



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



# Avaliação do papel da parede celular na extração do P(3HB)

*Autor: Janaína Santos Boeira*

*Orientador: Nilo Sérgio Medeiros Cardozo*

*Co-orientadoras: Débora Jung Luvizetto Faccin*

*Paula Bettio Staudt*

Porto Alegre, julho de 17

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha mãe, Maria Helena, à minha irmã, Mônica, ao meu ex-professor Alcimar e ao meu namorado, Pedro por acreditarem na minha capacidade e pelo apoio incondicional aos meus estudos;

Aos professores Nilo, Débora e Paula e ao Mestre Fabrício pela dedicação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

À UFRGS, em especial ao Departamento de Engenharia Química, pela oportunidade do ensino de qualidade;

À comunidade científica, pelas pesquisas e publicações que me forneceram conhecimento para ser aplicado no presente estudo;

A todos os brasileiros, que mantêm esta universidade.

## Resumo

Os biopolímeros, como, por exemplo, os PHA's são uma alternativa interessante para substituir os plásticos de origem fóssil, que geram problemas ambientais. O PHB é um dos promissores biopolímeros da classe dos PHA's e apresenta desafios para a viabilidade de produção em escala industrial, principalmente devido aos altos custos de extração do mesmo do meio celular no qual é sintetizado. Estudar os fenômenos presentes na extração através de propriedades termodinâmicas das soluções é uma via para encontrar um solvente ideal. O PHB é sintetizado tanto por bactérias Gram-positivas quanto por Gram-negativas. A literatura demonstra diferentes resultados de recuperação quando comparado o tipo de bactéria. A fim de compreender esta diferença, um estudo de composição da parede celular de cada um dos tipos de bactérias foi realizado e chegou-se em estruturas-chave: peptidoglicano, ácido lipoteicóico e ácido teicóico. O peptidoglicano está presente nas bactérias Gram-positivas em quantidade muito superior do que nas Gram-negativas. Os ácidos teicóicos e lipoteicóicos estão presentes apenas nas Gram-positivas. A partir de solventes retirados da literatura, clorofórmio, N,N-dimetilacetamida, carbonato de propileno e 2-heptanona, cálculos de coeficiente de atividade foram realizados para diferentes combinações de solventes com as estruturas celulares e o P(3HB) com o objetivo de compreender a natureza das interações presentes na extração do biopolímero através da utilização do modelo COSMO-SAC implementado na ferramenta computacional JCOSMO desenvolvido pelo LVPP - UFRGS. Os resultados das simulações, através do coeficiente de atividade em diluição infinita - IDAC, comparados com os dados experimentais de extração do P(3HB) presentes na literatura, deixam indícios da influência da parede celular na extração, como difusão e interações termodinâmicas repulsivas com o solvente. Estes resultados são hipóteses que devem ser exploradas a partir de novos experimentos e simulações, para melhor compreensão dos fenômenos presentes.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Unidade de repetição do P3HB. ....	2
Figura 2.2: PHB armazenado na forma de grânulos para reserva energética. ....	3
Figura 2.3 Comparativo de extração a 60°C utilizando clorofórmio como solvente. Os dados de extração para <i>B. megaterium</i> (Gram-positivas) e <i>C. necator</i> (Gram-negativas) foram retirados, respectivamente, de BORGES (2017), e de QUINES (2010). ....	4
Figura 2.4: Comparativo de extração a 160°C (Gram-positiva) e 150°C (Gram-negativa) para o carbonato de propileno. Os dados de extração para <i>B. megaterium</i> (Gram-positivas) e <i>C. necator</i> (Gram-negativas) foram retirados, respectivamente, de BORGES (2017), e de QUINES (2010). ....	4
Figura 2.5 Estrutura da parede Gram-negativa. ....	5
Figura 2.6 Estrutura da parede de bactérias Gram-positivas. ....	6
Figura 2.7 Unidade de repetição do peptidoglicano para <i>Bacillus subtilis</i> . ....	8
Figura 2.8 Diferentes orientações para o peptidoglicano. Em A, orientação é paralela à membrana. Em B, orientação perpendicular. ....	9
Figura 2.9 Representação esquemática dos ácidos de parede de uma bactéria. ....	10
Figura 2.10 Estrutura do ácido teicóico de parede para o <i>B. subtilis</i> e <i>S aureus</i> ....	10
Figura 2.11 Estrutura do ácido lipoteicóico para o <i>B. subtilis</i> . ....	11
Figura 2.12 Caminho de solvatação proposto por Klant. ....	13
Figura 2.13 Superfície de carga induzida para: a) clorofórmio e b) unidade repetitiva do P(3HB). ....	13
Figura 2.14 Perfil sigma para o par clorofórmio - PHB. ....	14
Figura 3.1 Esquemas representativo das interações a serem calculadas. ....	16
Figura 3.2 Superfície de cargas induzidas para uma molécula representativa do peptidoglicano. ....	18
Figura 3.3 Superfície de cargas induzidas para a molécula representativa do ácido teicóico. ....	18
Figura 3.4 Superfície de cargas induzidas da molécula representativa do ácido lipoteicóico. ....	19
Figura 3.5 Superfície de cargas induzidas da unidade repetitiva do polímero P(3HB) utilizada por AUAD(2015) e por este trabalho. ....	19
Figura 3.6 Perfis de cargas induzidas na superfície dos solventes: a) 2-heptanona b) n,n-dimetilacetamida c) carbonato de propileno d) clorofórmio ....	20
Figura 3.7 Interface gráfica do software JCOSMO. ....	21
Figura 4.1 Perfis de $\ln \gamma$ para misturas de P(3HB) com: (a) clorofórmio ( $T = 333$ K), ....	22
Figura 4.2 Perfis de $\ln \gamma$ para misturas de Peptidoglicano com: (a) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$ K), (b) carbonato de propileno ( $T = 433$ K), (c) 2-heptanona ( $T = 433$ K) e ....	23

Figura 4.3 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido teicóico com: (a) clorofórmio ( $T = 333$  K), (b) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$  K), (c) carbonato de propileno ( $T = 433$  K) e ..... 24

Figura 4.4 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido lipoteicóico com: (a) clorofórmio ( $T = 333$  K), (b) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$  K), (c) carbonato de propileno ( $T = 433$  K) e (d) 2-heptanona ( $T = 433$  K). ..... 25

Figura 4.5 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido P(3HB) com: (a) peptidoglicano ( $T = 433$  K), (b) ácido teicóico ( $T = 433$  K), (c) ácido lipoteicóico ( $T = 433$  K)..... 26

Figura 4.6 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido P(3HB) com: (a) peptidoglicano ( $T = 333$  K), (b) ácido teicóico ( $T = 333$  K), (c) ácido lipoteicóico ( $T = 333$  K)..... 27

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Variação da composição lipídica da camada bacteriana. ....	7
Tabela 2.2 Características de arquitetura do peptidoglicano para algumas bactérias.....	9
Tabela 3.1 Parâmetros do modelo COSMO-SAC utilizados neste trabalho. ....	17
Tabela 4.1 Dados de recuperação e pureza do P3HB a partir do <i>B. megaterium</i> .....	28
Tabela 4.2 Dados de recuperação e pureza do P3HB a partir do <i>C. necator</i> . ....	28
Tabela 4.3 Valores dos logaritmos dos coeficientes de diluição infinita para cada par de solução.....	29

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

PHA - Polihidroxicanoatos

P(3HB) – Poli(3-hidroxiacetato)

PHB - Polihidroxiacetato

*B. megaterium* - *Bacillus megaterium*

*C. necator* - *Cupriavidus necator*

COSMO-SAC – *Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity Coefficient*

IDAC - *Infinite Dilution Activity Coefficient*

CDO - Cetodesóxiacetato

LPS - Lipopolissacarídeo

NAG - N-acetilglucosamina

NAM - N-acetilmureína

WTA – Ácido Teicóico de parede

LTA – Ácido Lipoteicóico

UNIFAC – *Universal Functional-group Activity Coefficient*

COSMO - *Conductor-like Screening Model*

COSMO-RS - *Conductor-like Screening Model for Real Solvent*

## Lista de Símbolos

$\Delta G_{i/s}^{*is}$  - energia de Gibbs de solvatação ideal

$\Delta G_{i/s}^{*res}$  - energia de Gibbs de restauração de cargas

$\Delta G_{i/s}^{*cav}$  - energia de Gibbs de formação de cavidade

$\Delta G_{\frac{i}{s}}^{*sol}$  - energia de Gibbs de solvatação real

$\gamma_i$  - coeficiente de atividade para o componente i

$\gamma_i^{res}$  - parcela residual do coeficiente de atividade

$\gamma_i^{comb}$  - parcela combinatorial do coeficiente de atividade

Z - número de coordenação

$\phi_i$  - fração volumétrica normalizada

$\theta_i$  - fração de área normalizada

$q_i$  - área superficial normalizada

$r_i$  - volume superficial normalizado

$x_j$  - fração molar do componente j

$p$  - parâmetro universal do modelo COSMO-SAC

$r$  - normalização do volume

$v_i$  - volume da cavidade

$A_i$  - superfície da cavidade

$q$  - normalização da superfície

$\beta$  - parâmetro do modelo COSMO-SAC adicionado por Gerber e Soares

$\Delta G_{\frac{i}{i}}^{*res}$  - energia de Gibbs de restauração de carga

R - constante universal dos gases

T - temperatura

$p_i(\sigma_m)$  - perfil sigma

$\Gamma_s(\sigma_m)$  - coeficiente de atividade de cada segmento de carga

$c_{hb}$  - energia de ligação de hidrogênio



$\sigma_{HB}$  - valor de corte da ligação de hidrogênio

$f_{pol}$  – fator de polarização

## Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
Lista de Símbolos	viii
Sumário	x
1 Introdução	1
2 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica	2
2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)	2
2.2 Influência do tipo de micro-organismo produtor na extração do P(3HB)	3
2.3 Diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	5
2.3.1 Peptidoglicano	7
2.3.2 Ácidos teicóicos de parede	9
2.3.3 Ácidos lipoteicóicos	11
2.4 Coeficiente de atividade $\gamma$	11
2.5 Modelo COSMO-SAC	12
3 Metodologia	16
3.1 Parâmetros do modelo COSMO-SAC	17
3.2 Desenvolvimento das estruturas	17
3.3 JCOSMO	20
4 Resultados e discussão	22
4.1 Perfis de <i>ln<math>\gamma</math>i</i>	22
4.1.1 Solventes e Peptidoglicano	23
4.1.2 Solventes e Ácido Teicóico	23
4.1.3 Solventes e Ácido Lipoteicóico	24
4.1.4 P(3HB) e estruturas celulares	25
4.1.4.1 Resultados em 433 K	25
4.1.4.2 Resultados em 333 K	26
4.2 Discussão com os dados experimentais	27
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	30
6 Referências	31

## 1 Introdução

Devido aos problemas ambientais que os resíduos sólidos constituídos por plásticos vêm causando ao meio ambiente, estudos vêm sendo realizados para encontrar soluções plausíveis para o problema. Uma alternativa promissora neste sentido é o uso de biopolímeros, em especial os polihidroxialcanoatos (PHA)s. Estes têm a capacidade de se degradarem na natureza sem causar grandes danos ao meio ambiente em comparação com os plásticos de origem fóssil (TOKIWA *et al.*, 2009).

Dentre os PHAs, destaca-se o polihidroxibutirato (P(3HB) ou PHB). O P(3HB) é produzido como reserva de energia em bactérias, depositando-se em grânulos no interior das mesmas. As bactérias produtoras podem ser separadas em dois tipos: Gram-positivas, representadas em especial pelo *Bacillus megaterium*, e Gram-negativas, principalmente a *Cupriavidus necator*. Trabalhos recentes têm mostrado que o *B. megaterium* consegue produzir o P(3HB) a partir de uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo resíduos industriais (LENCZAK, 2006; SCHAGGER; CRAMER; VONJAGOW, 1994), como o glicerol gerado na produção do biodiesel. Paralelamente, dados da literatura indicam que a recuperação dos grânulos intracelulares de P(3HB) é mais fácil em Gram-negativas do que em Gram-positivas, apresentando rendimentos menores e requerendo tempos maiores de processo (QUINES, 2010; BORGES 2017).

A recuperação do biopolímero do interior das células do micro-organismo produtor é um dos pontos críticos do processo de produção de biopolímeros, tendo grande impacto nas propriedades e no custo deste tipo de material. A forma mais comum de recuperação é pela extração por solventes (LEE, S. Y., 1996), sendo que os solventes mais comuns para este fim são os halogenados, principalmente o clorofórmio. Do ponto de vista ambiental, esta ainda é uma limitação importante, visto que os solventes halogenados não são substâncias ecologicamente corretas. Com isso, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para substituir os solventes halogenados e diminuir os custos de extração do polímero, tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas. No entanto, a grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura com relação a este tema, está centrada exclusivamente na avaliação experimental do desempenho de solventes específicos, não tendo sido encontradas informações que permitam entender como a estrutura do solvente e da parede celular influenciam no processo ou nas diferenças observadas entre os dois tipos de bactérias.

O entendimento da influência de alguns componentes (peptidoglicano, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos) da parede celular na extração pode representar uma ferramenta importante para predizer um solvente ideal para determinada situação de extração ou auxiliar na busca de condições ótimas para a recuperação do biopolímero do meio celular, tornando este processo mais vantajoso economicamente para o uso industrial. Esta influencia pode ser estudada a partir de interações dos componentes da parede celular com o P(3HB) e os solventes utilizando um modelo termodinâmico.

A partir deste contexto e levando em consideração esforços recentes no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química relacionados à produção e extração de P(3HB) a partir da *B. megaterium* (BORGES, 2017), o presente trabalho teve como objetivo compreender as diferenças nos dados experimentais de recuperação de P(3HB) com

diferentes solventes, obtidos em trabalhos prévios para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

De acordo com tal objetivo, o trabalho realizado teve como objetivos específicos: (i) estudar as diferenças estruturais entre os tipos de bactérias; (ii) avaliar a afinidade solvente/polímero e solvente/estrutura bacteriana para diferentes solventes, pela comparação de valores de coeficiente de atividade em diluição infinita (IDAC) estimados com base no modelo COSMO-SAC; e (iii) avaliar a correlação qualitativa entre os dados experimentais de literatura sobre extração de P(3HB) com os solventes considerados.

## 2 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica

### 2.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros que apresentam propriedades mecânicas semelhantes a alguns termoplásticos de origem fóssil, como o polipropileno. Além disso, são também biodegradáveis e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, o que diminui os impactos ambientais quando comparado com os polímeros presentes no mercado dos plásticos atuais (KAHAR et al., 2004).

Os estudos recentes mostram que existem mais de 20 tipos de genes de biossíntese dos PHAs, permitindo uma variedade de monômeros (LEE, S. Y., 1996).

Os PHAs podem ser produzidos por várias espécies de bactérias, como reserva energética na forma de grânulos sob condições específicas de crescimento, como limitação de nutrientes e excesso de carbono (MADISON; HUISMAN, 1999).

Dentre os PHAs mais estudados está o poli (3-hidroxi-butirato), P(3HB), cuja estrutura está representada na Figura 2.1. O P(3HB) podem ser produzidos tanto por bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (BYROM, 1987), podendo representar mais de 80% em peso seco na massa de uma célula. É possível a produção do polímero com massa molar superior a  $3 \times 10^6$  Da, o que pode ser muito útil para a produção de filmes e fibras (AGUS et al., 2006). Além disso, estudos vêm sendo feitos quanto à incorporação de comonômeros a fim de se obter um copolímero com melhor processabilidade e/ou melhoria específica em determinada propriedade (MORSE et al., 2011).

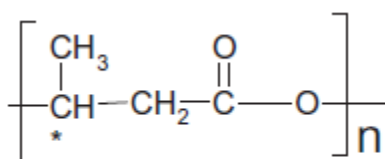


Figura 2.1: Unidade de repetição do P3HB.

Fonte: CZERNIECKA et al., 2014.

Apesar de ser um material promissor para a indústria dos termoplásticos, o P(3HB), em geral, apresenta um elevado custo de recuperação da biomassa, algo que pode ser revertido com o avanço de tecnologias de fermentação e separação, acompanhado de desenvolvimento no estudo da síntese dos bioplásticos (LEE, S. Y., 1996). Estima-se que cerca de 50% dos custos de produção do P(3HB) sejam devidos à separação do mesmo frente ao material celular de origem (LEE, S. Y.; CHOI, 1998). Isto ocorre porque o polímero produzido encontra-se na forma de grânulos no interior da célula do micro-organismo produtor (Figura 2.2).

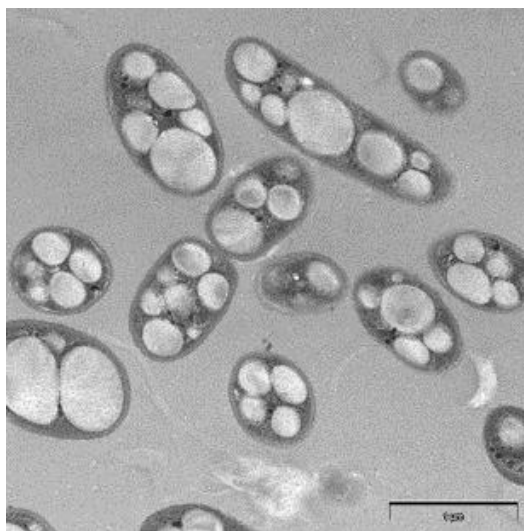


Figura 2.2: PHB armazenado na forma de grânulos para reserva energética.

Fonte: YU; DOW; PINGALI, 2013.

A etapa mais importante no processo de separação é a extração dos grânulos de P(3HB) de dentro da célula (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). O método mais utilizado para a recuperação do P(3HB) é o de extração por solventes (LEE, S. Y., 1996). Estes solventes, geralmente orgânicos, primeiramente modificam a permeabilidade da membrana celular e posteriormente dissolvem o polímero (FIORESE et al., 2009).

## 2.2 Influência do tipo de micro-organismo produtor na extração do P(3HB)

Diversos resultados de extração utilizando solventes são encontrados na literatura, o que permite fazer um comparativo do rendimento de extração alcançado com alguns solventes para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sob condições semelhantes de extração. Como, por exemplo, as Figuras 2.3 e 2.4 apresentam resultados de rendimento de extração e pureza do P(3HB) extraído com clorofórmio e carbonato de propileno, respectivamente.

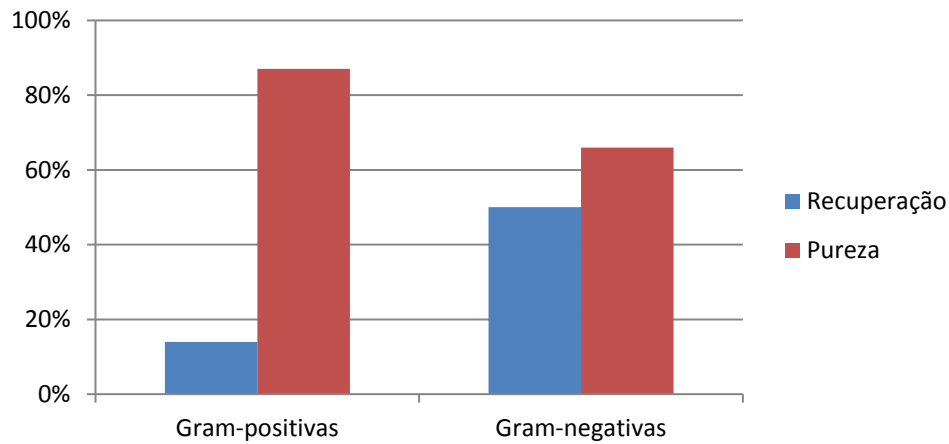


Figura 2.3 Comparativo de extração a 60°C utilizando clorofórmio como solvente. Os dados de extração para *B. megaterium* (Gram-positivas) e *C. necator* (Gram-negativas) foram retirados, respectivamente, de BORGES (2017), e de QUINES (2010).

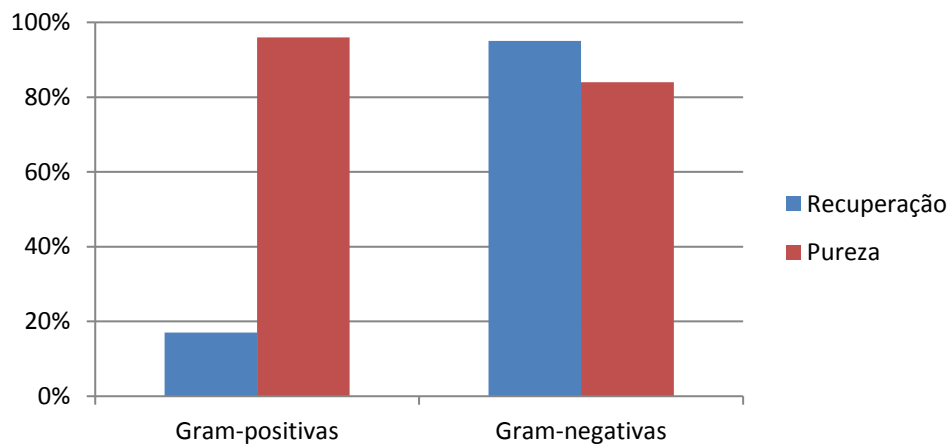


Figura 2.4: Comparativo de extração a 160°C (Gram-positiva) e 150°C (Gram-negativa) para o carbonato de propileno. Os dados de extração para *B. megaterium* (Gram-positivas) e *C. necator* (Gram-negativas) foram retirados, respectivamente, de BORGES (2017), e de QUINES (2010).

A análise das Figuras 2.3 e 2.4 mostra que há uma grande diferença no rendimento para os dois tipos de micro-organismo, com a bactéria Gram-positiva, no caso *B. megaterium*, apresentando rendimentos inferiores para ambos solventes.

Assim como nos dois trabalhos cujos resultados são apresentados nas Figuras 2.3 e 2.4, a grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura com relação à extração de P(3HB) se limita a realização de experimentos de extração com os pares solvente/bactéria de interesse (QUINES, 2010; BORGES, 2017; FIORESE, 2009; DALCANTON, 2006). Apesar de que alguns trabalhos citam as diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em termos de estrutura da parede celular como possível causa do menor rendimento de extração apresentado por bactérias Gram-positivas (PACHECHO, 2014), não foram encontrados na literatura trabalhos que analisassem de maneira sistemática e conclusiva a influência da parede celular na extração do P(3HB) ou apresentassem

informações que ajudassem a descobrir novos solventes com potencial para a aplicação neste processo.

### 2.3 Diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Em 1884, o médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram observou que bactérias apresentavam cores distintas quando submetidas a um processo de coloração, o que o fez classificá-las em dois grupos distintos, Gram-positivas e Gram-negativas (TEIXEIRA, 2001).

O processo inicial de coloração proposto por Gram consiste em colorir as bactérias com corante violeta e em seguida usar um fixador; posteriormente é feita uma descoloração com uma mistura alcoólica para posterior novo tingimento com o segundo corante, fucsina. As Gram-positivas se mantêm na coloração violeta, ao contrário das Gram-negativas, que adquirem nova coloração, vermelha (TEIXEIRA, 2001).

Não compreendida por muitos anos, a diferença entre os dois tipos de bactéria está na estrutura da parede celular (HOGG, 2005). As Gram-positivas apresentam a estrutura de parede formada por uma membrana citoplasmática revestida por uma camada de peptidoglicano contendo estruturas chamadas de ácido teicóico e lipoteicóico, como mostra a Figura 2.6. As Gram-negativas apresentam a parede celular formada por três partes (Figura 2.5): uma membrana citoplasmática de características similares a das Gram-positivas, uma camada de peptidoglicano inferior à das Gram-positivas e ainda uma segunda membrana externa ao peptidoglicano (HOGG, 2005).

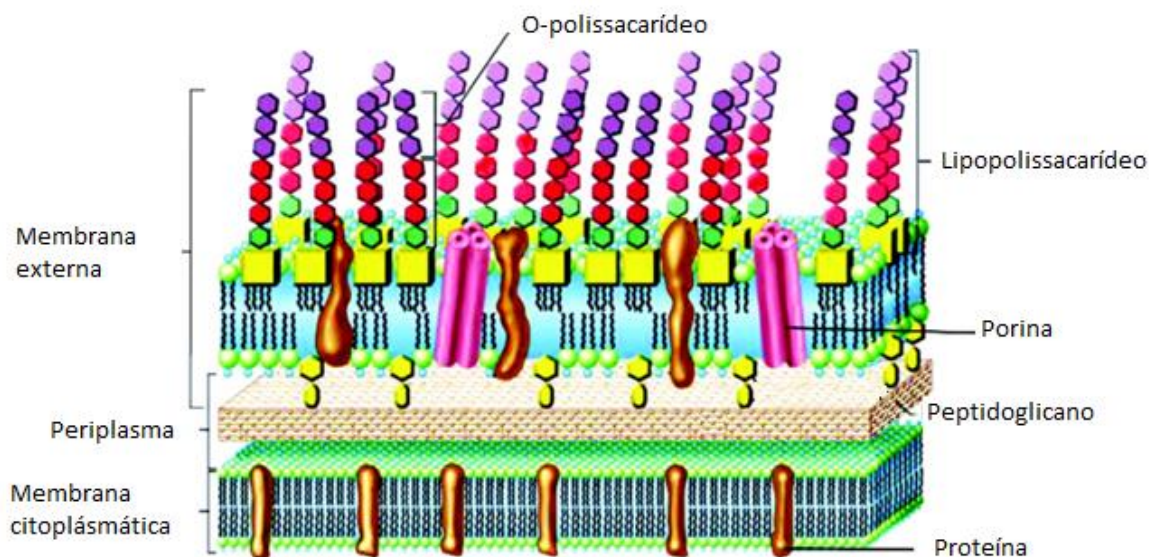


Figura 2.5 Estrutura da parede Gram-negativa.

Adaptado de WANG, G. *et al.*, 2014.

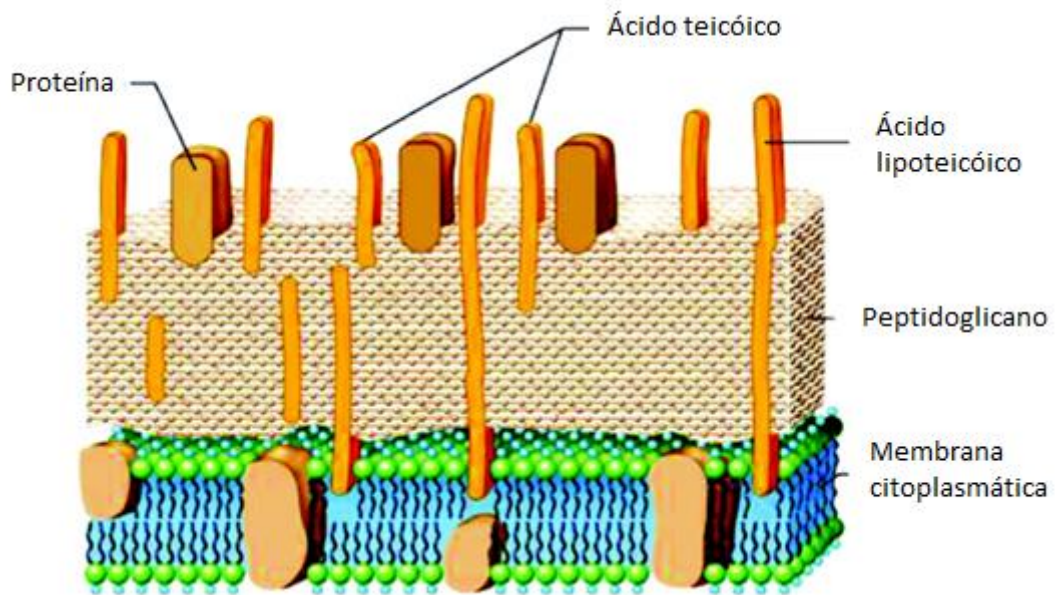


Figura 2.6 Estrutura da parede de bactérias Gram-positivas.

Adaptado de WANG, G. *et al.*, 2014.

O principal componente da membrana externa é o lipopolissacarídeo (LPS), que se caracteriza como uma cadeia polimérica ancorada na outra membrana (KÜBLER-KIEŁB *et al.*, 2006). Com um caráter anfílico, o LPS apresenta 3 diferentes estruturas: (i) uma fração lipoproteica, chamado lipídeo A; (ii) um polissacarídeo variável, que pode ser formado por mais de 30 diferentes cadeias de O-polissacarídeos, também chamado antígeno-o, o que leva a sua complexidade; (iii) um oligossacarídeo núcleo, cetodesóxiocetato (CDO) (KATZENELLENBOGEN *et al.*, 2003). Devido à presença de O-polissacarídeo, o LPS apresenta ação antígena em humanos e outros animais (VALAPPIL; BOCCACCINI; *et al.*, 2007), o que representa uma limitação para a aplicação de biopolímeros obtidos a partir de bactérias Gram-negativas.

Além da diferenciação em Gram-negativas e Gram-positivas, as bactérias podem apresentar também grande variabilidade em termos de composição química e morfologia. Alguns aspectos relacionados à morfologia serão discutidos na Seção 2.3.1. Com relação à composição química, a Tabela 2.1 apresenta dados relativos a alguns tipos comuns de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



Tabela 2.1 Variação da composição lipídica da camada bacteriana.

Espécies bacterianas	CL (% lip. Total)	PG (% lip. Total)	PE (% lip. Total)
<b>Bactéria Gran-negativa</b>			
<i>Escherichia coli</i>	5	15	80
<i>Escherichia cloacae</i>	3	21	74
<i>Yersinia Kristensenii</i>	20	20	60
<i>Proteus mirabilis</i>	5	10	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5	81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	21	60
<b>Bactéria Gran-positiva</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	58	0
<i>Staphylococcus pneumonia</i>	50	50	0
<i>Bacillus careus</i>	17	40	43
<i>Bacillus polymyxa</i>	8	3	60

PG: Fosfatidiglicerol, CL: Cardiolipina, PE: Fosfatidiletanolamina.

Adaptado de WANG, G. *et al.*, 2014

Apesar desta variabilidade de composição que ocorre entre os diferentes tipos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, pode-se apontar como principais diferenças entre os tipos de bactérias: (i) a presença de ácido teicóico e ácido lipoteicóico apenas nas bactérias Gram-positivas; (ii) a parede bem mais espessa nas Gram-positivas. Assim, estes componentes serão estudados com mais detalhe na tentativa de explicar as diferenças de resultados de extração do PHB entre Gram-negativas e Gram-positivas.

### 2.3.1 Peptidoglicano

A estrutura básica do peptidoglicano, representado na Figura 2.7, se caracteriza pela alternância de ligações de N-acetilglucosamina (NAG) e N-acetilmureina (NAM), apresentando ligações cruzadas com uma pequena cadeia peptídica, o que permite a união de várias camadas do peptidoglicano, formando uma estrutura rígida, responsável pela estrutura tridimensional da parede celular das bactérias (MEROUEH *et al.*, 2006).

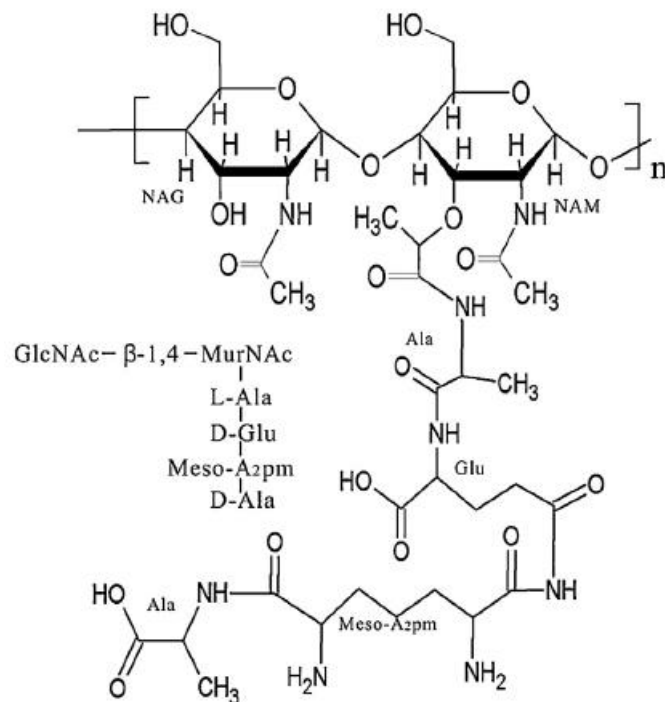


Figura 2.7 Unidade de repetição do peptidoglicano para *Bacillus subtilis*.

Fonte: WU *et al.*, 2013

Presente em praticamente todas as bactérias, o peptidoglicano apresenta características diferentes quando se compara em Gram-positivas e Gram-negativas (HOGG, 2005).

Nas bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano é apresentado na forma de várias camadas, representando cerca de 30 a 70% do peso seco de uma bactéria (HOGG, 2005). Sua espessura, apesar de variável em cada espécie, se encontra na faixa de 20 nm a 40 nm, como exemplo, para o *B. subtilis*, a espessura da camada de peptidoglicano é de aproximadamente 33,3 nm (VOLLMER; SELIGMAN, 2010). Outro ponto relevante é a presença de polímeros de carboidratos aniônicos, chamados de ácido teicóicos. Estes influenciam em algumas propriedades da parede celular, como permeabilidade, através de interações extracelulares, estabilidade adicional e como sustentação para enzimas extracitoplasmáticas (SWOBODA *et al.*, 2010).

Por outro lado, nas células Gram-negativas, a camada de peptidoglicano tem uma espessura bem menor, como, por exemplo, 2.41 nm encontrado para *Pseudomonas aeruginosa* (VOLLMER; SELIGMAN, 2010). Para Gram-negativas, a camada de peptidoglicano representa cerca de 10% apenas do peso seco celular (HOGG, 2005).

Apesar de sua estrutura e propriedade ainda não serem conhecidas em detalhes, atualmente já se sabe que além da diferença de espessura de camada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, encontram-se diferenças químicas e morfológicas entre o peptidoglicano de diferentes espécies de bactérias. Sabe-se, por exemplo, que o peptidoglicano apresenta um arranjo tridimensional muito complexo das suas cadeias (KIM; CHANG; SINGH, 2015).

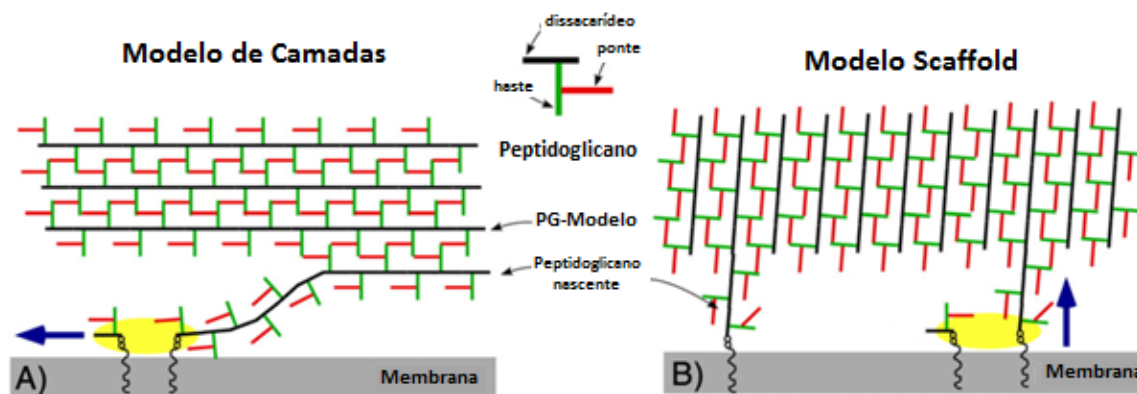


Figura 2.8 Diferentes orientações para o peptidoglicano. Em A, orientação é paralela à membrana. Em B, orientação perpendicular.

Adaptado de KIM; CHANG; SINGH, M., 2015.

Na Figura 2.8 são demonstrados dois tipos de arquitetura para o peptidoglicano. A arquitetura está diretamente relacionada com a espessura da camada de peptidoglicano e com o tamanho de poro presente na estrutura. A porosidade interfere no tamanho de partículas que irão atravessar livremente a parede, servindo como uma barreira física de seleção do que deve ou não passar para o interior da célula (WANG, G. et al., 2014). Na Tabela 2.2 são apresentadas características de poros e arranjo para a estrutura do peptidoglicano em algumas bactérias.

Tabela 2.2 Características de arquitetura do peptidoglicano para algumas bactérias.

Arquitetura	Bactéria	Tamanho de poro	Comprimento da cadeia de glicano
Haste-paralela	<i>S. aureus</i>	Pequeno	Pequeno
Haste-perpendicular	<i>E. faecium</i>	Intermediário	Intermediário
	<i>S. pneumoniae</i>		
Haste-antiparalela	<i>E. coli</i>	Grande	Grande
	<i>B. subtilis</i>		

Adaptado de KIM; CHANG; SINGH, M., 2015.

Apesar de não terem sido encontradas informações detalhadas sobre a estrutura do polipeptidoglicano da *B. megaterium*, que constitui o foco de interesse do presente trabalho, sabe-se que esta se assemelha ao peptidoglicano do *B. cereus*, *B. sphearicus*, *B. stearothermophilus* e do *B. subtilis* (POPHAM; TECH; MC, 2002), podendo, portanto, ser tomado como estruturalmente semelhante também para simulações.

### 2.3.2 Ácidos teicóicos de parede

Os ácidos teicóicos se encontram ancorados na estrutura do peptidoglicano, como está representado na Figura 2.9, e apresentam uma estrutura que cresce em direção ao lado externo da célula. São glicopolímeros aniônicos que modificam a permeabilidade do

mesmo. Podem chegar a um total de 60% do peso seco da parede celular (SWOBODA et al., 2010), mas normalmente não chegam aos 10% (RAO; VILINSKA; CHERNYSHOVA, 2010).

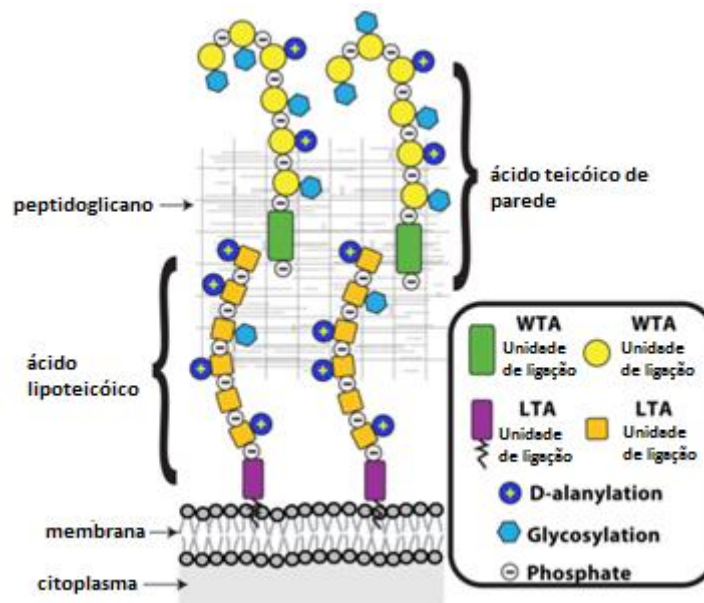


Figura 2.9 Representação esquemática dos ácidos de parede de uma bactéria Gram-positiva.

Adaptado de BROWN; SANTA MARIA; WALKER, 2013.

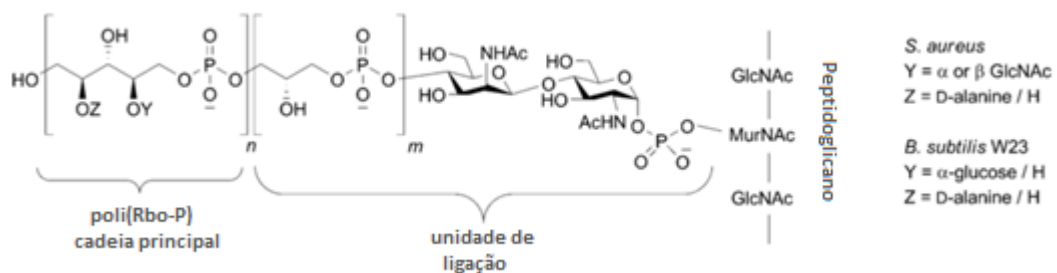


Figura 2.10 Estrutura do ácido teicóico de parede para o *B. subtilis* e *S. aureus*  
Adaptado de (SWOBODA et al., 2010)

Os ácidos teicóicos possuem uma cadeia complexa, como pode ser visto na Figura 2.10, composta por uma unidade de ligação ao peptidoglicano seguida de unidades de ribitol-fosfato que podem se repetir de 20 a 40 vezes, com substituintes que variam entre d-alanina,  $\alpha$ -glucose e hidrogênio, (SWOBODA et al., 2010).

Assim como as outras estruturas da parede celular, os ácidos teicóicos também têm sua composição variável de acordo com a espécie bacteriana, mas todas apresentam uma similaridade em características químicas (BROWN; SANTA MARIA; WALKER, 2013).

### 2.3.3 Ácidos lipoteicóicos

Muito semelhantes aos ácidos teicóicos de parede, os ácidos lipoteicóicos também modificam a permeabilidade do peptidoglicano, mas estes estão ancorados na membrana plasmática, e não diretamente na estrutura do peptidoglicano (Figura 2.9). Também se demonstraram essenciais à sobrevivência celular das Gram-positivas (OKU et al., 2009; SCHIRNER et al., 2009).

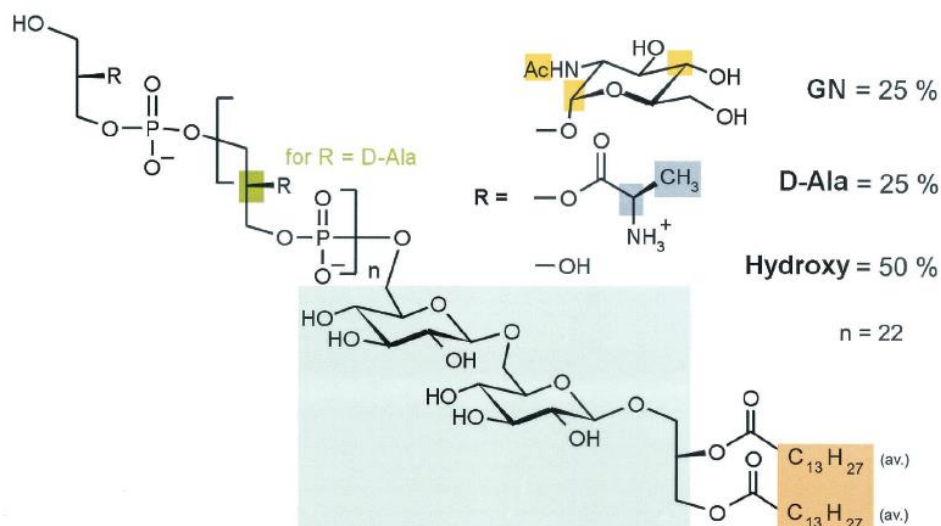


Figura 2.11 Estrutura do ácido lipoteicóico para o *B. subtilis*.

Fonte: (MORATH et al., 2002)

Pela Figura 2.11, percebe-se que, assim como nos ácidos teicóicos de parede, os ácidos lipoteicóicos têm uma estrutura de ligação, neste caso à membrana citoplasmática, e uma cadeia com unidades repetitivas que apresentam alguns substituintes: d-alanina,  $\alpha$ -d-N-acetilglucosamina e hidroxila.

## 2.4 Coeficiente de atividade $\gamma$

Para que haja um equilíbrio químico em um sistema fechado a uma determinada temperatura, pressão e composição molar, contendo  $i$  componentes, é necessário que a energia de Gibbs atinja um mínimo global. Quando se trata de sistemas contendo líquidos, esta pode ser representada pelo coeficiente de atividade  $\gamma_i$ . Este funciona como uma correção do comportamento real do líquido, uma medida da não idealidade do sistema com relação à solução ideal.

Essa não idealidade ocorre porque quando em mistura, as substâncias apresentam comportamento distinto de quando puras. Esses desvios de idealidade podem ser percebidos em várias propriedades, como volume, pressão e entalpia.

Os coeficientes de atividade dos componentes líquidos em um sistema são dependentes da composição e temperatura do mesmo. Para componentes puros, considera-se como uma mistura ideal, com  $\gamma_i$  assumindo o valor 1. À medida que a diluição é aumentada, os desvios da idealidade aumentam. O limite máximo, ou seja, a

condição de maior não-idealidade acontece na condição de diluição infinita. Neste ponto temos o coeficiente de atividade em diluição infinita (IDAC – infinite dilution activity coefficient). Nesta condição uma molécula de soluto está totalmente cercada pelo solvente; assim, não ocorre interação entre duas moléculas do soluto. Quando há atração entre as espécies presentes, o coeficiente de atividade atinge valores menores que 1, conseqüentemente, seu logaritmo natural atingirá valores negativos, enquanto para misturas que se repelem, este coeficiente atinge valores maiores que 1, e seu logaritmo, valores positivos.

O coeficiente de atividade é muito utilizado no cálculo de equilíbrios que contenham uma fase líquida. Estes equilíbrios são utilizados em diversas modelagens, como torres de destilação. Para atender tal demanda, uma gama de modelos termodinâmicos tem surgido a fim de expressar o valor deste coeficiente.

Os primeiros modelos para o cálculo do coeficiente de atividade eram empíricos, sendo dependentes de procedimentos experimentais para a determinação de seus parâmetros de interação, o que torna sua utilização dispendiosa e demorada. Com isso, vêm surgindo modelos mais sofisticados, de caráter preditivo, em que a estrutura molecular e as interações intermoleculares são levadas em consideração. Os modelos termodinâmicos preditivos UNIFAC (FREDENSLUND; JONES; PRAUSNITZ, 1975) e UNIFAC modificado (GREENSEMANN; GMEHLING, 2005) se baseiam na teoria de contribuição de grupos, assim o coeficiente de atividade de uma molécula em mistura é resultado da soma dos coeficientes dos grupos funcionais presentes na mesma, conseqüentemente, o número de parâmetros necessários para prever o comportamento de diversas misturas são consideravelmente reduzidos.

## 2.5 Modelo COSMO-SAC

O modelo COSMO-SAC, proposto por Lin e Sandler (2002), utiliza a teoria COSMO e termodinâmica estatística para estimar o valor do coeficiente de atividade de uma substância em mistura. Esta teoria, desenvolvida por Klamt e Schuurmann (1993), propõe que o coeficiente de atividade pode ser obtido a partir da energia livre de solvatação das moléculas em um condutor, e não requer dados experimentais de misturas. O modelo depende apenas de um conjunto de parâmetros universais, que uma vez determinados, segue sendo o mesmo. Por esse motivo, modelos baseados em COSMO são considerados quase que totalmente preditivos e poderiam ser utilizados para determinar o coeficiente de atividade de qualquer substância em qualquer mistura.

O primeiro modelo utilizando esta teoria foi o COSMO-RS (KLAMT, 1995). Variações desse modelo vêm sendo propostas, entre elas está o COSMO-SAC. Estes modelos são promissoras ferramentas de engenharia química, agregando informações aos já tradicionais modelos de contribuição de grupos. Simuladores já estão incorporando modelos baseados em COSMO mesmo com as imprecisões de um modelo não totalmente desenvolvido, devido às vantagens de economia de tempo e custos (MULLINS et al., 2008).

O modelo COSMO-SAC, assim como o COSMO-RS, utiliza um caminho diferente para a solvatação como mostrado na Figura 2.12, isso é possível, pois a energia de Gibbs é função de estado, ou seja, independente do caminho.

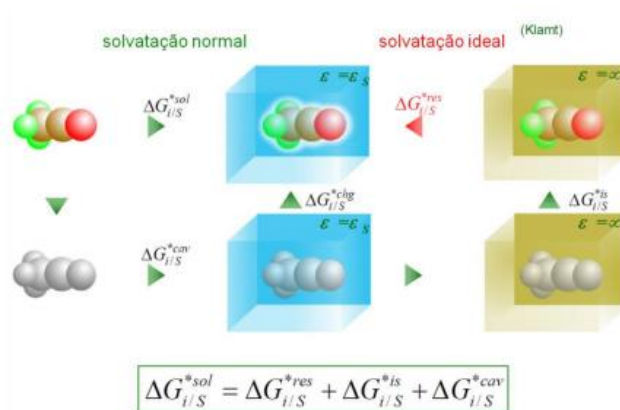


Figura 2.12 Caminho de solvatação proposto por Klant.

Fonte: LIN, S. T. *et al.*, 2002.

$\Delta G_{i/S}^{*is}$  representa a mudança da energia de Gibbs de solvatação ideal. Da solução ideal para a real, tem-se a representação da energia de restauração,  $\Delta G_{i/S}^{*res}$ .  $\Delta G_{i/S}^{*cav}$  representa a mudança na energia necessária para formar uma cavidade do exato tamanho da molécula. Por fim,  $\Delta G_{i/S}^{*sol}$  é o resultado das três contribuições.

O perfil sigma é obtido através da análise da superfície de cargas de uma molécula supostamente isolada. Esta molécula estaria imersa em um condutor perfeito, não sentindo a presença das demais moléculas do soluto. Para tal situação, é necessário que o campo elétrico resultante seja zero; com isso, as cargas do soluto devem ser neutralizadas no instante imediato ao da imersão da mesma, ficando, esta, blindada. Este perfil é um histograma da distribuição de cargas aparente induzida na superfície da molécula, obtido por cálculos de mecânica quântica. Na figura 2.13 são apresentados os perfis sigma para as moléculas de clorofórmio e para a unidade repetitiva do P(3HB). Esta informação, perfil  $s_i$ , é utilizada diretamente nos cálculos do  $\gamma_i$  pelos modelos COSMO-SAC e COSMO-RS.

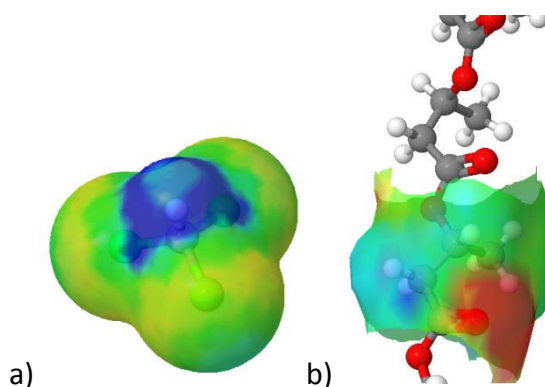


Figura 2.13 Superfície de carga induzida para: a) clorofórmio e b) unidade repetitiva do P(3HB).

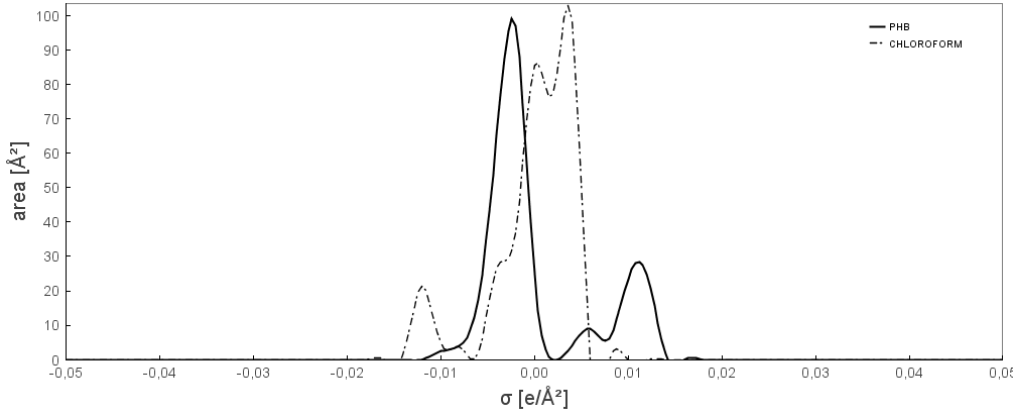


Figura 2.14 Perfil sigma para o par clorofórmio - PHB.

Segundo o modelo COSMO-SAC, o coeficiente de atividade de uma molécula em solução é oriundo de duas contribuições, uma residual e outra combinatorial (LIN, S.-T.; SANDLER, Stanley I, 2002b).

$$\ln\gamma_i = \ln\gamma_i^{res} + \ln\gamma_i^{comb} \quad 2.4.1$$

A parcela combinatorial leva em consideração as diferenças no formato e tamanho das moléculas, sendo dependente dos constituintes do sistema. Para soluções envolvendo polímeros, esta parcela se torna predominante frente à residual. A mesma pode ser calculada pela contribuição de Staverman-Guggenheim com uma modificação no termo de Flory-Huggins (GERBER; SOARES, 2010b).

$$\ln\gamma_i^{comb} = \ln\phi_i' + 1 - \phi_i' - \frac{z}{2}q_i \left( \ln\left(\frac{\phi_i}{\theta_i}\right) + 1 - \frac{\phi_i}{\theta_i} \right) \quad 2.4.2$$

em que  $\phi_i$ ,  $\phi_i'$  e  $\theta_i$  são as frações normalizadas do volume e da área superficial respectivamente, e podem ser calculados pelas equações 2.4.3, 2.4.4 e 2.4.5.  $z$  é um parâmetro global do modelo, chamado número de coordenação, normalmente seu valor é estipulado como 10.

$$\phi_i = \frac{r_i}{\sum_j r_j x_j} \quad 2.4.3$$

$$\theta_i = \frac{q_i}{\sum_j r_j x_j} \quad 2.4.4$$

$$\phi_i' = \frac{x_i r_i^p}{\sum_j r_j x_j} \quad 2.4.5$$



Nas equações 2.4.3, 2.4.4 e 2.4.5,  $r_i$  é o volume normalizado, calculado por 2.4.6, enquanto que  $q_i$  é a área superficial normalizada, dado por 2.4.7.  $p$  é um parâmetro universal do modelo.

$$r_i = \frac{v_i}{r} \quad 2.4.6$$

$$q_i = \frac{A_i}{q} \quad 2.4.7$$

$A_i$  é a superfície da cavidade e  $v_i$  o volume da cavidade.  $q$  também é um parâmetro universal do sistema.

Enquanto isso, a contribuição residual mensura as interações moleculares da solução, considerando as ligações de hidrogênio, dispersão e desajuste de carga, apesar deste último podendo ser dispensado por pouco contribuir (WANG, S.; SANDLER, Stanley I; CHEN, C.-C., 2007). Ainda assim é necessário subtrair o desajuste de cargas superficiais de um líquido puro. Assim o termo residual pode ser expresso como a diferença da energia de Gibbs para restaurar a carga molecular do soluto S na solução em comparação ao líquido puro I.

$$\ln \gamma_{i/s}^{res} = \frac{\beta (\Delta G_i^{*res} - \Delta G_i^{*res})}{RT} \quad 2.4.8$$

$\beta$  é um fator empírico introduzido posteriormente (GERBER; SOARES, 2010a), se tornando mais um parâmetro global do modelo. Neste trabalho, o valor de  $\beta$  foi mantido 1.

A energia livre de restauração de carga,  $\Delta G^{*res}$ , é um somatório do produto entre o perfil sigma,  $p_i(\sigma_m)$ , e o logaritmo natural do coeficiente de atividade de cada segmento de carga,  $\ln \Gamma_s(\sigma_m)$ , em toda a superfície (LIN, S.-T.; SANDLER, Stanley I, 2002a).

$$\frac{\Delta G_i^{*res}}{RT} = n_i \sum_{\sigma_m} p_i(\sigma_m) \ln \Gamma_s(\sigma_m) \quad 2.4.9$$

O coeficiente de atividade de um segmento é dependente dos coeficientes de atividade dos outros segmentos presentes na solução, sendo assim, não há resposta

analítica para o sistema. No software JCOSMO é possível chegar a uma solução através do método numérico de substituições sucessivas.

### 3 Metodologia

A comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com base no que foi apresentado na Seção 2.3, indicou como principais diferenças a maior espessura da camada de peptidoglicano e a presença dos ácidos teicóicos de parede e os ácidos lipoteicóicos nas bactérias Gram-positivas. Assim, a fim de estudar a diferença de comportamento na extração entre os dois tipos de bactérias gram-positivas, estes componentes foram tomados como base deste estudo inicial.

Utilizando o Software JCOSMO versão 2.1.2 estimou-se os valores de IDAC considerando misturas binárias de cada um dos três componentes estruturais escolhidos da parede celular com o P(3HB) e com os solventes estudados, conforme os esquemas representados na Figura 3.1. Os resultados serão comparados com os dados de recuperação e pureza para os solventes em questão retirados da literatura. Alguns dados comparativos com as Gram-positivas também serão considerados.

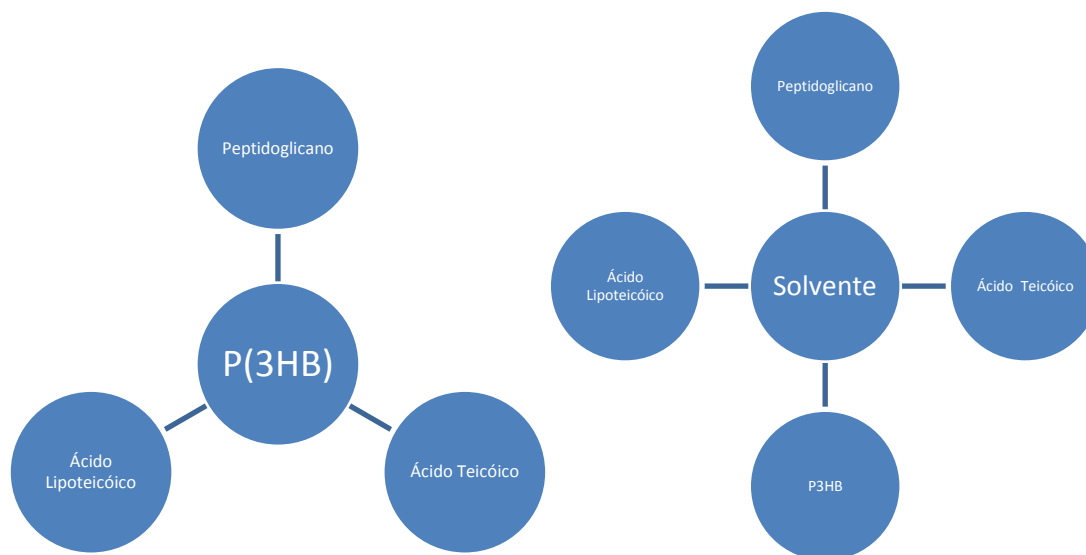


Figura 3.1 Esquemas representativo das interações a serem calculadas.

Os resultados foram comparados com os dados de recuperação e pureza retirados da literatura, a fim de avaliar, para os solventes em questão, a existência de alguma correlação entre as informações experimentais disponíveis e os valores de IDAC obtidos, que foram tomados como indicadores teóricos de afinidade das espécies para cada par de substâncias considerada.

### 3.1 Parâmetros do modelo COSMO-SAC

Os valores dos parâmetros requeridos pelo COSMO-SAC para o cálculo das interações entre as substâncias em questão, apresentados na tabela 3.1, foram os mesmos utilizados por AUAD (2015), que realizou o ajuste de parâmetros deste modelo a dados de equilíbrio sólido-líquido entre clorofórmio e P(3HB) na temperatura de 323 K.

Tabela 3.1 Parâmetros do modelo COSMO-SAC utilizados neste trabalho.

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor do parâmetro</i>
Normalização da área $q$ ( $\text{Å}^2$ )	64
Expoente empírico $p$	1,01
Energia de ligação de hidrogênio $c_{hb}$ (kcal/mol. $\text{Å}^4 / e^2$ )	65500
Valor de corte da ligação de hidrogênio $\sigma_{HB}$ ( $e/\text{Å}^2$ )	0,0061
Fator de polarização $f_{pol}$	0,6973
$z$ (número de coordenação)	10

Fonte: AUAD, 2015.

### 3.2 Desenvolvimento das estruturas

A partir das moléculas representadas nas figuras 2.7, 2.9 e 2.11, e dos solventes selecionados, as estruturas moleculares das substâncias estudadas foram construídas com auxílio dos programas Jmol e Avogadro. Em seguida, o programa MOPAC foi utilizado para a obtenção das superfícies de carga induzidas de cada estrutura. Esta etapa foi realizada pelo Mestre em Engenharia Fabrício Ferrarini do Laboratório Virtual de Predição de Propriedades (LVPP) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Devido à complexidade de tais moléculas, algumas simplificações foram necessárias para que pudessem ser implementadas no JCOSMO.

Para o peptidoglicano, escolheu-se representar apenas a unidade repetitiva, uma vez que está já fornecerá uma superfície de cargas para fins qualitativos de interação molecular, da estrutura (NAG, NAM e cadeia peptídica) encontrada para o *B. subtilis*, como já mostrada na Figura 2.7, devido à sua semelhança com o *B. megaterium*. A superfície de carga para a estrutura representativa do peptidoglicano está apresentada na Figura 3.2. Os pontos em vermelho representam uma concentração positiva de cargas induzidas, os azuis são uma concentração negativa de carga induzida e, por fim, a região verde indica neutralidade de cargas. Com isso pode-se perceber que o peptidoglicano apresenta uma distribuição complexa de cargas induzidas, com diferentes pontos de polarização.

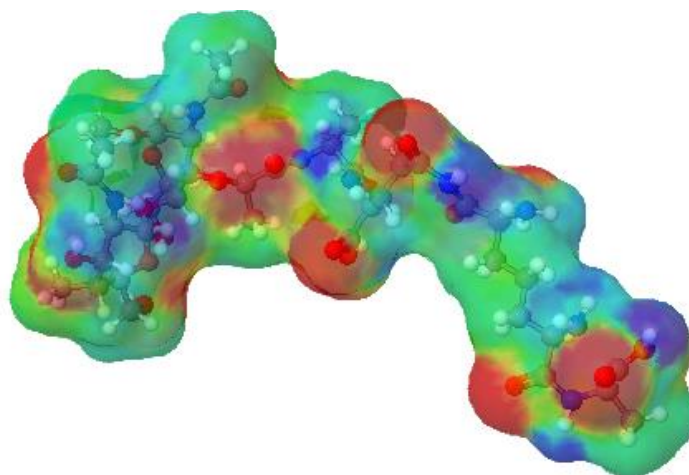


Figura 3.2 Superfície de cargas induzidas para uma molécula representativa do peptidoglicano.

Para as estruturas do ácido teicóico e do ácido lipoteicóico, também se fizeram necessárias simplificações. A partir da representação do ácido teicóico na Figura 2.9, foi adotado para  $m$  o valor 2 e para  $n$ , 5; além disso, foram considerados apenas substituintes  $y$  e  $z$  como hidrogênios, resultando, então, na Figura 3.3. A simplificação da molécula não se baseou em nenhum critério científico, apenas uma simplificação suficiente para que os cálculos do programa MOPAC convergissem.

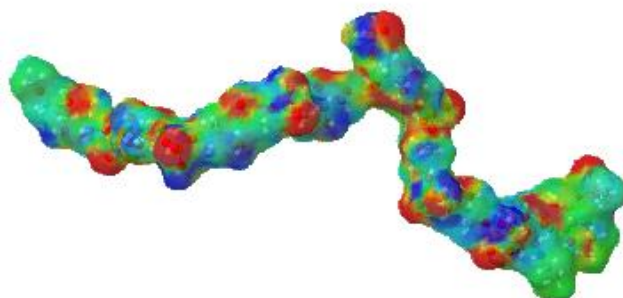


Figura 3.3 Superfície de cargas induzidas para a molécula representativa do ácido teicóico.

Para o ácido lipoteicóico, a estrutura foi gerada a partir de uma simplificação da cadeia ilustrada na Figura 2.11. As simplificações foram considerar  $n$  como 5 repetições e a cadeia carbônica com apenas 5 átomos e seus respectivos hidrogênios. O substituinte adotado foi a *D*-alanina com o objetivo que fornecesse maior diversidade na distribuição das cargas induzidas. A molécula de ácido lipoteicóico simplificada está representada na Figura 3.4. Novamente não adotou-se um critério científico para simplificar a molécula.

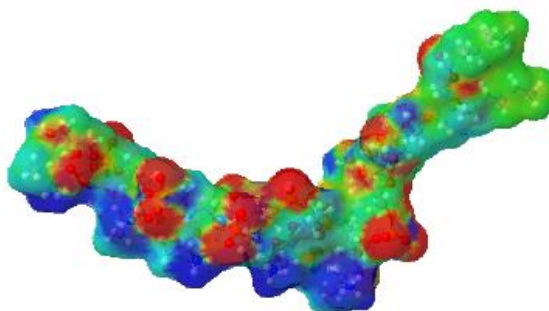


Figura 3.4 Superfície de cargas induzidas da molécula representativa do ácido lipoteicóico.

Em ambos os casos, assim como para o peptidoglicano, a distribuição de cargas se dá de maneira complexa, com concentrações de cargas tanto positivas quanto negativas.

Para o P(3HB), AUAD (2015) determinou que 15 unidades repetitivas são suficientes para que a superfície de cargas da unidade repetitiva central representasse a contribuição de cada unidade repetitiva sem mais sofrer influências de terminação de cadeia. A representação da molécula de P(3HB) com 15 repetições e a superfície de cargas resultante da unidade repetitiva central pode ser vista na Figura 3.5.

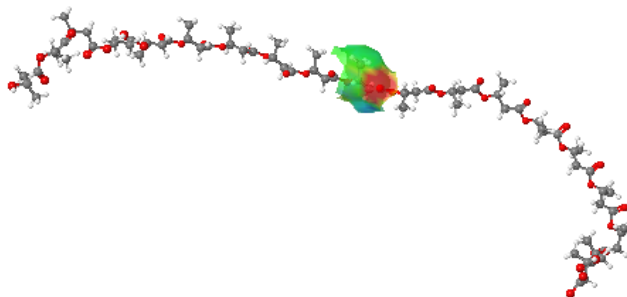


Figura 3.5 Superfície de cargas induzidas da unidade repetitiva do polímero P(3HB) utilizada por AUAD(2015) e por este trabalho.

A escolha dos solventes a serem estudados neste trabalho foi baseada no trabalho de mestrado realizado por BORGES (2017), em que há resultados experimentais de extração para o clorofórmio, *n,n*-dimetilacetamida, 2-heptanona (também conhecida como metil amil cetona) e carbonato de propileno. O perfil de carga induzida dos mesmos encontram-se na Figura 3.6.

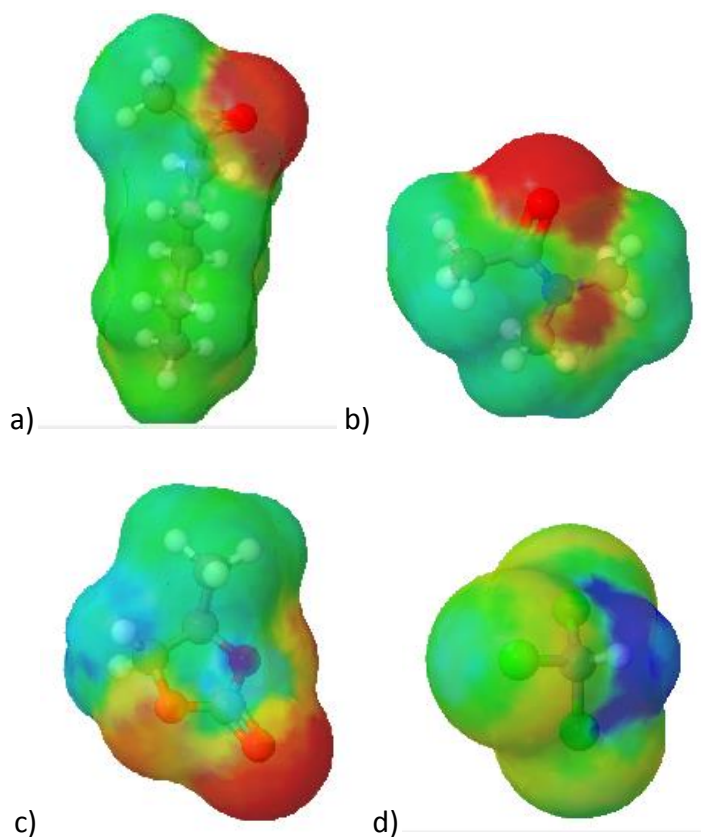


Figura 3.6 Perfis de cargas induzidas na superfície dos solventes: a) 2-heptanona b) n,n-dimetilacetamida c) carbonato de propileno d) clorofórmio

### 3.3 JCOSMO

Utilizando o modelo COSMO-SAC, o programa JCOSMO (GERBER E SOARES, 2008) permite visualizar o perfil do  $\ln\gamma_i$  para um par de substâncias em função das concentrações e da temperatura. Para o cálculo, é necessário inserir os parâmetros da tabela 3.2 e uma temperatura. Também é possível considerar a contribuição residual ou combinatorial separadamente. No presente trabalho, foram consideradas ambas as contribuições. Na figura 3.6 é apresentada a interface do programa JCOSMO.

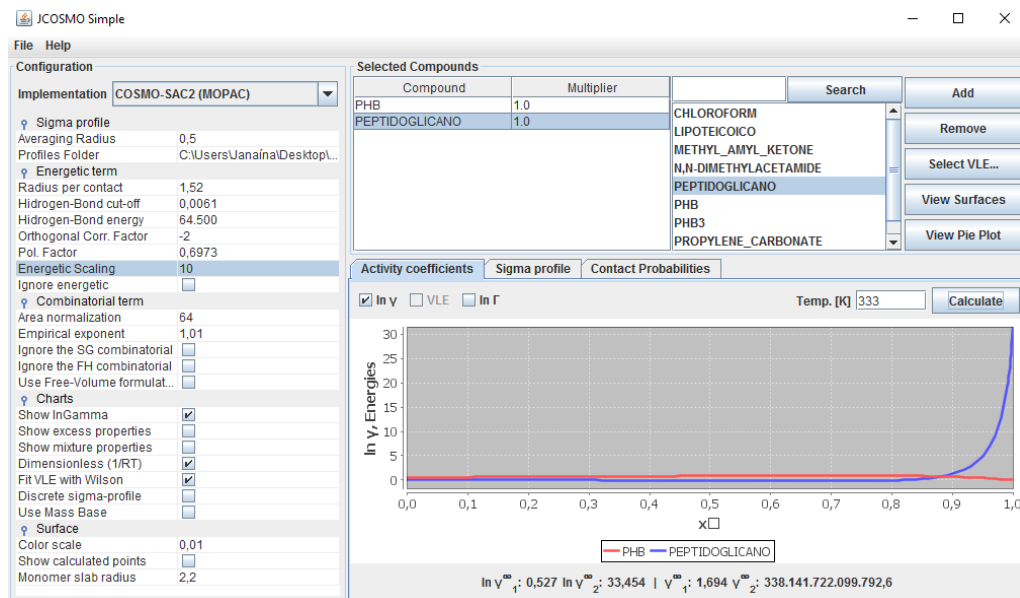


Figura 3.7 Interface gráfica do software JCOSMO.

O JCOSMO também retorna o coeficiente de atividade em diluição infinita, IDAC. Este coeficiente tem especial importância para este trabalho visto que a concentração das estruturas celulares em relação ao solvente é extremamente baixa nas condições em que foram obtidos os dados utilizados.

Apesar de o modelo não prever bem o efeito da temperatura para o P(3HB) devido à falta de dados experimentais para uma melhor parametrização (AUAD, 2015), a simulação com o clorofórmio foi realizada a 333 K, enquanto que para os outros solventes a temperatura foi de 433 K. A diferença é oriunda das condições experimentais utilizadas para o levantamento dos dados.

O JCOSMO resolve o sistema de equações gerado pelo equacionamento do modelo COSMO-SAC (ver Seção 2.5) através de um método de substituição sucessiva. O usuário não tem acesso aos parâmetros do método de resolução, sendo as tolerâncias e demais parâmetros internos ao JCOSMO. O usuário pode modificar os parâmetros universais do modelo COSMO-SAC, disponíveis no canto esquerdo da interface (Figura 3.7).

Para a realização dos cálculos de coeficiente de atividade, é apenas necessário o fornecimento das superfícies de cargas aparentes das moléculas, como mostrado na Seção 3.3. O JCOSMO extrai as informações das superfícies e transforma em histogramas (perfil sigma) informando as densidades de cargas por área da molécula. Estas informações são utilizadas para o cálculo da contribuição residual do  $\ln \gamma$ , mais especificamente das probabilidades  $p_i(\sigma_m)$  conforme a Equação 2.4.9. A parte combinatorial é dependente apenas da área superficial e volume das moléculas, dados advindos dos cálculos das estruturas de cargas já disponíveis nos arquivos das superfícies. Assim, não é necessária nenhuma informação adicional para cada molécula além do seu arquivo de superfícies de cargas induzidas.

## 4 Resultados e discussão

Primeiramente serão apresentados os resultados de coeficiente de atividade obtidos nas simulações com o programa JCOSMO. Posteriormente, é feita a comparação dos resultados de IDAC com os resultados experimentais de extração, discutindo-se a correlação entre eles, incluindo também possíveis efeitos de outras variáveis que podem influenciar o processo de extração do polímero da matriz celular.

### 4.1 Perfis de $\ln \gamma_i$

Os perfis de  $\ln \gamma_i$  para misturas de P(3HB) com os 4 solventes considerados são apresentados na Figura 4.1. Com um logaritmo do coeficiente de atividade assumindo valores negativos (quanto mais negativo, maior a atração das espécies químicas em solução), observa-se que o clorofórmio apresenta uma maior afinidade com o P(3HB) do que os demais solventes mesmo a uma temperatura significativamente inferior, 333 K contra 433 K.

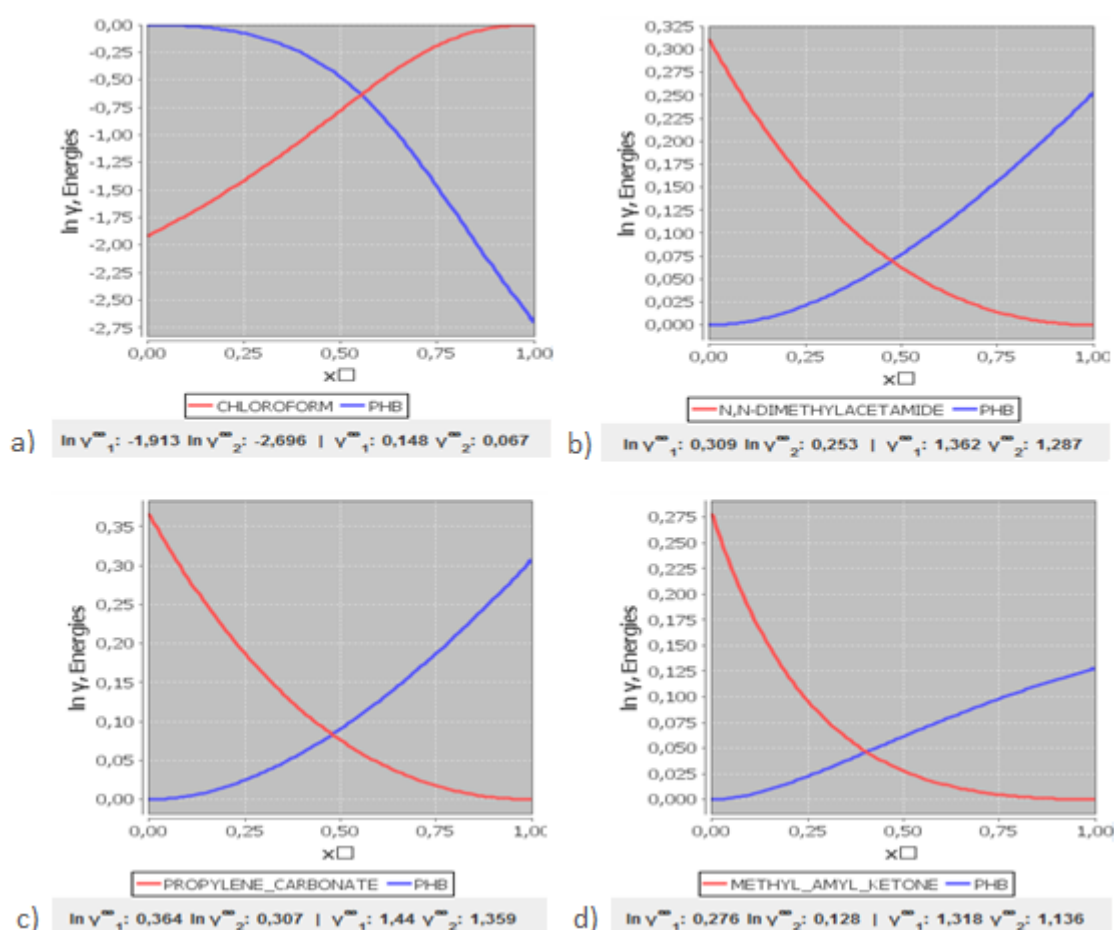


Figura 4.1 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de P(3HB) com: (a) clorofórmio ( $T = 333$  K), (b) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$  K), (c) carbonato de propileno ( $T = 433$  K) e (d) 2-heptanona ( $T = 433$  K).



#### 4.1.1 Solventes e Peptidoglicano

Com o peptidoglicano, as afinidades se demonstram mais variadas, como pode ser visualizado na Figura 4.2. Em destaque está a grande afinidade do clorofórmio com a estrutura celular, seguido da n,n-demetilacetamida com uma moderada afinidade. A 2-heptanona e o carbonato de propileno apresentaram afinidades semelhantes. Outro aspecto importante está no fato de o peptidoglicano demonstrar comportamentos de desvio da idealidade apenas para altas concentrações dos solventes.

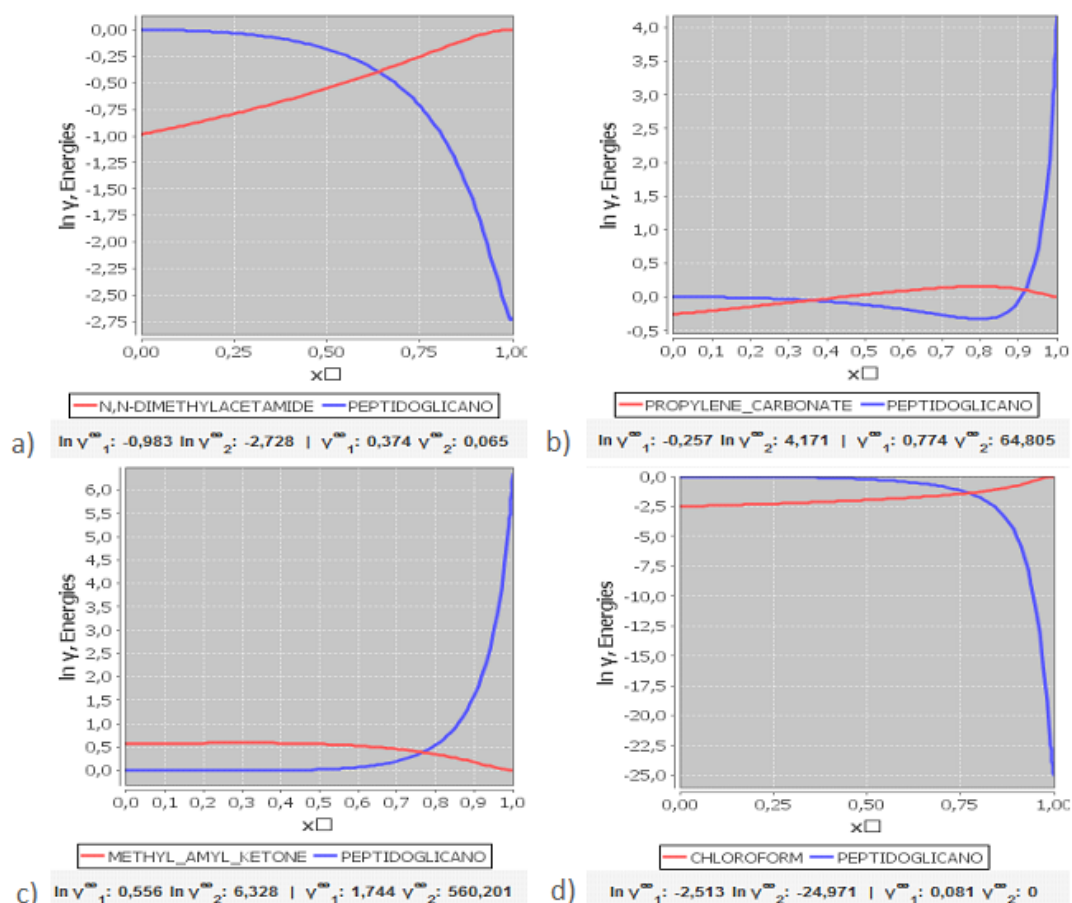


Figura 4.2 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de Peptidoglicano com: (a) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$  K), (b) carbonato de propileno ( $T = 433$  K), (c) 2-heptanona ( $T = 433$  K) e (d) clorofórmio ( $T = 333$  K).

#### 4.1.2 Solventes e Ácido Teicóico

Novamente o clorofórmio apresenta um comportamento diferenciado, como pode ser visto na Figura 4.3, com alta afinidade também com o ácido teicóico de parede. Apesar de semelhante o comportamento dos outros solventes neste aspecto, é possível destacar a n,n-dimetilacetamida, com logaritmo do coeficiente IDAC a níveis mais brandos que os demais. Assim como com o peptidoglicano, os desvios da idealidade são percebidos em altas concentrações dos solventes.

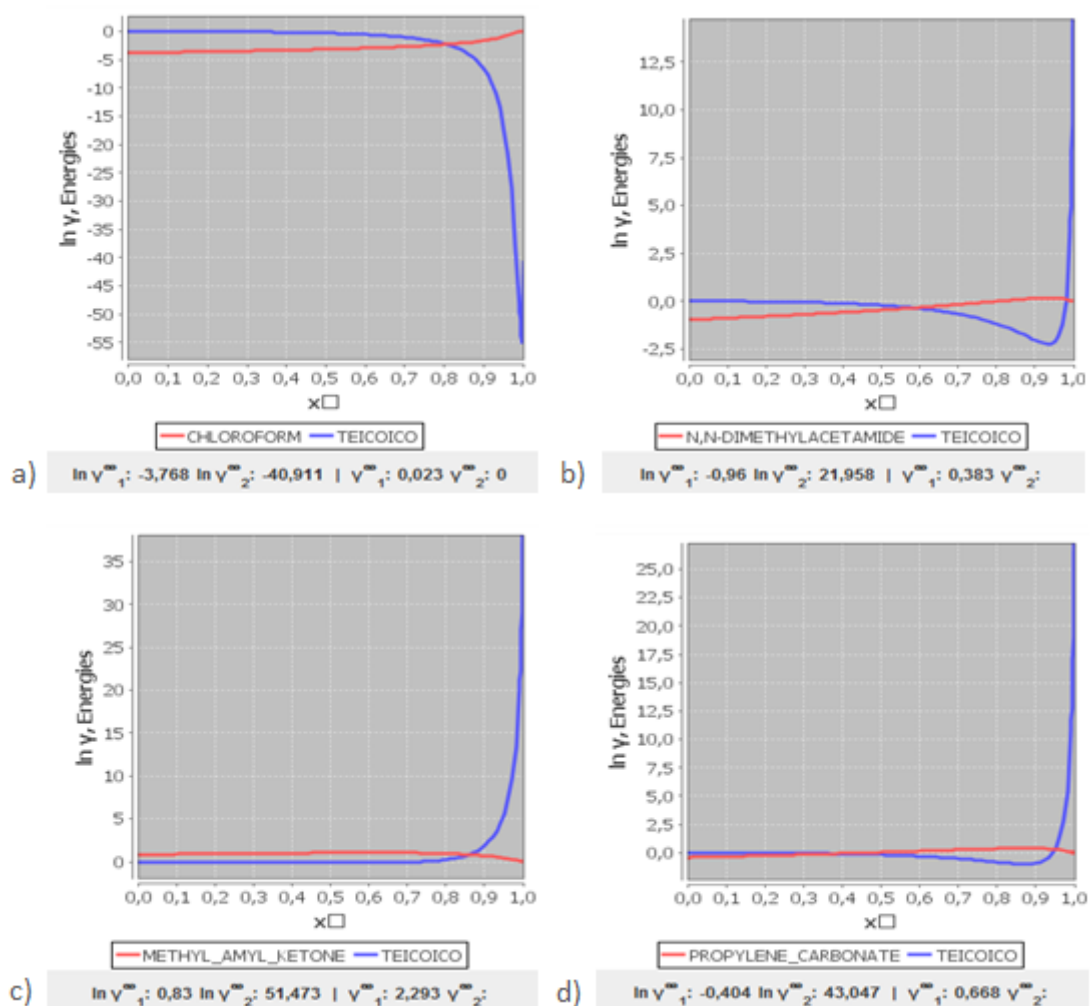


Figura 4.3 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido teicoico com: (a) clorofórmio ( $T = 333 \text{ K}$ ), (b) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433 \text{ K}$ ), (c) carbonato de propileno ( $T = 433 \text{ K}$ ) e (d) 2-heptanona ( $T = 433 \text{ K}$ ).

#### 4.1.3 Solventes e Ácido Lipoteicoico

Para os resultados deste composto celular (Figura 4.4), não foi percebida uma discrepância de comportamentos presente nos demais compostos. Apenas uma ligeira ordem crescente de tendência a se repelirem, iniciando com o clorofórmio, n,n-dimetilacetamida, seguido do carbonato de propileno e finalizando com a 2-heptanona. Esta estrutura começou a apresentar o desvio de idealidade para concentrações ainda maiores do solvente do que para as outras estruturas.

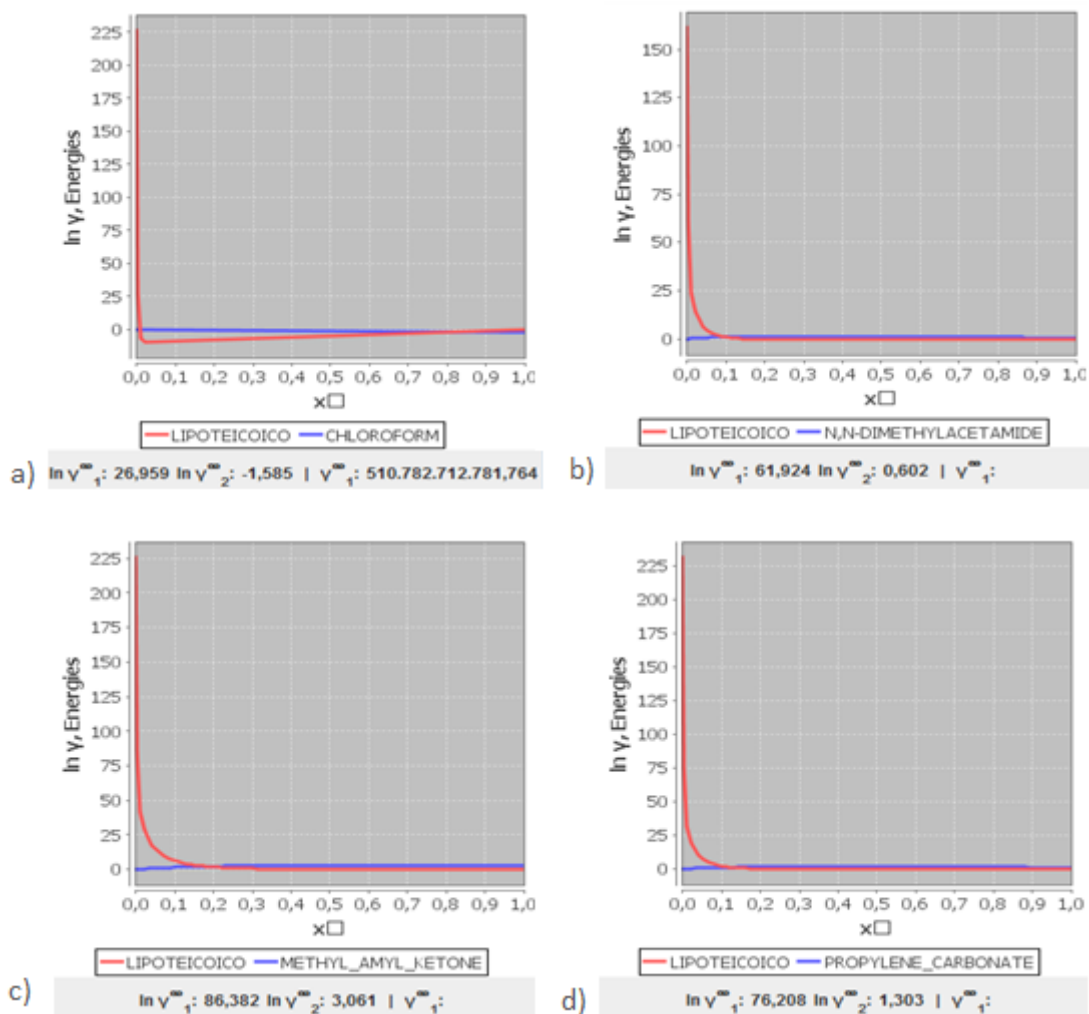


Figura 4.4 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido lipoteicóico com: (a) clorofórmio ( $T = 333$  K), (b) n,n-dimetilacetamida ( $T = 433$  K), (c) carbonato de propileno ( $T = 433$  K) e (d) 2-heptanona ( $T = 433$  K).

#### 4.1.4 P(3HB) e estruturas celulares

##### 4.1.4.1 Resultados em 433 K

A partir da Figura 4.17, o P(3HB) apresenta afinidade apenas com o peptidoglicano. Para as demais espécies químicas, a relação se dá com caráter repulsivo, quando em concentrações altas de P(3HB) em relação ao outro composto químico.

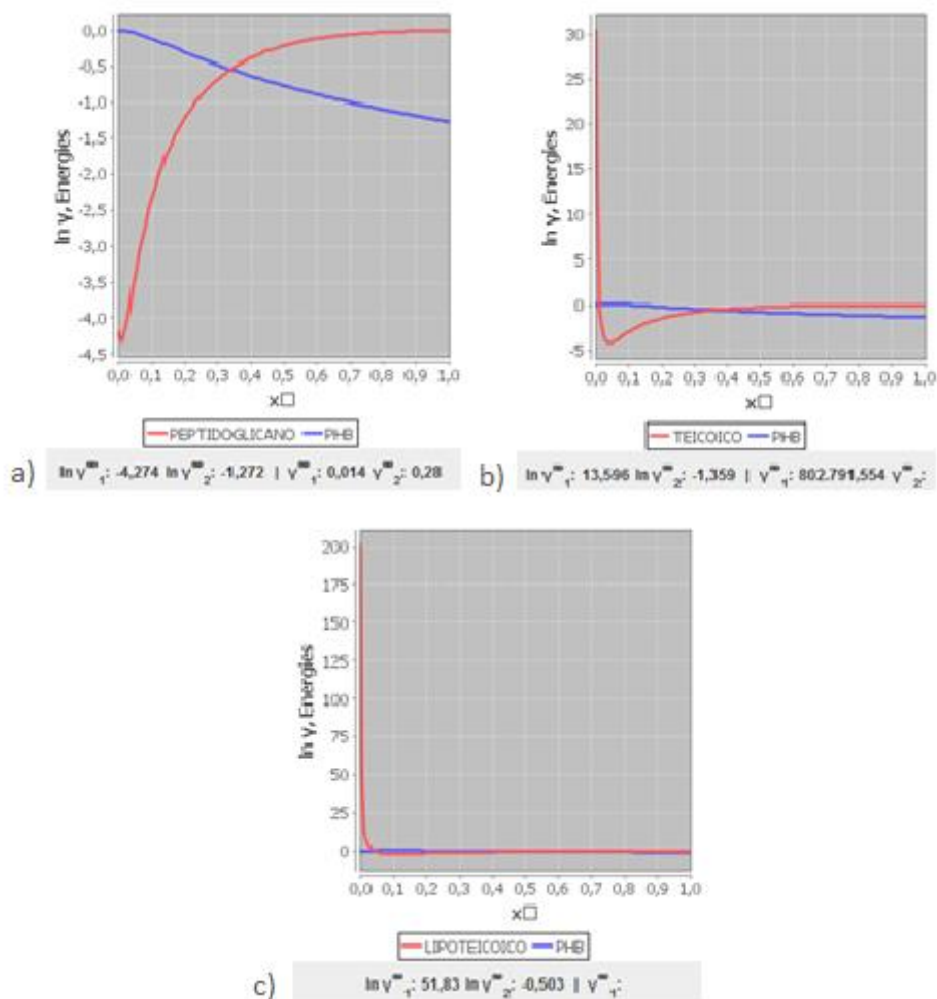


Figura 4.5 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido P(3HB) com: (a) peptidoglicano ( $T = 433$  K), (b) ácido teicóico ( $T = 433$  K), (c) ácido lipoteicóico ( $T = 433$  K)

#### 4.1.4.2 Resultados em 333 K

Apesar de temperaturas diferentes, os resultados das afinidades do P(3HB) com as outras estruturas celulares a 333 K (Figura 4.20) se mostraram semelhantes, com ligeiro aumento absoluto no logaritmo do coeficiente IDAC. O software JCOSMO parece não ter conseguido achar solução da equação 2.4.1 para uma faixa grande de concentrações da mistura P(3HB) ácido lipoteicóico, mostrando, provavelmente, um problema numérico para a resolução do modelo.

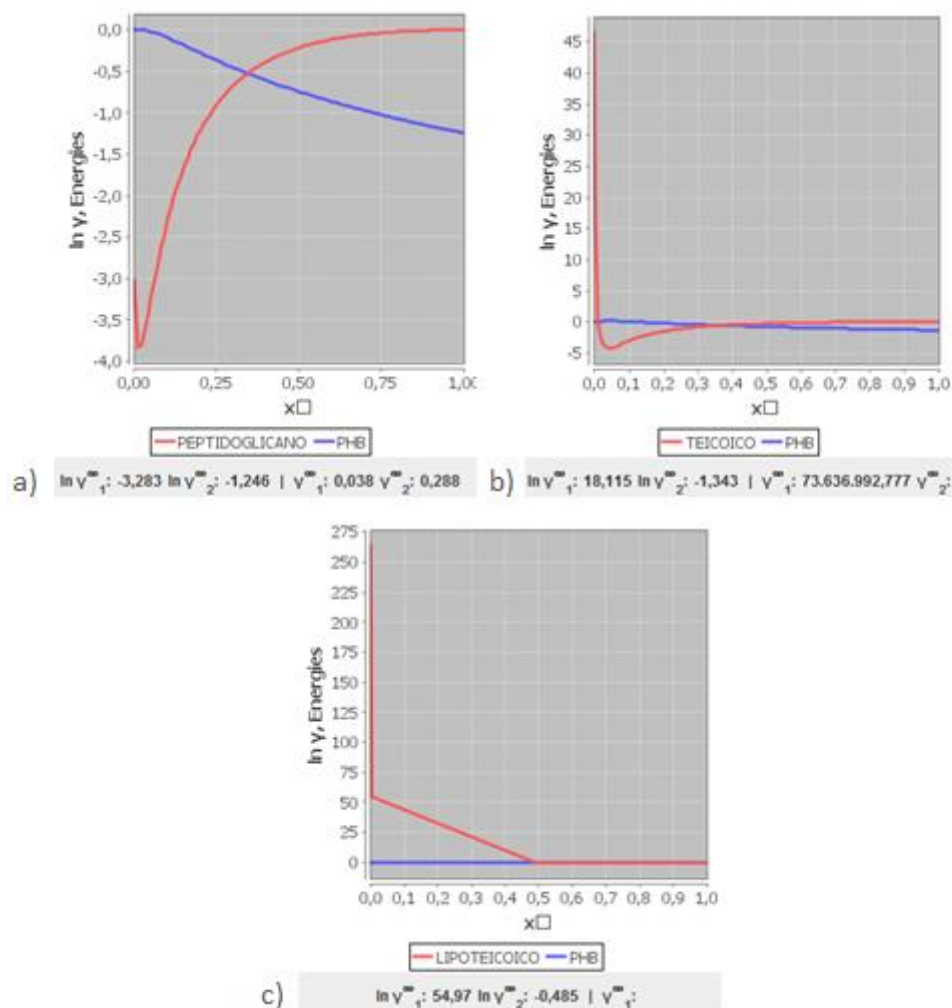


Figura 4.6 Perfis de  $\ln \gamma$  para misturas de ácido P(3HB) com: (a) peptidoglicano ( $T = 333$  K), (b) ácido teicóico ( $T = 333$  K), (c) ácido lipoteicóico ( $T = 333$  K)

## 4.2 Discussão com os dados experimentais

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os dados experimentais de extração para fins de comparação com os resultados teóricos apresentados na seção anterior.

A Tabela 4.1 apresenta os dados para extração a partir da *B. megaterium*, em experimentos realizados usando a proporção de 20 mL de solvente para cada 0,2 g de biomassa contendo 46,7 % P(3HB). Isto resulta em concentrações baixas de P(3HB) e dos outros compostos celulares considerados, o que possibilita uma análise qualitativa baseada nos coeficientes a diluição infinita.

Tabela 4.1 Dados de recuperação e pureza do P3HB a partir do *B. megaterium* (Gram-positiva).

Dados para <i>B. megaterium</i>					
Solventes	Recuperação	Pureza	Tempo (min)	°C	Fonte
Clorofórmio	14%	87%	180	60	(BORGES, 2017)
Clorofórmio	82%	92%	2880	60	(VALAPPIL; MISRA; <i>et al.</i> , 2007)
N,N-Dimetilacetamida	99%	93%	30	160	(BORGES, 2017)
Carbonato de Propileno	17%	96%	15	160	(BORGES, 2017)
Carbonato de Propileno com pré-tratamento	27%	80%	15	160	(BORGES, 2017)
Heptanona	23%	79%	180	160	(BORGES, 2017)
Heptanona sem pré-tratamento	8%	74%	15	160	(BORGES, 2017)
Heptanona com pré-tratamento	12%	55%	15	160	(BORGES, 2017)

\* O pré-tratamento consiste em basicamente um micro moinho de bolas em que a biomassa e o solvente são submetidos e posteriormente centrifugados. Este processo pode expor e romper por cisalhamento algumas estruturas, deixando-as expostas ao solvente, o que explicaria o decréscimo na pureza quando há o pré-tratamento.

A Tabela 4.2 apresenta os dados para extração a partir da bactéria *C. necator*, em experimentos realizados na proporção de 75 ml de solvente para 11,5g de biomassa com concentração de 30% de P(3HB).

Tabela 4.2 Dados de recuperação e pureza do P3HB a partir do *C. necator* (Gram-negativa).

Dados para <i>C. Necator</i>					
Solventes	Recuperação	Pureza	Tempo	°C	Fonte
Clorofórmio	50%	70%	45	60	(QUINES, 2010)
Carbonato de Propileno	95%	84%	45	150	(QUINES, 2010)
Carbonato de Propileno	35%	84%	15	130	(QUINES, 2010)

A fim de facilitar a comparação dos resultados teóricos com os dados experimentais de extração, a Tabela 4.2 apresenta todos os valores de IDAC obtidos a partir dos dados apresentados nas Figuras 4.1-4.20.

Tabela 4.3 Valores dos logaritmos dos coeficientes de diluição infinita para cada par de solução.

Solventes	Coeficientes de diluição infinita				
	P3HB	Peptidoglicano	Ácido Teicóico	Ácido Lipoteicóico	T K
<b>Clorofórmio</b>	-2,696	-24,971	-40,911	26,959	333
<b>N,N-Dimetilacetamida</b>	0,253	-2,728	21,958	61,924	433
<b>Carbonato de Propileno</b>	0,307	4,171	43,047	76,208	433
<b>Heptanona</b>	0,128	6,328	2,293	86,382	433
<b>P3HB</b>		-4,208	30,409	51,83	433
<b>P3HB</b>		-3,012	46,463	54,97	333

Dos resultados com a bactéria Gram-positiva (Tabela 4.1), observa-se que a N,N-Dimetilacetamida permitiu atingir rendimentos de extração bem mais elevados que o carbonato de propileno, a 2-heptanona e o clorofórmio. Este resultado não está de acordo com os valores de IDAC da coluna P(3HB) da Tabela 4.3, segundo os quais o clorofórmio apresentaria a maior afinidade com relação P(3HB) que os outros três solventes.

A explicação para o fato de que a N,N-Dimetilacetamida, o carbonato de propileno e a 2-heptanona permitiram significativa dissolução do P(3HB) apesar da sua relativamente baixa afinidade com o P(3HB) pode estar relacionada ao feito da temperatura de extração, que para estes solventes foi 100 K mais elevada que no caso da extração com clorofórmio (devido a limitação relacionada a temperatura de ebulição do clorofórmio). Esta temperatura elevada permite trabalhar com o polímero em uma condição mais próxima à sua temperatura de fusão, 433 K (BARHAM; KELLER; OTUN, 1984), de modo que suas cadeias apresentam uma mobilidade muito mais elevada e um espaço intermolecular médio muito maior, facilitando o contato solvente-polímero e, conseqüentemente, a dissolução.

Por outro lado, para tentar explicar o melhor desempenho da N,N-Dimetilacetamida com relação ao carbonato de propileno e à 2-heptanona, é interessante analisar os valores dos coeficientes de atividade P(3HB)-polpetidoglicano e solvente-polpetidoglicano na Tabela 4.3 (coluna Polipetidoglicano). Observa-se que a N,N-Dimetilacetamida tem uma afinidade com o polpetidoglicano similar àquela apresentada pelo P(3HB), enquanto o carbonato de propileno e a 2-heptanona não apresentam afinidade com este composto. Isto poderia implicar, no caso do carbonato de propileno e da 2-heptanona, em uma maior dificuldade de manter os polímeros em solução ao passar pela camada de polipetidoglicado da parede celular, o que justificaria a maior capacidade de extração da N,N-Dimetilacetamida. Cabe ressaltar de que esta hipótese está de acordo com o fato de que com a bactéria Gram-negativa, na qual a camada de polipetidoglicano é menos espessa, foi possível atingir rendimentos elevados de extração com o carbonato de propileno (Tabela 4.2).

Em uma análise similar à anterior, observa-se que o clorofórmio, apesar da maior afinidade com o P(3HB), apresenta também um comportamento inverso ao polímero em termos de afinidade com um dos componentes da parede celular, neste caso o ácido teicóico. Assim, com base na hipótese feita no parágrafo anterior, esta poderia ser uma

justificativa para a baixa recuperação de P(3HB) nas extrações com clorofórmio. Também neste caso, os melhores resultados obtidos na extração com clorofórmio a partir da bactéria Gram-negativa são consistentes com a hipótese feita, visto que neste tipo de bactéria a parede celular não contém ácido teicóico.

Outro aspecto importante a ressaltar na comparação os dados das Tabelas 4.1 e 4.3 é que não foi possível estabelecer nenhuma correlação qualitativa entre os dados de extração e os valores de IDAC com relação ao ácido lipoteicóico. Isto sugeriria que este composto não tem um papel relevante no processo de extração.

Por último deve-se mencionar que os dados experimentais discutidos nesta seção deixam claro que há outros fenômenos que tem que ser levados em conta para uma análise completa do processo de extração do P(3HB). O mais evidente deles é a existência de controle difusivo no processo, conforme indicado pela influência do tempo no rendimento de extração com clorofórmio (Tabela 4.2) e do pré-tratamento no caso das extrações com carbonato de propileno e 2-heptanona. Nestes casos houve aumento do rendimento de extração com o aumento do tempo de extração e com a aplicação do pré-tratamento.

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Estudando a parede celular das bactérias, é possível perceber estruturas complexas presentes apenas nas bactérias Gram-positivas, os ácidos teicóicos e lipoteicóicos. Outra diferença está na parede de peptidoglicano, cerca de 20 vezes mais espessa nas bactérias Gram-positivas. Estas estruturas podem estar contribuindo para as diferenças nas recuperações do P(3HB) dos grânulos celulares. Os resultados das simulações de cada par de substância aliados com o cruzamento dos dados experimentais de extração demonstram que a parede celular influencia na extração do P(3HB), ainda que de dinâmica não totalmente conhecida. Diferentes naturezas de afinidades do solvente e do P(3HB) com as estruturas celulares parecem resultar negativamente para a extração. Uma etapa difusiva também foi observada quando analisados os dados experimentais de extração. Outro fato importante é que, para altas temperaturas de extração, a pouca afinidade do solvente com o P(3HB) parece ser superada em virtude da proximidade do experimento com a temperatura de fusão do polímero.

As limitações computacionais e experimentais conduziram à hipóteses apenas. Indisponibilidade de equipamentos, simplificações nas moléculas estudadas e dificuldade do modelo COSMO-SAC em prever o efeito da temperatura nos coeficientes de atividade são algumas destas limitações.

Para melhor compreender os fenômenos presentes na extração do P(3HB) do meio celular, seria prudente estudar o escoamento em meio poroso da solução solvente e polímero na parede de peptidoglicano, para isso também, compreender melhor a arquitetura presente na estrutura da parede celular. Maior fidelidade nas estruturas celulares, construídas computacionalmente, com as reais, seria útil para refinar os resultados, assim como novos parâmetros para o modelo COSMO-SAC. Aplicar a simulações para novos solventes e testar experimentalmente a eficácia dos mesmos seria de grande valia para aprimorar as hipóteses ou até mesmo comprova-las.



## 6 Referências

- AGUS, J. *et al.* Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polymer Degradation and Stability**, 2006. v. 91, n. 5, p. 1138–1146.
- AUAD, P. Estudo de alternativas de solventes para a extração de P3HB através do modelo termodinâmico COSMO-SAC. (Dissertação de Mestrado) - UFRGS. 2015.
- B, C. *et al.* a Importância E As Vantagens Do Polihidroxibutirato (Plástico Biodegradável). **Holos**, 2004. p. 76–81.
- BARHAM, P. J.; KELLER, A.; OTUN, E. L. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic : poly-3-hyd roxybutyrate. **ICI Agricultural Division**, 1984. v. 19, p. 2781–2794.
- BATURO, A.; RAGINSKAYA, V. Antigenic Scheme for the Hafniae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1979. p. 126–127.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, 1998. v. 65, n. 2–3, p. 127–161.
- BROWN, S.; SANTA MARIA, J. P.; WALKER, S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 2013. v. 67, n. 1, p. 313–336. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-092412-155620>>.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, 1987. v. 5, n. 9, p. 246–250.
- CZERNIECKA, A. *et al.* Heat capacity of poly(3-hydroxybutyrate). **Journal of Chemical Thermodynamics**, 2014. v. 73, p. 76–84.
- DALCANTON, F. Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos. (Tese de mestrado) - UFSC. 2006
- FEDTKE, I. *et al.* A *Staphylococcus aureus* ypfP mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. **Molecular Microbiology**, 2007. v. 65, n. 4, p. 1078–1091.
- FIORESE, M. L. *et al.* Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, 2009. v. 9, n. 6, p. 454–461.
- FREDENSLUND, A.; JONES, R. L.; PRAUSNITZ, J. M. Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. **AIChE Journal**, 1975. v. 21, n. 6, p. 1086–1099. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/aic.690210607>>.
- GERBER, R. P.; SOARES, R. De P. Prediction of Infinite-Dilution Activity Coefficients Using UNIFAC and COSMO-SAC Variants. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, ago. 2010a. v. 49, n. 16, p. 7488–7496.

- GERBER, R.; SOARES, R. Prediction of Infinite-Dilution Activity Coefficients Using UNIFAC and COSMO-SAC Variants. doi: 10.1021/ie901947m: **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 18 ago. 2010b. v. 49, n. 16, p. 7488–7496. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ie901947m>>.
- GRENSEMANN, H.; GMEHLING, J. Performance of a Conductor-Like Screening Model for Real Solvents Model in Comparison to Classical Group Contribution Methods. doi: 10.1021/ie049139z: **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 1 mar. 2005. v. 44, n. 5, p. 1610–1624. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ie049139z>>.
- HOGG, S. Essential Microbiology. Glamorgan, UK: **Viruses**, 2005. p. 260.
- KAHAR, P. *et al.* High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, 2004. v. 83, n. 1, p. 79–86.
- KATZENELLENBOGEN, E. *et al.* Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Citrobacter gillenii* O11, strain PCM 1540. **Carbohydrate Research**, 2003. v. 338, n. 13, p. 1389–1395.
- KIM, S. J.; CHANG, J.; SINGH, M. Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2015. v. 1848, n. 1, p. 350–362. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.031>>.
- KLAMT, A. Conductor-like Screening Model for Real Solvents: A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. doi: 10.1021/j100007a062: **The Journal of Physical Chemistry**, 1 fev. 1995. v. 99, n. 7, p. 2224–2235. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/j100007a062>>.
- KÜBLER-KIEŁB, J. *et al.* Structure and serological analysis of the *Hafnia alvei* 481-L O-specific polysaccharide containing phosphate in the backbone chain. **Carbohydrate Research**, 2006. v. 341, n. 18, p. 2980–2985.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and bioengineering**, 1996. v. 49, p. 1–14.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation and Stability**, 1998. v. 59, n. 97, p. 387–393.
- LENCZAK, J. L. Valorização do resíduo industrial com a produção de Poli (3-hidroxitirato) por *Cupriavidus necator*. 2006.
- LIN, S.-T.; SANDLER, S. I. A Priori Phase Equilibrium Prediction from a Segment Contribution Solvation Model. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, maio. 2002a. v. 41, n. 9, p. 2332–2334.
- LIN, S. T. *et al.* Improvements of Phase-Equilibrium Predictions for Hydrogen-Bonding Systems from a New Expression for COSMO Solvation Models. [S.l.]: [s.n.], 2002. p. 3–8.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 1999. v. 63, n. 1, p. 21–53.

MEROUEH, S. O. *et al.* Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006. v. 103, n. 12, p. 4404–4409.

MORATH, S. *et al.* Structural Decomposition and Heterogeneity of Commercial Lipoteichoic Acid Preparations. 2002. v. 70, n. 2, p. 938–944.

MORSE, M. C. *et al.* Anaerobic biodegradation of the microbial copolymer poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyhexanoate): Effects of comonomer content, processing history, and semi-crystalline morphology. **Polymer**, 2011. v. 52, n. 2, p. 547–556. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.024>>.

MULLINS, E. *et al.* Sigma Profile Database for Predicting Solid Solubility in Pure and Mixed Solvent Mixtures for Organic Pharmacological Compounds with COSMO-Based Thermodynamic Methods. doi: 10.1021/ie0711022: **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 1 mar. 2008. v. 47, n. 5, p. 1707–1725. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ie0711022>>.

OKU, Y. *et al.* Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. **Journal of Bacteriology**, 2009. v. 91, n. 1, p. 141–151.

PACHECHO, M. Extração Do Biopolímero P(3HB) Com Solvente Extração Do Biopolímero P (3Hb ) Com Solvente. (Dissertação de Mestrado) - UFRGS. 2014.

POPHAM, D. L.; TECH, V.; MC, D. H. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore : the inner wall of the lockbox. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2002. v. 59, p. 426–433.

QUINES, L. K. D. M. Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno. UFSC. 2010.

RAO, K. H.; VILINSKA, A.; CHERNYSHOVA, I. V. Minerals bioprocessing: R & D needs in mineral biobeneficiation. **Hydrometallurgy**, 2010. v. 104, n. 3–4, p. 465–470.

SCHAGGER, H.; CRAMER, W. A.; VONJAGOW, G. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. **Analytical Biochemistry**, 1994. v. 217, n. 2, p. 220–230. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269784711122>>.

SCHIRNER, K. *et al.* Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipoteichoic acids in *Bacillus subtilis*. **The EMBO Journal**, 2009. v. 28, n. 7, p. 830–842. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2009.25>>.

SWOBODA, J. G. *et al.* Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis , and Inhibitin. 2010. v. 11, n. 1, p. 35–45.

TEIXEIRA, P. R. Técnica de Coloração de Gram. **Ministerio da Saúde**, 2001. p. 67.

TOKIWA, Y. *et al.* Biodegradability of Plastics Bio-plastics. 2009. p. 3722–3742.

VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; *et al.* Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**,

2007. v. 91, n. 1, p. 1–17.

VALAPPIL, S. P.; MISRA, S. K.; *et al.* Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV.

**Journal of biotechnology**, 2007. v. 132, n. 3, p. 251–258.

VOLLMER, W.; SELIGMAN, S. J. Architecture of peptidoglycan : more data and more models. 2010. n. January, p. 59–66.

WANG, G. *et al.* High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2014. v. 1838, n. 9, p. 2160–2172. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.016>>.

WANG, S.; SANDLER, S. I.; CHEN, C.-C. Refinement of COSMO–SAC and the Applications. doi: 10.1021/ie070465z: **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 1 out. 2007. v. 46, n. 22, p. 7275–7288. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ie070465z>>.

WU, Z. *et al.* Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells. **Carbohydrate Polymers**, 2013. v. 96, n. 2, p. 466–473. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.028>>.

YU, J.; DOW, A.; PINGALI, S. The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2013. v. 38, n. 21, p. 8683–8690.