.
- [88] K. Yasotha, M. Aroua, K. Ramachandran, and I. Tan, "Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (phas) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 30, no. 3, pp. 260–268, 2006.
- [89] F. M. Kapritchkoff, A. P. Viotti, R. C. Alli, M. Zuccolo, J. G. Pradella, A. E. Maiorano, E. A. Miranda, and A. Bonomi, "Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *ralstonia eutropha*," *Journal of Biotechnology*, vol. 122, no. 4, pp. 453–462, 2006.
- [90] O. Aizpurua-Olaizola, M. Ormazabal, A. Vallejo, M. Olivares, P. Navarro, N. Etxebarria, and A. Usobiaga, "Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *vitis vinifera* grape wastes," *Journal of Food Science*, vol. 80, no. 1, pp. E101–E107, 2015.
- [91] Y. Tanaka, I. Sakaki, and T. Ohkubo, "Extraction of phospholipids from salmon roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer," *Journal of Oleo Science*, vol. 53, no. 9, pp. 417–424, 2004.

- [92] P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, and Y. Yamini, "Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly (β -hydroxybutyrate) recovery," *Biotechnology Progress*, vol. 19, no. 5, pp. 1519–1523, 2003.
- [93] K. Khosravi-Darani, E. Vasheghani-Farahani, S. A. Shojaosadati, and Y. Yamini, "Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly (γ -hydroxybutyrate) recovery," *Biotechnology Progress*, vol. 20, no. 6, pp. 1757–1765, 2004.
- [94] S. Yang, Z. Huang, Z. Jiang, and L. Li, "Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems," *Process Biochemistry*, vol. 43, no. 1, pp. 56–61, 2008.
- [95] Y. K. Leong, P. L. Show, J. C.-W. Lan, H.-S. Loh, H. L. Lam, and T. C. Ling, "Economic and environmental analysis of PHA production process," *Clean Technologies and Environmental Policy*, vol. 19, no. 7, pp. 1941–1953, 2017.
- [96] M. Rito-Palomares, "Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products," *Journal of Chromatography B*, vol. 807, no. 1, pp. 3–11, 2004.
- [97] H. Preusting, J. Kingma, G. Huisman, A. Steinbüchel, and B. Witholt, "Formation of polyester blends by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*: different poly (3-hydroxyalkanoates) are stored in separate granules," *Journal of Environmental Polymer Degradation*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, 1993.
- [98] G. De Koning, M. Kellerhals, C. Van Meurs, and B. Witholt, "A process for the recovery of poly (hydroxyalkanoates) from pseudomonads part 2: Process development and economic evaluation," *Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 1, pp. 15–21, 1997.
- [99] E. Stuart, A. Tehrani, H. E. Valentin, D. Dennis, R. W. Lenz, and R. C. Fuller, "Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary," *Journal of Biotechnology*, vol. 64, no. 2-3, pp. 137–144, 1998.
- [100] W. D. Luzier, "Materials derived from biomass/biodegradable materials." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 3, pp. 839–842, 1992.
- [101] P. C. Furrer, "Medium-chain-length poly (γ -3-hydroxyalkanoates): from biosynthesis towards medical applications," Ph.D. dissertation, ETH Zurich, 2008.
- [102] M. López-Abelairas, M. García-Torreiro, T. Lú-Chau, J. M. Lema, and A. Steinbüchel, "Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus*

- necator H16 cultures," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 93, pp. 250–259, 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.018>
- [103] C. Fernández-Dacosta, J. A. Posada, R. Kleerebezem, M. C. Cuellar, and A. Ramirez, "Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment," *Bioresource Technology*, vol. 185, pp. 368–377, 2015.
- [104] S. Righi, F. Baioli, C. Samorì, P. Galletti, E. Tagliavini, C. Stramigioli, A. Tugnoli, and P. Fantke, "A life cycle assessment of poly-hydroxybutyrate extraction from microbial biomass using dimethyl carbonate," *Journal of Cleaner Production*, vol. 168, pp. 692–707, 2017.
- [105] B. A. Ramsay, J. Ramsay, E. Berger, C. Chavarie, and G. Braunegg, "Separation of poly- β -hydroxyalkanoic acid from microbial biomass," May 5 1992, uS Patent 5,110,980.
- [106] D. Heinrich, M. H. Madkour, M. A. Al-Ghamdi, I. I. Shabbaj, and A. Steinbüchel, "Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite," *AMB Express*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 2012.
- [107] M. Villano, F. Valentino, A. Barbeta, L. Martino, M. Scandola, and M. Majone, "Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process," *New biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 289–296, 2014.
- [108] G. Mannina, D. Presti, G. Montiel-Jarillo, and M. E. Suárez-Ojeda, "Bioplastic recovery from wastewater: a new protocol for polyhydroxyalkanoates (pha) extraction from mixed microbial cultures," *Bioresource Technology*, vol. 282, pp. 361–369, 2019.
- [109] B. Laycock, M. V. Arcos-Hernandez, A. Langford, S. Pratt, A. Werker, P. J. Halley, and P. A. Lant, "Crystallisation and fractionation of selected polyhydroxyalkanoates produced from mixed cultures," *New Biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 345–356, 2014.
- [110] M. S. Lee and W. H. Park, "Compatibility and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate)/poly (glycidyl methacrylate) blends," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 351–358, 2002.
- [111] G.-Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578, 2005.
- [112] H. Sato, M. Nakamura, A. Padermshoke, H. Yamaguchi, H. Terauchi, S. Ekgasit, I. Noda, and Y. Ozaki, "Thermal behavior and molecular interaction of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) studied by wide-angle x-ray diffraction," *Macromolecules*, vol. 37, no. 10, pp. 3763–3769, 2004.

- [113] T. M. Scherer, *Biological and enzymatic mechanisms of polyester biodegradation by fungi*. University of Massachusetts Amherst, 1996.
- [114] Y. Chen, I. N. Chou, Y. H. Tsai, and H. S. Wu, "Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in drying treatment," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 130, no. 5, pp. 3659–3667, 2013.
- [115] H. Liu, F. Xie, L. Yu, L. Chen, and L. Li, "Thermal processing of starch-based polymers," *Progress in Polymer Science*, vol. 34, no. 12, pp. 1348–1368, 2009.
- [116] W. Mook Choi, T. Wan Kim, O. Ok Park, Y. Keun Chang, and J. Woo Lee, "Preparation and characterization of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)–organoclay nanocomposites," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 90, no. 2, pp. 525–529, 2003.
- [117] M. V. Cruz, D. Araújo, V. D. Alves, F. Freitas, and M. A. Reis, "Characterization of medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from olive oil deodorizer distillate," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 82, pp. 243–248, 2016.
- [118] A. B. Wadsworth, "Standard methods," *The Williams and Wilkins Co., Baltimore*, p. 226, 1947.
- [119] Y. Chen, Q. Xu, H. Yang, and G. Gu, "Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant-chelate aqueous system," *Process Biochemistry*, vol. 36, no. 8-9, pp. 773–779, 2001.
- [120] T. Modjinou, P. Lemechko, J. Babinot, D.-L. Versace, V. Langlois, and E. Renard, "Poly(3-hydroxyalkanoate) sulfonate: From nanoparticles toward water soluble polyesters," *European Polymer Journal*, vol. 68, pp. 471–479, 2015. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305715002827>
- [121] L. Lorini, A. Martinelli, P. Pavan, M. Majone, and F. Valentino, "Downstream processing and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by mixed microbial culture (MMC) and organic urban waste as substrate," *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 11, no. 2, pp. 693–703, 2021.
- [122] C. M. Chan, P. Johansson, P. Magnusson, L.-J. Vandi, M. Arcos-Hernandez, P. Halley, B. Laycock, S. Pratt, and A. Werker, "Mixed culture polyhydroxyalkanoate-rich biomass assessment and quality control using thermogravimetric measurement methods," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 144, pp. 110–120, 2017.
- [123] A. Aramvash, F. Moazzeni Zavareh, and N. Gholami Banadkuki, "Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*," *Engineering in Life Sciences*, vol. 18, no. 1, pp. 20–28, 2018.

- [124] S. Rezania, B. Oryani, J. Cho, A. Talaiekhosravi, F. Sabbagh, B. Hashemi, P. F. Rupani, and A. A. Mohammadi, "Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview," *Energy*, vol. 199, p. 117457, 2020.
- [125] M. C. Ho, V. Z. Ong, and T. Y. Wu, "Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization—a review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 112, pp. 75–86, 2019.
- [126] M. L. de Donno, S. Moreno, and E. R. Rene, "Polyhydroxyalkanoate (pha) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives," *Bioresource Technology*, p. 124985, 2021.
- [127] "Acid-base titration," <https://opentextbc.ca/chemistry/chapter/14-7-acid-base-titrations/>, consultado a 09/09/2021.
- [128] A. Burniol-Figols, I. V. Skiadas, A. E. Dugaard, and H. N. Gavala, "Polyhydroxyalkanoate (pha) purification through dilute aqueous ammonia digestion at elevated temperatures," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 95, no. 5, pp. 1519–1532, 2020.
- [129] J. Bocaz-Beltrán, S. Rocha, F. Pinto-Ibieta, G. Ciudad, and M. Cea, "Novel alternative recovery of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures using microwave-assisted extraction," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, no. May, 2021.
- [130] M. Akdoğan and E. Çelik, "Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (pha) from a bacillus megaterium strain using various dehydration techniques," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 93, no. 8, pp. 2292–2298, 2018.



Apêndice A

Nos gráficos em que se apresentam as retas de calibração apresentados neste apêndice, os eixos estão identificados por letras que representam os seguintes rários: no eixo vertical, **A** representa o rário entre as áreas do pico do monómero que se pretende quantificar e do padrão interno (HD); no eixo horizontal, **M** representa o rário entre as massas do monómero que se pretende quantificar e do padrão interno (HD).

A.1 Ensaio biomassa NOVA ID

Dados referentes ao ensaio feito com biomassa cedida pela NOVA ID com o objetivo de averiguar o efeito de uma acidificação com ácido acético e uma secagem prolongada a 60°C.

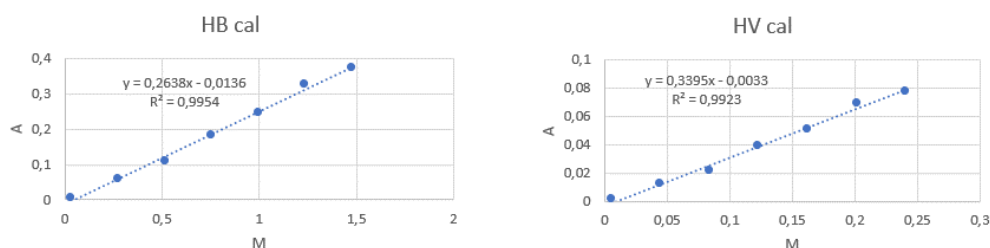


Figura A.1: Retas de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra.

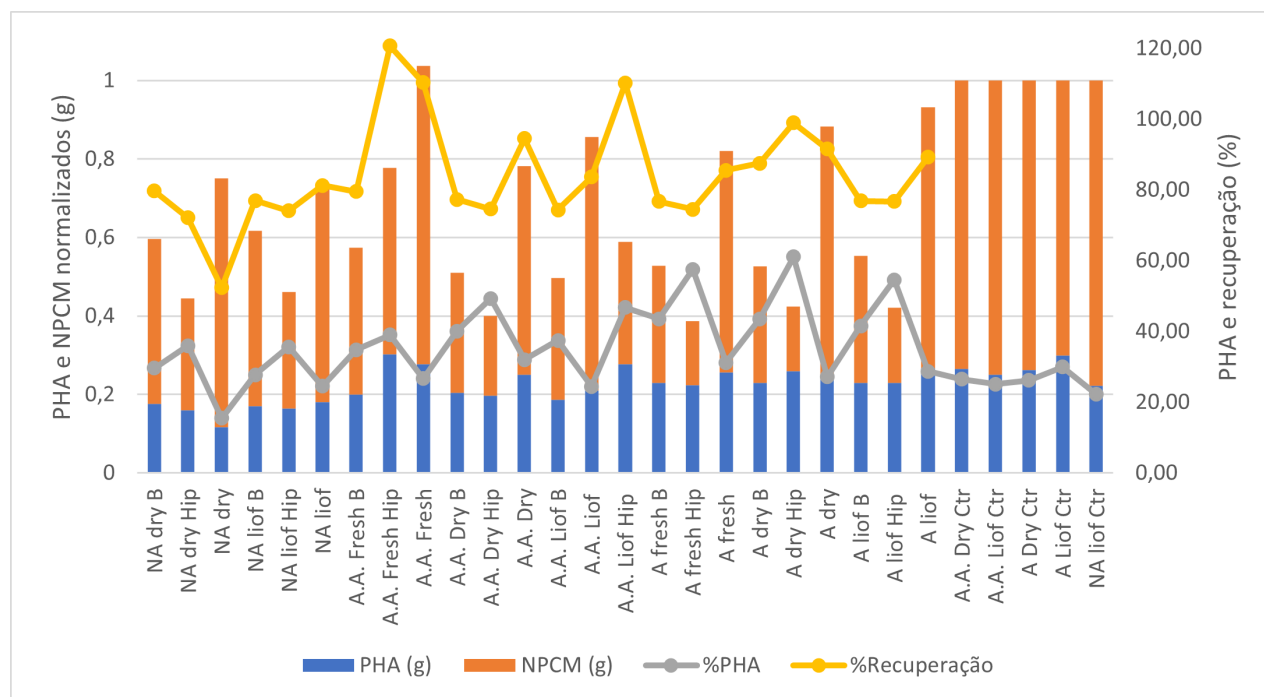


Figura A.2: Resultados do ensaio.

Cada condição é identificada por três elementos: **o primeiro** exprime o tipo de acidificação aplicada (NA-Não Acidificado; A.A.-acidificação com Ácido Acético; A-acidificação com Ácido Sulfúrico); **o segundo** define o tipo de processamento aplicado à biomassa antes da extração (liof-liofilizada; fresh-fresca; dry-seca); **o terceiro** expressa o tipo de extração aplicada (Ctr-Sem extração; B-Extração básica com NaOH (NaOH 0,28 M a 30°C por 4,8 h); Hip-Extração oxidante com hipoclorito de sódio (NaClO 8,97% a 30°C por 3,4 h); Vazio-Lavagem com Água).

A.2 Retas de calibração

Nesta secção apresentam-se as várias retas de calibração aplicadas nos ensaios 1-8:

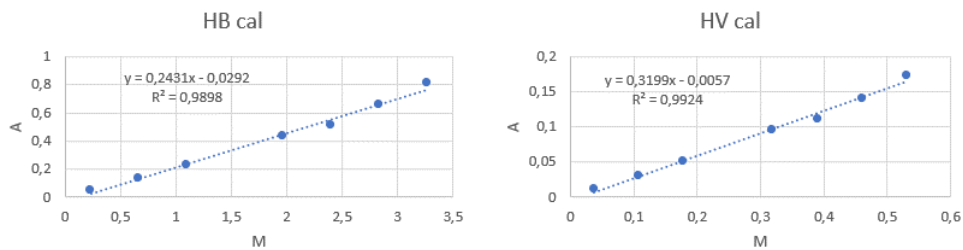


Figura A.3: Retas de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 1.

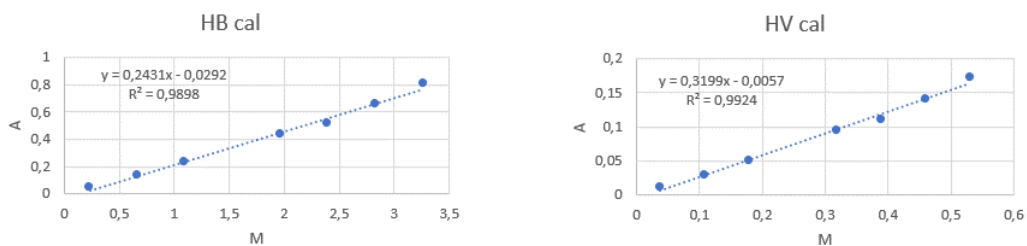


Figura A.4: Retas de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 2.

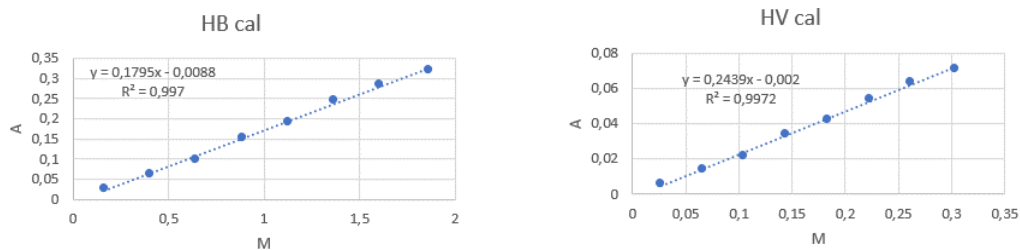


Figura A.5: Retas de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 3.

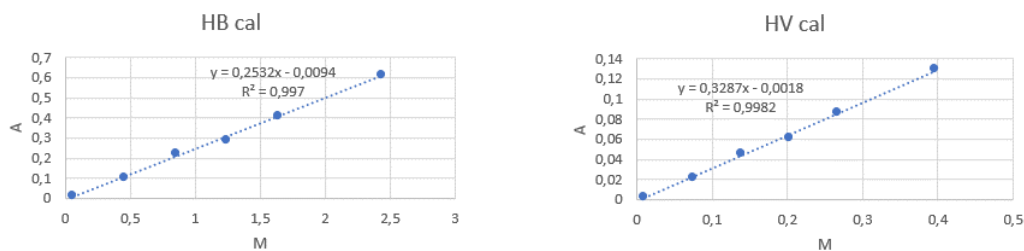


Figura A.6: Retas de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas nos ensaios 1 e no referente à extração à escala piloto.

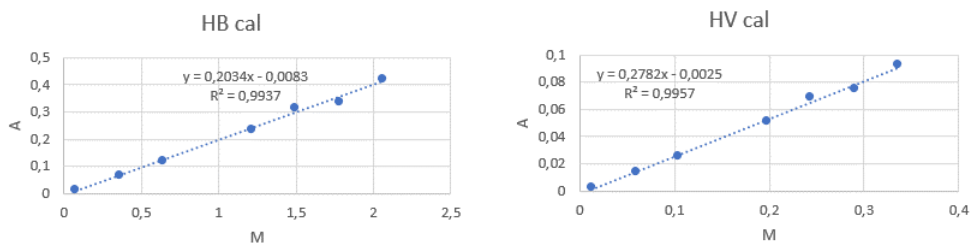


Figura A.7: Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 5.

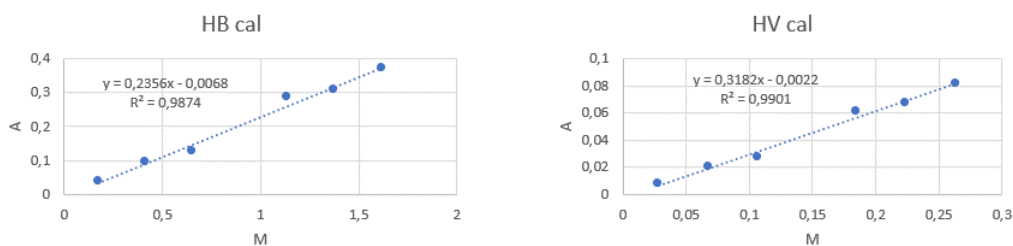


Figura A.8: Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 6.

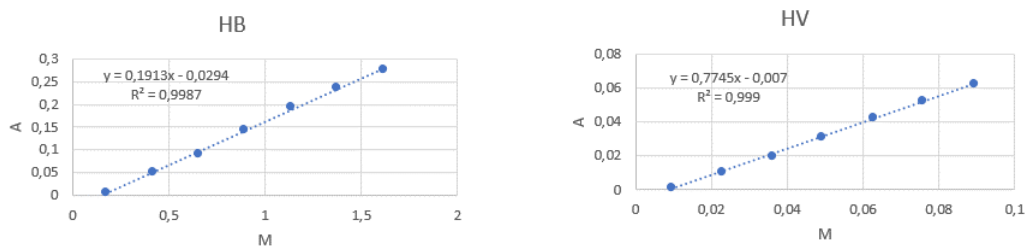


Figura A.9: Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 7.

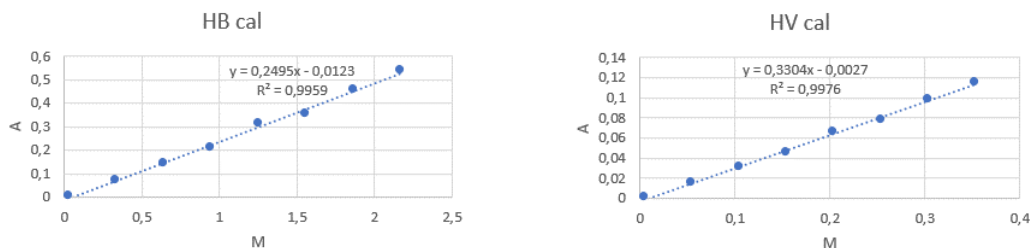


Figura A.10: Reta de calibração para a quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra, aplicadas no ensaio 8.

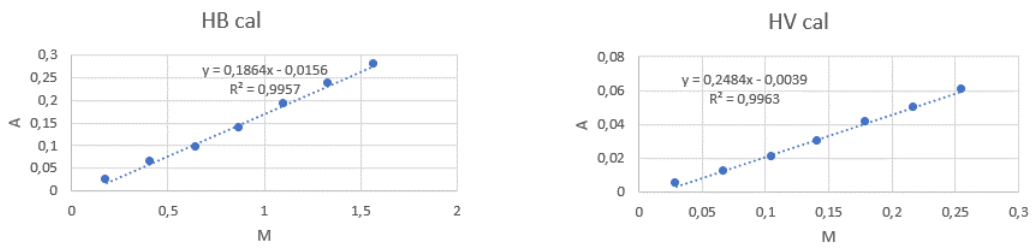


Figura A.11: Reta de calibração aplicadas na quantificação do conteúdo polimérico de cada amostra de biomassa inicial extraída à escala piloto.