

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea in ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**Valorizzazione dei poliidrossialcanoati (PHA) per  
la produzione di composti chimici e materiali.**

Tesi di laurea in Chimica organica

**Relatore**

Prof.ssa Galletti Paola

**Presentata da**

D'Ambrosio Martina

**Correlatore**

Prof.ssa Samorì Chiara

Dott. Parodi Adriano

Sessione Anno Accademico 2019/2020



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. LA CHIMICA VERDE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. CHIMICA DA BIOMASSE E SCARTI</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. BIOPLASTICHE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. POLIDROSSIALCANOATI</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5. POLIIDROSSIBUTIRRATO</b> .....	<b>7</b>
1.5.1. Biosintesi.....	8
1.5.2. Recupero del PHB e PHA dalla biomassa.....	10
1.5.2.1. Metodo di digestione .....	11
1.5.2.2. Estrazione con solvente .....	13
1.5.2.2.1. Solventi alogenati.....	13
1.5.2.2.2. Solventi non alogenati .....	13
1.5.2.3. Estrazione acquosa a due fasi .....	15
1.5.2.4. Estrazione con fluidi supercritici .....	15
1.5.2.5. Interruzione meccanica.....	15
1.5.3. Biodegradabilità.....	16
1.5.4. Riciclo del PHB .....	16
1.5.4.1. Termolisi .....	16
1.5.4.2. Alcolisi .....	17
1.5.4.3. Idrolisi .....	18
1.5.4.4. Degradazione enzimatica.....	18
<b>1.6. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>19</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. Solventi e reagenti</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2. Strumenti utilizzati</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3. Sintesi del solvente</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4. Determinazione del contenuto di PHB nella biomassa batterica</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5. Estrazione del PHB</b> .....	<b>24</b>
<b>2.6. Test di biodegradazione aerobica dei solventi</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7. Determinazione del log <math>K_{ow}</math> dei solventi</b> .....	<b>28</b>
<b>2.8. Solubilità in acqua deuterata dei solventi</b> .....	<b>30</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Sintesi del solvente</b> .....	<b>31</b>
3.1.1. Prima strategia di sintesi .....	31

3.1.2. Seconda strategia di sintesi .....	35
<b>3.2. Estrazione del PHB .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Caratterizzazione del polimero estratto .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Test di biodegradazione aerobica dei solventi .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Determinazione del <math>\log K_{ow}</math> dei solventi .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6. Solubilità in acqua deuterata dei solventi .....</b>	<b>42</b>
<b>4. CONCLUSIONE .....</b>	<b>43</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. LA CHIMICA VERDE

La chimica verde o sostenibile è una branca della chimica introdotta all'inizio degli anni '90 e avente come obiettivo la sostenibilità ambientale, attraverso la progettazione di prodotti e processi chimici che riducono o eliminano l'uso e la generazione di sostanze pericolose per l'uomo e per l'ambiente. In particolare, vengono affrontati sia rischi evidenti che quelli associati a questioni globali come il cambiamento climatico, la produzione di energia, la produzione di alimenti e la presenza di sostanze tossiche nell'ambiente [1], [2]. L'industria chimica deve dunque orientarsi ad una trasformazione diretta verso l'individuazione di materie prime rinnovabili alternative alle tradizionali risorse di origine fossile, di processi chimici più sicuri per l'ambiente ed energeticamente efficienti, evitando l'uso di molecole tossiche e reazioni che producano grandi quantità di rifiuti. Tali concetti sono raggruppati in dodici principi su cui si basa la chimica verde, al fine di progettare nuovi prodotti e processi chimici da applicare all'intero ciclo di vita del processo:

1. *Waste Prevention*. È meglio prevenire la produzione di rifiuti piuttosto che gestire o trattare i rifiuti una volta formati;
2. *Atom Economy*. I metodi sintetici dovrebbero essere progettati per massimizzare l'incorporazione nel prodotto finale di tutti i materiali utilizzati nel processo;
3. *Safer Synthesis*. Le metodologie sintetiche dovrebbero essere progettate per utilizzare e generare sostanze che presentino una tossicità minima o nulla per la salute umana e l'ambiente;
4. *Safer Products*. I prodotti chimici dovrebbero essere progettati per preservare l'efficacia della loro funzione riducendo la tossicità;
5. *Safer Auxiliaries*. L'uso di solventi e di altre sostanze ausiliarie dovrebbe essere evitato o limitato a sostanze innocue;
6. *Energy Efficiency*. Il fabbisogno energetico dei processi chimici dovrebbe essere valutato per i problemi ambientali ed economici e dovrebbe essere ridotto al minimo. I metodi sintetici dovrebbero essere condotti a pressione e temperatura ambiente;
7. *Renewable Feedstocks*. Materie prime e fonti di energia dovrebbero essere innocue per l'uomo e l'ambiente. Le risorse rinnovabili dovrebbero sostituire quelle non rinnovabili;
8. *Derivative Reduction*. La derivatizzazione non necessaria dovrebbe essere minimizzata o evitata, poiché tali passaggi richiedono reagenti aggiuntivi e conseguente generazione di rifiuti.

9. *Catalysis*. Incrementare l'uso di reagenti catalitici invece che dei reagenti stechiometrici;
10. *Degradability*. I prodotti chimici dovrebbero essere progettati in modo tale che alla fine della loro funzione si degradino in prodotti di degradazione innocui e che non persistano nell'ambiente;
11. *Pollution prevention*. Le metodologie analitiche dovrebbero permettere il monitoraggio ambientale ed il controllo dell'inquinamento in tempo reale durante la produzione dei prodotti chimici;
12. *Accident prevention*. Le sostanze utilizzate in un processo chimico e la relativa provenienza dovrebbero essere individuate per ridurre al minimo il rischio di incidenti chimici, inclusi sversamenti, esplosioni e incendi [3].

Attuando tali principi è possibile prevenire il rischio e l'impatto ambientale, piuttosto che gestire eventuali conseguenze dovute alla mancata applicazione di tali pratiche.

## 1.2. CHIMICA DA BIOMASSE E SCARTI

Il modello di crescita economica su cui è fondata la società odierna viene definito modello lineare. Questo rappresenta un'economia basata sull'estrazione di materie prime, produzione e consumo di prodotti e successivo smaltimento. Tale modello però ha portato a un aumento insostenibile di consumi di materia prima e di energia, richiesta ad ogni tappa della vita di un prodotto, ed emissioni di inquinanti. Ad esempio, il fattore principale e significativo del cambiamento climatico nel nostro pianeta è l'aumento della concentrazione di gas serra, come anidride carbonica e metano, in atmosfera che sono spesso i prodotti intermedi e finali di questo approccio dovuto all'utilizzo poco efficiente e sostenibile delle risorse [4]. Al fine di limitare tali effetti, la crescita economica si sta orientando verso un modello più sostenibile, definito circolare. Questo modello si basa sul riutilizzo, rigenerazione, ricondizionamento e riciclo di materiali e prodotti, in modo tale da estendere il loro ciclo di vita e ridurre la produzione di rifiuti al minimo, esso inoltre mira ad una transizione verso le fonti rinnovabili a discapito delle fonti fossili, destinate ad esaurirsi [4].

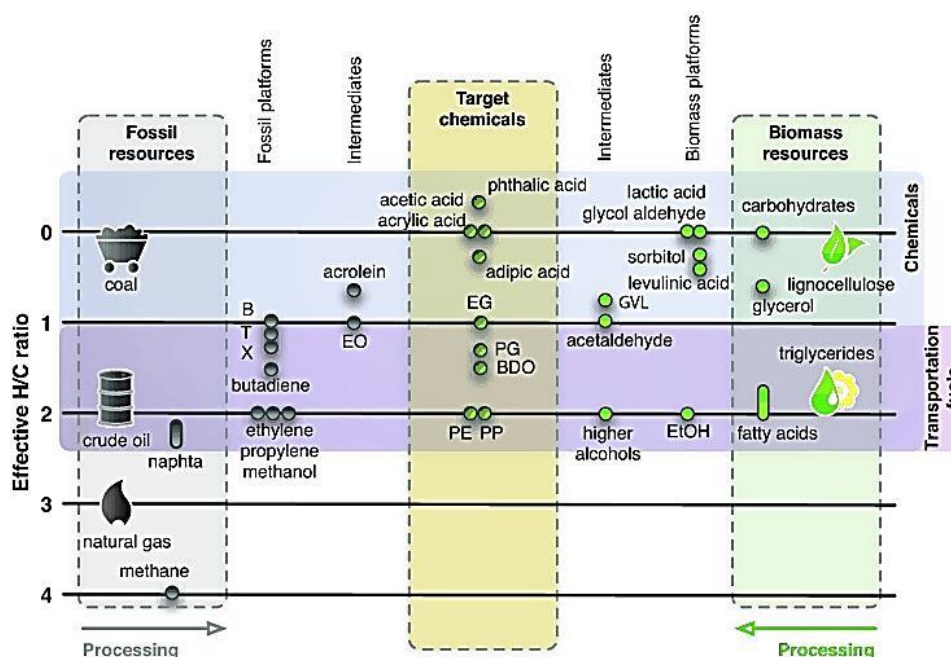
Il petrolio continua ad assumere un ruolo fondamentale all'interno dell'attuale società, infatti, circa l'85% di esso viene impiegato per la produzione di carburanti, mentre il 10% viene utilizzato per la produzione di prodotti chimici industriali [6]. Negli ultimi anni, al fine di limitarne l'utilizzo, sono stati sviluppati nuovi processi per la produzione di combustibile e sostanze chimiche, aventi come materia prima la biomassa. È stato osservato che, nel campo dei carburanti, l'utilizzo della biomassa non è competitivo poiché presenta un'energia chimica disponibile due volte inferiore rispetto al petrolio, a causa della presenza di ossigeno nella molecola. Dal punto di vista degli intermedi chimici o platform chemicals, invece, le funzionalizzazioni presenti in queste molecole

rappresentano un vantaggio. Infatti, sostanze chimiche ricche di ossigeno come l'acido acetico o l'acido acrilico, possono essere sintetizzate più efficacemente dalla biomassa rispetto alle fonti fossili, che necessitano invece di reazioni di ossidazione, le quali comportano una perdita di prodotto e possibile formazione di sottoprodotti tossici [6] [7].

Quanto appena esplicitato si può ulteriormente approfondire considerando il rapporto H/C dei composti chimici, il quale misura il grado di ossidazione di una molecola, definito dalla seguente reazione:

$$H/C \text{ ratio} = \frac{n(H) - 2n(O)}{nC}$$

Tanto più è alto questo valore, tanto più la molecola è ridotta, ricca in idrogeno, tanto più è basso tanto più la molecola risulta ossidata. La *Figura 1* mette in relazione le fonti fossili, la biomassa più comune e diversi platform chemicals, intermedi e target. Orizzontalmente sono disposte in base al loro grado di lavorazione. In verticale, le sostanze sono disposte secondo il loro rapporto H/C. Lo spostamento orizzontale è determinato da reazioni chimiche quali reazioni di condensazione o frammentazione, isomerizzazione e idratazione, mentre le reazioni redox implicano uno spostamento verticale [7].



*Figura 1: Mappa del rapporto H/C delle sostanze chimiche e delle materie prime [7].*

I carburanti, raggruppati nel riquadro viola, hanno un rapporto H/C compreso tra 1 e 2, simile al petrolio, tale rapporto implica infatti un'elevata densità di energia. I prodotti chimici di base, raggruppati nel riquadro blu, invece, hanno un rapporto H/C molto ampio, paragonabile a quello della biomassa. Un'elevata differenza nel rapporto H/C tra una risorsa e una sostanza target implica un lungo processo per la sua conversione e soprattutto processi redox. Gli zuccheri, ad esempio,



hanno un rapporto H/C simile a molti prodotti chimici funzionalizzati e dovrebbero quindi essere una materia prima ideale rispetto alle risorse fossili, eliminando le reazioni redox che comportano perdita di prodotto ed inquinamento [7]. Per questo motivo uno dei processi maggiormente applicati per la sintesi di sostanze chimiche da biomasse è la fermentazione poiché evita l'esaurimento delle risorse fossili e diminuisce l'inquinamento ambientale, utilizzando biomassa di scarto come rifiuti industriali, rifiuti urbani o fanghi derivanti da processi di trattamento [8].

### **1.3. BIOPLASTICHE**

Il basso costo, la durata e l'elevato rapporto di resistenza al peso hanno contribuito alla crescita della plastica e al suo utilizzo nella vita quotidiana. Tuttavia, tali prodotti, come il polistirolo (PS), polietilene (PE), polipropilene (PP) e il cloruro di polivinile (PVC), non sono biodegradabili ma estremamente persistenti e il loro utilizzo, principalmente monouso, soprattutto come imballaggi alimentari, ne determina il loro accumulo nell'ecosistema. Questo ha portato, in Europa, ad una produzione di rifiuti plastici post-consumo pari a 25,8 milioni di tonnellate di cui solo il 30% è destinato al riciclo, mentre il restante è destinato in discarica o all'incenerimento [5], [9]. Ridurre il consumo della plastica e dei suoi prodotti è quasi impossibile ma è possibile sostituire tali materiali a base di petrolio con materiali alternativi e rinnovabili con proprietà plastiche [10]. Questi rappresentano dei vantaggi quali la diminuzione dell'emissione di CO<sub>2</sub> in atmosfera e la diminuzione dell'uso delle risorse fossili, contribuendo a uno sviluppo di tipo sostenibile ed inoltre le plastiche biodegradabili offrono nuove opzioni di gestione a fine vita, come la digestione anaerobica o il compostaggio, che hanno un impatto negativo minore sull'ambiente. Tale promettente strategia presenta ancora delle limitazioni d'utilizzo, soprattutto a causa dell'elevato costo di produzione [5] [11]. Secondo quanto riportato sul sito dell'European Bioplastics, con il termine bioplastiche (Bioplastics) si fa riferimento a un tipo di plastica che deriva o da biomasse (bio-based, ovvero a base biologica), come mais, canna da zucchero o cellulosa, oppure è biodegradabile o, ancora, che possiede entrambe le caratteristiche. Una plastica derivante da biomassa non ne implica, quindi, la biodegradabilità poiché questa dipende da diversi fattori quali le condizioni ambientali circostanti, come la temperatura, l'applicazione e il materiale, in particolare dalla sua struttura chimica [12]. Allo stesso modo esistono diverse plastiche derivanti da fonti fossile che possono biodegradarsi, come riportato nella *Tabella 1*.

*Tabella 1: Classificazione dei tipi di plastica [5].*

<b>Materie plastiche a base biologica</b>	<b>Materie plastiche a base di fonti fossili</b>
---	--

<i><b>Plastica biodegradabile</b></i>	Acido polilattico (PLA)	
	Poliidrossialcanoato (PHA)	Policaprolattone (PCL)
	Cellulosa	Polibutilene succinato (PBS)
	Amido	Polibutilene Adipato (PBA)
	Bio-polibutilene succinato (Bio-PBS)	
<i><b>Plastica non biodegradabile</b></i>	Bio-polietilene tereftalato (Bio-PET)	Polietilene tereftalato (PET)
	Bio-polietilene (Bio-PE)	Polietilene (PE)
	Poliol-poliuretano (P)	Polistirene (PS)
		Polipropilene (PP)

Tra le bioplastiche completamente biodegradabili e bio-based si hanno il PLA ed il PHA, tra le bioplastiche biodegradabili ma provenienti da fonti fossili sono annoverati il PBAT (polibutilene adipato-co-tereftalato) ed il PCL, infine tra le bioplastiche completamente bio-based ma non biodegradabili (i cosiddetti drop-in), si hanno bio-PET, bio-PE e bio-PP, con caratteristiche simili ai loro corrispondenti petrolchimici.

Le miscele di amido sono le materie plastiche biodegradabili maggiormente prodotte poiché l'amido è un biopolimero abbondantemente disponibile, rinnovabile ed economico. Tuttavia, la sua applicazione è limitata, poiché la sua lavorabilità come polimero termoplastico è fortemente influenzata dall'idrofilia, dalle forze intermolecolari e dai legami idrogeno presenti. Per ovviare a questo, l'amido viene miscelato a poliesteri ed a plastificanti come glicerolo, urea, sorbitolo o glicerina, per facilitare il miglioramento della plasticità e delle caratteristiche termoplastiche. L'acido polilattico (PLA) e i poliidrossialcanoati (PHA), invece, sono le materie plastiche biodegradabili a base biologica maggiormente utilizzate. In particolare il PLA è formato da monomeri dell'acido L e/o D-lattico, prodotti tramite fermentazione microbica e ulteriormente polimerizzati chimicamente. Le proprietà finali, come il grado di cristallinità e la temperatura di fusione, dipendono dal contenuto di enantiomeri dell'acido lattico all'interno delle catene del PLA. I PHA sono polimeri costituiti da acidi (R)-3-idrossialcanoici sintetizzati da molti batteri attraverso processi di fermentazione microbica come riserva energetica, sono biocompatibili, non tossici, altamente cristallini, non solubili in acqua, e presentano proprietà termoplastiche simili alle materie plastiche petrolchimiche. Il poli-3-idrossibutirrato (PHB) ad esempio è il polimero PHA più ampiamente studiato e presenta caratteristiche altamente cristalline simili a quelle del polipropilene [5].

## **1.4. POLIDROSSIALCANOATI**

I poliidrossialcanoati (PHA) sono una classe di poliesteri biosintetici, bio-based e biodegradabili. I PHA si accumulano all'interno delle cellule batteriche formando dei granuli di dimensione tra 0.2 – 0.7 µm e vengono sfruttati dalla cellula come riserva di carbonio. Sono più di 90 i generi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi capaci di sintetizzare il polimero, come *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium* e la massa molecolare dei polimeri sintetizzati varia da  $5 \cdot 10^4$  a  $1 \cdot 10^6$  Da [11], [13].

La maggior parte dei processi industriali per la produzione di PHA si basa su colture pure di un singolo ceppo selezionato (es. *Cupriavidus Necator*) che, a sua volta, richiedono substrati specifici (es. glucosio) e un elevato costo energetico, ad esempio per il mantenimento di condizioni sterili [14]. Per tale motivo, la ricerca mira ad un'alternativa più sostenibile ed economica per la produzione di PHA basata sull'uso di colture microbiche miste (MMC), che consente sia una minore richiesta di energia sia di utilizzare materie prime a basso costo come i rifiuti organici senza concorrenza con la catena alimentare, grazie alla capacità di adattamento dovuta alla diversità microbica delle colture [15], [16].

Esistono più di 100 diverse unità monomeriche (idrossialcanoati, HAs) che costituiscono i PHA, con la possibilità di avere diverse tipologie di polimeri biodegradabili, dai termoplastici, come il poliidrossibutirrato, a gomme, come il poliidrossiottanoato. Nella *Tabella 2* sono elencate le varie unità monomeriche con la relativa formula chimica generica del PHA. Sono tutte in configurazione D- sul centro stereogenico a causa della stereospecificità degli enzimi biosintetici [17].

**Tabella 2:** Struttura chimica dei principali poliidrossialcanoati prodotti in natura. ( $n$  =numero di  $CH_2$  nella catena lineare)[17].

$\left[ \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---O---C---}(\text{CH}_2)_n\text{---C---} \\   \qquad \qquad \qquad    \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array} \right]$		
<b>n=1</b>	R=H	<b>Poli(3-idrossipropionato)</b>
	R=CH3	<b>Poli(3-idrossibutirrato)</b>
	R=C2H5	<b>Poli(3-idrossivalerato)</b>
	R=C3H7	<b>Poli(3-idrossiesanoato)</b>
	R=C5H11	<b>Poli(3-idrossiottanolato)</b>
	R=C9H19	<b>Poli(3-idrossidacanoato)</b>
<b>n=2</b>	R=H	<b>Poli(4-idrossibutirrato)</b>

	R=CH <sub>3</sub>	<b>Poli(4-idrossivalerato)</b>
<b>n=3</b>	R=H	<b>Poli(5-idrossibutirrato)</b>
	R=CH <sub>3</sub>	<b>Poli(5-idrossiesanotato)</b>
<b>n=4</b>	R=C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	<b>Poli(6-idrossidodecanoato)</b>

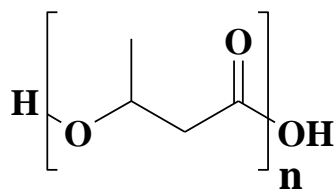
In generale i PHA vengono divisi in due gruppi in base al numero di atomi di carbonio delle catene monomeriche: short-chain-long (SCL) PHA, che hanno catene laterali (o monomeri) di 3-5 atomi di carbonio, prodotti dal genere *Ralstonia*, e medium-chain-long (MCL) PHA, che consistono in 6-14 atomi di carbonio, prodotti dal genere *Pseudomonas* [11].

I PHA possono essere sintetizzati come omopolimeri (monomeri uguali) o copolimeri (monomeri diversi), secondo i ceppi batterici impiegati o substrati di crescita. L'omopolimero più studiato e più comunemente prodotto dai batteri è il poli-idrossibutirrato (PHB). Ci sono stati solo pochissimi studi relativi ad altri omopolimeri non-PHB [18], mentre gli studi sui copolimeri sono in continua evoluzione poiché si è riscontrato che la copresenza di due differenti monomeri migliora notevolmente le proprietà del polimero, soprattutto da un punto di vista delle proprietà meccaniche e quindi di applicabilità commerciale ed uso finale del materiale.

Una proprietà fondamentale che distingue tali polimeri da quelli a base di petrolio è la biodegradabilità in vari ambienti come il suolo, l'acqua di mare e lacustre. [19]. Nonostante ciò, gli elevati costi ne hanno finora ostacolato l'utilizzo su grande scala. Il prezzo dipende sia dal costo del substrato di partenza sfruttato dai batteri sia dalla resa di conversione in PHA, nonché dalle metodiche di isolamento. Attualmente il PHA sintetizzato da *A. eutrophus* ha un costo di 16 USD per Kg, 18 volte più costoso del polipropilene [13]. A tale proposito, esistono diversi studi che riguardano la valorizzazione dei rifiuti come fonte non alimentare allo scopo di ottenere biopolimeri PHA con una migliore sostenibilità, invece di utilizzare glucosio e saccarosio [20].

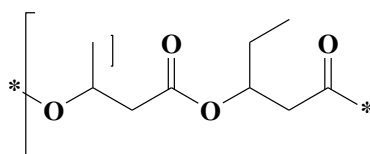
## 1.5. POLIIDROSSIBUTIRRATO

Il poli-3-idrossibutirrato (PHB), *Figura 2*, è un poliesteri lineare di acido D-3-idrossibutirrico, scoperto per la prima volta nei batteri da Lemoigne nel 1925 ed è il membro più diffuso e meglio caratterizzato della famiglia dei poli-idrossialcanoati [20].



**Figura 2:** *Struttura chimica del poliidrossibutirrato.*

Il PHB può essere prodotto sia da coltura pura sia da coltura mista (MMC), proveniente ad esempio dal trattamento delle acque reflue, in risposta a condizioni di stress fisiologico e utilizzato come fonte di carbonio [20]. Il suo peso molecolare, generalmente, è compreso tra  $1,0 \times 10^4$  e  $3,0 \times 10^6$  con una polidispersità, ovvero il grado di eterogeneità delle lunghezze della catena del polimero, di circa 2,0. È un polimero termoplastico altamente cristallino, con proprietà fisiche paragonabili ad alcune plastiche petrolchimiche come polipropilene, polietilene o polivinilcloruro. Come già evidenziato, finora non è stato in grado di sostituire la plastica convenzionale su larga scala, principalmente a causa del suo costo elevato, anche rispetto ai polimeri di amido e di altri poliesteri a base biologica a causa dei piccoli volumi di produzione e degli elevati costi delle materie prime e della lavorazione, in particolare per la purificazione [21] [22]. Non solo, rispetto al polipropilene ha una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa. Inoltre, la temperatura di fusione è molto vicina a quella di degradazione, il che rende problematica la lavorazione con le tecniche convenzionali in uso per i polimeri termoplastici. Il problema della degradazione termica lo si può risolvere ricorrendo all'uso di plastificanti che abbassano la temperatura di lavorazione, oppure favorendo la produzione di copolimeri, in particolari condizioni di alimentazione dei batteri. Ad esempio, l'inserimento di unità di 3-idrossivalerato (HV) nel PHB produce un copolimero, il poli (3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato), P(HB-co-HV), *Figura 3*.

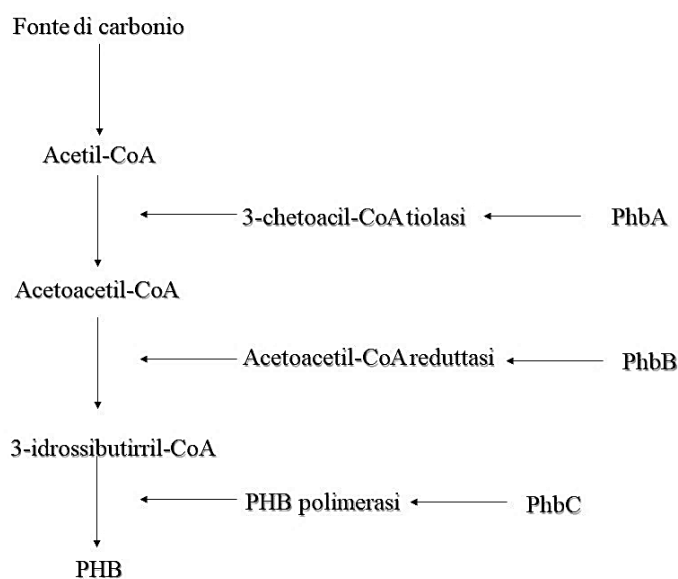


**Figura 3:** *Formula di struttura del PHBV*

In particolare, il copolimero con il 20% di idrossivalerato (PHB/PHV) possiede un insieme di proprietà che complessivamente consentono ancora di affiancarlo al polipropilene e nel contempo riducono il problema della fragilità e della lavorabilità, nonostante ciò, ha finora trovato prevalentemente applicazioni di nicchia, a causa del suo alto prezzo [17].

### 1.5.1. Biosintesi

Nella maggior parte degli organismi finora studiati, la PHB sintasi è essenziale per la sintesi del PHB. La biosintesi, *Figura 4*, consiste in tre reazioni enzimatiche catalizzate da tre diversi enzimi [23]. La prima reazione consiste nella condensazione di due molecole di coenzima acetil-CoA in acetoacetil-CoA dalla  $\beta$ -chetoacilCoA tiolase (codificata da *phbA*). La seconda reazione è la riduzione di acetoacetil-CoA a 3-idrossibutirril-CoA da parte di un'acetoacetil-CoA riduttasi dipendente da NADPH (codificata da *phbB*). Quest'ultimo composto viene quindi utilizzato come monomero per polimerizzare il PHB dalla PHB polimerasi, codificati dal *phbC* [13]. La stereoselettività della PHB sintasi fa sì che soltanto gli isomeri (R) vengano riconosciuti come substrato per la polimerizzazione e questo consente un alto livello di degradabilità [24].



**Figura 4:** Sintesi PHB.

È possibile utilizzare diversi processi di fermentazione per ottenere il PHB. Questi includono: processi discontinui (batch), processi continui e processi semicontinui (fed-batch).

La coltura in batch, definito come “sistema chiuso”, si basa sull’inserimento del substrato e dei batteri al tempo zero e non vengono rimossi fino al termine della fermentazione; La fermentazione in continuo, definita “sistema aperto”, viene condotta a temperatura costante e il substrato è perennemente alimentato poiché quello esaurito viene eliminato; Il sistema fed-batch è invece un sistema semi-aperto dove avviene la continua aggiunta del substrato alla coltura quando la sua concentrazione scende al di sotto di un valore impostato [25].

In corrispondenza di una coltura fed-batch viene generalmente utilizzato l’approccio feast-famine (ovvero abbondanza-carestia) come modalità di alimentazione dei reattori, in cui i microrganismi vengono coltivati in un ambiente selettivo che alterna la presenza e l’assenza di substrato esterno. Tale metodo si basa sull’adattamento dei microrganismi a crescere e sopravvivere in mancanza ciclica di un substrato organico disponibile e a competere nelle brevi occasioni in cui viene reso

disponibile, dove i batteri che possono assimilare la fonte di carbonio più rapidamente hanno un vantaggio competitivo rispetto a tutte le altre specie presenti [26]. Il rapporto tra la durata della fase di feast e la fase famine è un parametro cruciale che influenza le prestazioni della fase di selezione; un basso rapporto garantisce la selezione nella coltura di microrganismi che sono maggiormente in grado di immagazzinare il PHB e il loro adattamento fisiologico verso la sintesi di PHB nella fase di abbondanza. In generale, se la fase di accumulo viene eseguita in condizioni di limitazione dei nutrienti, si raggiungerà un livello di saturazione del PHB. Al contrario, se la biomassa è continuamente esposta a nutrienti, aumenterà progressivamente la risposta di crescita, mentre la risposta allo stoccaggio diminuirà e, di conseguenza, il contenuto massimo di PHB, sarà inferiore alla capacità massima di stoccaggio dei microrganismi [27].

Infine, una volta raggiunto il contenuto massimo di PHB all'interno del reattore di accumulo, il processo biosintetico viene bloccato per mezzo di uno shock termico per poi procedere al recupero e purificazione del polimero per estrazione [17].

### **1.5.2. Recupero del PHB e PHA dalla biomassa**

Dopo la biosintesi e accumulo del polimero all'interno delle cellule batteriche, avviene la separazione della biomassa dal brodo di coltura attraverso centrifugazione o filtrazione e successivamente vengono applicate le tecniche di recupero del PHB. In particolare, le attuali strategie di recupero comprendono diverse fasi come il pretrattamento della biomassa microbica, estrazione dei polimeri e purificazione post-trattamento [28].

Tali tecniche solitamente vengono scelte in base ai seguenti fattori:

- Ceppo di produzione;
- Tipologia di PHA (catena corta o lunga) e quantità prodotta;
- Purezza desiderata, determinata in base all'uso finale del polimero;
- Tipologia di sostanze chimiche impiegate [29].

Per facilitare l'estrazione del polimero dalla biomassa e aumentarne la purezza, è necessario adottare una fase di pretrattamento delle cellule batteriche al fine di indebolire la struttura cellulare che protegge e circonda il PHB. Uno dei metodi maggiormente utilizzati è la liofilizzazione del campione che prevede l'eliminazione delle molecole d'acqua dalla biomassa tramite congelamento e successiva evaporazione sotto vuoto. La liofilizzazione presenta però delle limitazioni economiche e tecniche che ne precludono l'utilizzo a livello industriale [30]. Infatti, si sta pensando alla possibilità di estrarre il PHB dalla biomassa umida con diminuzione del consumo di energia, poiché viene bypassato il processo di anidificazione [28]. Oltre alla liofilizzazione, un altro metodo

fisico include l'utilizzo di elevate temperature e ultrasuoni. Il trattamento termico destruttura la parete cellulare facilitando la rimozione del PHB e inoltre rende inattiva la PHB depolimerasi; anche questo metodo presenta degli svantaggi poiché può causare la scissione delle catene del PHB con diminuzione del peso molecolare. Invece, l'ultrasonificazione, mediata da onde sonore, mira alla rottura cellulare con la conseguente fuoriuscita del materiale citosolitico nel mezzo acquoso [20],[21].

Oltre a pretrattamenti di tipo fisico sono stati impiegati anche metodi chimici come l'utilizzo di cloruro di sodio (NaCl) e ipoclorito di sodio (NaClO). In particolare, in un studio, si è visto che l'utilizzo di cloruro di sodio destabilizza la parete cellulare andando ad incidere sulle condizioni osmotiche portando le cellule alla disidratazione. Ciò ha portato a un aumento significativo della purezza e del recupero di PHB. D'altra parte anche l'utilizzo di NaCl migliora la purezza e il recupero ma genera un'elevata riduzione del peso molecolare del polimero [30].

In seguito al pretrattamento, il materiale cellulare viene sottoposto al recupero vero e proprio del polimero, caratterizzato da diverse tecniche più o meno vantaggiose dal punto di vista economico e ambientale. Infatti, tale fase è una delle cause che ha portato all'aumento del costo di produzione del PHB per cui è necessario sviluppare nuove tecniche di estrazione più vantaggiose economicamente potenziando ulteriormente le tecnologie, e incrementare il recupero sia da biomassa secca che umida attraverso sistemi di solvente non tossici al fine di aumentare la sostenibilità del processo [31].

#### **1.5.2.1. Metodo di digestione**

I metodi di digestione si basano sulla disgregazione di materiali cellulari non PHB (NPCM) che circondano i granuli di PHB. Tali metodi agiscono sui materiali cellulari rendendoli idrosolubili con il conseguente rilascio dei granuli [29]. Le tecniche di disgregazione si dividono in:

- **Chimiche.** La digestione chimica si basa sull'utilizzo di sostanze chimiche, come i tensioattivi, in grado di degradare il materiale citosolitico. Le sostanze maggiormente studiate sono il sodio dodecilsolfato (SDS), l'idrossido di sodio (NaOH) e l'ipoclorito di sodio (NaClO). Sono stati studiati anche altri trattamenti chimici con l'utilizzo dell'ammoniaca e i SAS. L'SDS è un tensioattivo estremamente utilizzato in quanto scinde le cellule senza degradare il polimero. Inoltre è necessaria una piccola concentrazione per un recupero di PHB da alte densità cellulari. Tuttavia la purezza del polimero non è elevata (<97%) ed è dispendioso al fine del trattamento delle acque reflue. L'NaOH agisce con una reazione di saponificazione con lo strato lipidico ed aumenta la permeabilità della membrana cellulare, ottenendo un'elevata percentuale di recupero e purificazione utilizzando sia



biomassa non pretrattata sia pretrattata. Tuttavia, con l'applicazione dei trattamenti con NaOH sulla biomassa pretrattata, si ottengono miglioramenti in termini di purezza e recupero. L'ipoclorito di sodio ha avuto risultati elevati con una percentuale di recupero e di purezza maggiori del 98% ma può portare alla riduzione del peso molecolare del PHB [30]. La digestione in ammoniaca ha raggiunto valori di purezza superiori al 92% ma i recuperi di PHB sono alquanto bassi (65-82%). Questo può essere dovuto alla rottura di legami esteri portando alla formazione di oligomeri e monomeri solubili che andrebbero persi nel surnatante con derivata perdita di PHB. L'efficienza della digestione di  $\text{NH}_3$  dipende in gran parte dalle condizioni di digestione [32]. I SAS rappresentano una classe di tensioattivi, più economici di quelli esistenti. In particolare, vengono definiti tensioattivi commutabili, proposto per la prima volta da Jessop et al.[33], che si basava sull'idea di cambiare in modo reversibile alcune proprietà di una sostanza quando viene applicato un "innesco", come la  $\text{CO}_2$ , per cui possono essere resi reversibilmente polari/apolari, volatili/non volatili, protici/aprotici e miscibili in acqua/immiscibili in acqua. Infatti, i SAS possono essere convertiti in modo reversibile, da forme neutre insolubili in acqua in composti anionici solubili in acqua attraverso uno spostamento del pH mediata da  $\text{CO}_2$ . Il recupero del PHB è molto elevato e i livelli di purezza sono comparabili con il polimero commerciale, applicando l'utilizzo di 200 wt% di tensioattivo. Inoltre ha un'eccellente riciclabilità, ottenibile aggiungendo  $\text{CO}_2$ , dando una resa di recupero del 98%. Ciononostante riduce significativamente il peso molecolare del PHB recuperato [28].

- **Enzimatiche.** La digestione enzimatica è una tecnica che impiega degli enzimi specifici come proteasi o lisozima, o un cocktail di enzimi in grado di degradare l'NPCM. Per aumentare l'efficacia, spesso, vengono impiegati altri trattamenti sia chimici che termici. Infatti, in alcuni studi, avviene l'aggiunta di sodio laurilsolfato (SDS) e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) per supportare la solubilizzazione con un recupero di PHB pari al 90%. È un metodo che presenta diversi vantaggi come il recupero dell'acqua e il basso fabbisogno energetico. Tuttavia il costo di produzione di tali enzimi è estremamente elevato e ne preclude l'utilizzo a livello industriale [20], [21].
- **Biologiche.** La digestione biologica si basa sull'utilizzo di organismi e agenti biologici per rilasciare i granuli di PHB. In particolare, i batteriofagi vengono inseriti all'interno della cellula che, una volta terminato il ciclo litico, fugge da questa distruggendo la parete cellulare con conseguente rilascio dei granuli. L'interruzione biologica è un'alternativa ad altri metodi in quanto non richiede strumentazione costosa, solventi o sostanze chimiche forti e anche gli organismi che effettuano il recupero del PHB possono essere un prodotto

commerciabile. Tuttavia, il processo richiede un elevato tempo di recupero, necessita di pretrattamento della biomassa e la percentuale di recupero è bassa [30].

### **1.5.2.2. Estrazione con solvente**

L'estrazione con solvente è il metodo più comunemente utilizzato per il recupero del PHB grazie alla bassa degradazione del biopolimero, alta efficienza ed eliminazione delle endotossine dal biopolimero recuperato. Tale metodo comprende due fasi: un pretrattamento in grado di scindere la parete cellulare e rendere disponibile i granuli di PHB solubili in un solvente adatto seguito dalla precipitazione di tali granuli con l'aiuto di un non-solvente, il quale ha una natura chimica compatibile con il solvente estrattivo, ma non con il polimero [34]. Ragion per cui è essenziale definire la solubilità del polimero in diversi solventi organici per prediligere quello più adatto, la quale cambia nel caso in cui viene utilizzata la biomassa umida [35]. Infatti, ogni solvente viene testato sia sullo slurry che sulla biomassa secca, questo perché, nonostante dal liofilizzo si ha una maggiore resa di estrazione, non è possibile però utilizzarlo in campo industriale a causa dell'elevato consumo di energia che comporterebbe. Quindi si predilige l'utilizzo della biomassa umida, in conforme con un processo più sostenibile, anche se la presenza di acqua potrebbe limitare l'efficacia del solvente.

#### **1.5.2.2.1. Solventi alogenati**

I solventi alogenati più comunemente utilizzati sono il cloroformio, diclorometano, 1,2-dicloroetano e cloruro di metile dai quali è possibile ottenere un recupero elevato del PHB ad una elevata purezza, poiché sono in grado di dissolvere la parte lipidica di NPCM. Successivamente all'estrazione, il polimero precipita utilizzando un anti-solvente, tipicamente alcoli a basso peso molecolare come etanolo, metano, esano e acetone. Il recupero può avvenire anche tramite evaporazione del solvente [29]. L'elevata tossicità di tali composti, soprattutto del cloroformio, ne definisce il principale svantaggio di tale metodo. Non solo, per il processo è necessario l'impiego di un'immensa quantità di solvente, fino a venti volte la massa della biomassa aumentando così il costo di estrazione e successivo recupero del solvente. Questo ne preclude l'applicazione del metodo su larga scala a causa problemi ambientali e sanitari ed il contrasto con i principi di sostenibilità [20] [36]. Pertanto, sono stati studiati solventi non alogenati meno tossici.

#### **1.5.2.2.2. Solventi non alogenati**

Per attenersi ai principi di sostenibilità ambientale, gli studiosi hanno incentrato la loro ricerca su processi di estrazione basati su solventi non alogenati, non tossici e facilmente riciclabili. I solventi e miscele di solventi maggiormente studiati sono:

- Miscela di acetone/etanolo/propilene carbonato (A / E / P, 1: 1: 1 v / v / v). Consiste in una miscela di tre solventi rinnovabili che, utilizzando biomassa secca, hanno raggiunto un recupero pari all'85% e purezza del 92% a 130 °C mentre, utilizzando biomassa umida, hanno raggiunto un recupero pari all'83% e purezza del 90% a 120 °C. Al fine della rottura della parete cellulare è stata utilizzata la sonicazione ma non richiede pretrattamenti termici. Come anti-solvente è stato utilizzato l'esano con un rapporto 1:2 con un aumento significativo della resa di recupero. Pur utilizzando elevate temperature, le proprietà del PHB sono rimaste invariate e confrontabili con il PHB estratto con cloroformio [31].
- Acetone. Un campione di batteri liofilizzati sono stati isolati con acetone sotto pressione (7 bar) e a 120°C. Tale sistema ha portato ad una resa di recupero del 96.8% e una purezza del 98.4% ed è paragonabile all'uso di solventi alogenati anche in termini di basso impatto sul peso molecolare. La separazione del polimero dall'acetone si ottiene semplicemente raffreddando la soluzione consentendo così un recupero quasi quantitativo del solvente che può essere riutilizzato [36].
- Dimetilcarbonato (DMC). Il dimetilcarbonato è un liquido incolore dall'odore caratteristico, con il vantaggio di essere biodegradabile, non irritante e non ha effetti mutageni per contatto o per inalazione. Il protocollo di estrazione richiede un rapporto biomassa/solvente del 2,5% (p/v) per 1h 90°C riportando una resa dell'87% e una purezza del 95% e il peso molecolare del polimero rimane inalterato. Risultati simili sono stati ottenuti su biomassa umida [28].
- Butilacetato. Il butilacetato è un composto a bassa tossicità e costi. Il metodo è stato attuato unicamente sulla biomassa umida con una resa massima del 96% e una purezza del 98% a 103°C per 30 minuti. Lo svantaggio è che si degrada velocemente per idrolisi ostacolando il riciclo [35].
- 1,2-propilene carbonato. È un composto che presenta una bassa tossicità, un alto punto di ebollizione e può essere utilizzato più volte senza purificazione. Ad una temperatura di 130 °C per 30 minuti, la resa è del 95% mentre la purezza è dell'84%. Le proprietà fisiche del PHB estratto sono simili a quelle estratte con il cloroformio, ma il peso molecolare è minore [21].
- Cicloesanone. Tale composto ha portato ad un recupero del solvente pari a 99% con una purezza del 99,5% a 120°C per soli 3 minuti ed inoltre le caratteristiche fisiche e il peso

molecolare il polimero sono simili a quello estratto con il cloroformio. Nonostante tali risultati il cicloesanoone è classificato con sostanza nociva e infiammabile ma non cancerogeno [37].

- Anisolo. E' un composto non tossico ma altamente infiammabile. A 130°C per 50 minuti presenta una resa del 96.7 % e una purezza del 98.3 %. Il peso molecolare è addirittura superiore a quello estratto con cloroformio [38].

### 1.5.2.3. Estrazione acquosa a due fasi

L'estrazione acquosa a due fasi (ATPE) si basa sull'utilizzo dell'acqua per isolare, purificare e recuperare i PHB. Infatti, è composta da due fasi, l'acqua e una fase non volatile, spesso costituita da polietilenglicole. I materiali che costituiscono tali fasi sono maggiormente sicuri e sostenibili per l'ambiente rispetto ai metodi di estrazione con solvente tradizionale [29]. In uno studio è stato effettuato un recupero di PHB utilizzando ATPE con il 12% (p/v) di polietilenglicole e il 9,7% (p/v) di fosfato di potassio miscelati con lisato cellulare precedentemente ottenuto mediante sonicazione o trattamento con ipoclorito della biomassa. Tale soluzione è stata lasciata riposare per 30 minuti per la separazione di fase condotta a temperatura ambiente di 28°C con pH leggermente alcalino. Tale condizione ha permesso la ripartizione nella fase acquosa dei detriti cellulari e nella fase organica (PEG) l'accumulo di PHB, con un recupero fino al 51% [39].

### 1.5.2.4. Estrazione con fluidi supercritici

L'estrazione con fluidi supercritici è un processo recente che rappresenta un'ottima alternativa ai sistemi classici come l'estrazione con solvente. Tali fluidi presentano delle proprietà fisico-chimiche particolari che sono in parte analoghe a quello di un liquido, come la densità, e in parte a quelle di un gas, come la viscosità. Il più utilizzato è la CO<sub>2</sub> poiché raggiunge le condizioni supercritiche a temperatura e pressioni moderate (31 °C e 73 atm) ed inoltre non è tossico né infiammabile ed è disponibile a basso costo. Le condizioni ottimali per il recupero di PHB da *Ralstonia eutropha* sono state definite a 100 minuti di tempo di esposizione, ad una pressione di 200 atm, una temperatura di 40°C e 0.2 mL di metanolo. Utilizzando queste condizioni, la resa massima di recupero del PHB è dell'89% [40].

### 1.5.2.5. Interruzione meccanica

La distruzione meccanica delle cellule è ampiamente utilizzata per il recupero delle proteine intracellulari. Sono stati utilizzati mulini a sfere, costituiti da camere di macinazione cilindriche,

distruzione con ultrasuoni, in cui una sonda viene posta all'interno della sospensione cellulare, e l'omogeneizzazione ad alta pressione [40].

### **1.5.3. Biodegradabilità**

Il PHB si distingue dai polimeri petrolchimici per la sua biodegradabilità sia in ambienti aerobici sia in quelli anaerobici, senza formare prodotti tossici. E' mediata da diverse classi di microrganismi che secernono enzimi, la PHB depolimerasi, in grado di scomporre il polimero per poi essere utilizzato come fonte di carbonio. La biodegradazione dipende da diversi fattori come la temperatura, l'umidità, il pH, il peso molecolare, l'attività microbica e la superficie esposta. In base a tali parametri si evince che il PHB è degradabile dopo l'esposizione al suolo, al compost e ai sedimenti marini poiché è compatibile con una vasta gamma di temperature e con livelli di umidità al 55 % [13], [20].

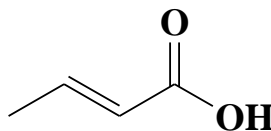
### **1.5.4. Riciclo del PHB**

La biodegradazione è una proprietà molto importante e utile al fine della gestione del PHB alla fine del suo ciclo di vita. Tuttavia, dal punto di vista dell'economia circolare, i prodotti di questo riciclaggio biologico vengono persi nell'ambiente, insieme all'energia utilizzata nella loro sintesi. Per cui si predilige, come alternativa, il riciclaggio chimico che previene la perdita di materiale ed energia utilizzata nella produzione e contribuisce alla riduzione delle emissioni di CO<sub>2</sub>. Non solo, tali processi hanno portato alla valorizzazione e alla trasformazione del PHB di scarto in prodotti e composti con valori aggiuntivi tali da poter essere utilizzati in diverse tipologie di applicazioni [41] [42]. La conversione può essere attuata non solo sul PHB a fine vita ma anche utilizzando un PHB che presenta fin dal principio delle proprietà non adatte alla lavorazione, per basso peso molecolare o scarsa resa [43].

I metodi di riciclaggio chimico differiscono in base alle condizioni di reazione utilizzate e si dividono in quattro diverse categorie di prodotti derivabili da tale tecnica: materia prima per la raffineria, carburante, monomeri e altri prodotti chimici [41].

#### **1.5.4.1. Termolisi**

La termolisi è uno dei processi maggiormente studiati e si basa sulla scissione di legami chimici mediata dal calore. In particolare, nel PHB, opera attraverso una scissione casuale per  $\beta$ -eliminazione. Il prodotto che si forma maggiormente è l'acido crotonico (CA), *Figura 5*.



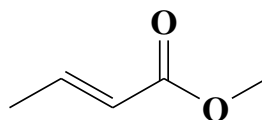
**Figura 5:** Struttura chimica dell'acido crotonico.

Dai vari studi è dimostrato che, senza l'aggiunta di un catalizzatore, si può ottenere una conversione del 63% di PHB in acido crotonico a 310°C. Con l'utilizzo di catalizzatori, invece, si raggiungono valori più elevati di conversione con minore somministrazione di calore. Infatti, con l'utilizzo di  $Mg(OH)_2$ , è stato convertito l'84% di PHB a 260-320 °C, mentre con l'utilizzo di catalizzatori acidi, come  $H_2SO_4$ , la conversione raggiunge il 90% con una temperatura compresa tra 100 e 170°C. L'acido crotonico viene utilizzato in campo farmaceutico ma viene anche convertito in altre sostanze chimiche come il propilene, acido acrilico e metil crotonato [42].

#### 1.5.4.2. Alcolisi

L'alcolisi è la depolimerizzazione del polimero mediata da alcoli ottenendo i corrispondenti esteri alchilici. Il metanolo è l'alcool più comunemente utilizzato, anche se diversi studi applicano anche etanolo e n-propanolo. Una delle tecniche più utilizzate si basano sulla sintesi del R-3-idrossibutirrato e del corrispondente metil estere, usati come fonte nutritiva e precursore di vitamine e antibiotici [41]. Un metodo sviluppato si basa su una metanolisi catalizzata da liquidi ionici derivati dal 1-butil-3-metilimidazolina (Bmim), in presenza dell'anione  $FeCl_4$  (5 mol%), in cui la conversione di PHB e la resa erano rispettivamente 99% e 97% a 140 °C per 3h [44]. Oltre ai liquidi ionici, sono stati studiati altri metodi utilizzando catalizzatori acidi; in particolare uno studio prevede l'estrazione del PHB tramite digestione chimica utilizzando 0.2 N di NaOH e successiva metanolisi utilizzando acido cloridrico come catalizzatore acido e dicloroetano come co-solvente con una resa di conversione del 93% [45].

Un'altra sostanza, ampiamente sintetizzata, è il metil crotonato (MC), metil estere dell'acido crotonico *Figura 6*.

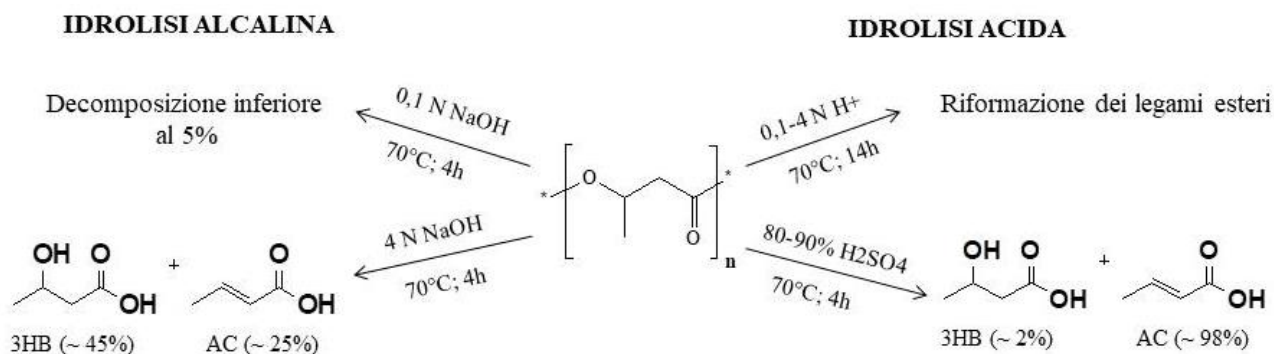


**Figura 6:** Struttura chimica del metil crotonato.

La produzione di MC si basa sulla transesterificazione del PHB in metanolo a 200°C a 18 bar per 6 ore. Nello specifico abbiamo due fasi, la prima che prevede una termolisi con formazione dell'acido crotonico, seguita da un'esterificazione, mediata dal metanolo, in metil crotonato. La reazione avviene in un unico passaggio e porta alla completa conversione del PHB [42].

### 1.5.4.3. Idrolisi

L'idrolisi del PHB è un processo che si basa sulla rottura casuale dei legami esterei con formazione dei corrispondenti monomeri e oligomeri, 3-idrossibutirrato (3HB) e acido crotonico. In particolare, il PHB, può essere idrolizzato sia in condizioni alcaline sia acide, *Figura 7*.



*Figura 7: Idrolisi del PHB in condizioni acide e basiche.*

In condizioni basiche, utilizzando idrossido di sodio (NaOH) a 70°C, si nota che il PHB è stato decomposto meno del 5% con NaOH pari a 0,1N, mentre a NaOH pari a 4N la decomposizione va oltre il 70%. Ciò avviene poiché l'idrossido di sodio è responsabile della diminuzione dell'energia di attivazione dei legami con conseguente rottura rapida dei legami esteri.

In condizioni acide, impiegando acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 70 °C, la conversione del PHB è minima utilizzando concentrazioni 4N di soluzione acida. A concentrazioni più elevate, pari al 98% di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, il 98% di PHB viene decomposto in acido crotonico e il 2% in 3HB [46].

### 1.5.4.4. Degradazione enzimatica

Il PHB può essere degradato da enzimi noti come la PHB-depolimerasi, secreta da enzimi a elevata specificità, o utilizzando enzimi come le lipasi o le proteasi. Tali sistemi sono generalmente considerati molto sostenibili poiché il funzionamento avviene in condizioni blande di pressioni e temperature e non produce sottoprodotti tossici [47].

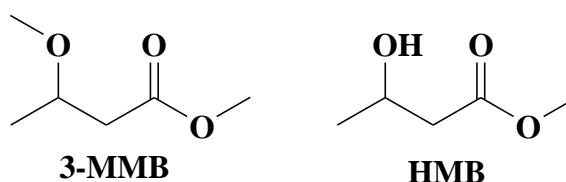
La PHB-depolimerasi degrada il PHB in oligomeri e monomeri che vengono riutilizzati dagli stessi microrganismi come fonte di carbonio ma, tali enzimi, non sono ancora disponibili in commercio. Le lipasi, invece, sono enzimi molto efficienti poiché sono idrosolubili in grado di reagire con substrati insolubili, quindi sono in grado di degradare il PHB insolubile in acqua ma solubile in diversi solventi organici. Tale enzima è stato applicato nella degradazione del copolimero P3HB-co-8.4%4HB a basso peso molecolare a 37°C, in tampone fosfato (pH pari a 7.4) ed ha portato alla diminuzione della massa molare a causa dell'idrolizzazione delle catene principali [48].

## 1.6. SCOPO DELLA TESI

I processi chimici, sia su scala di laboratorio che industriale, utilizzano i solventi come elementi chiave per la maggior parte delle trasformazioni e manipolazioni chimiche. I solventi sono utilizzati in gran quantità e quindi regolamentati, soprattutto quelli organici volatili i quali rappresentano una maggiore preoccupazione poiché sono infiammabili, possono agire come inquinanti atmosferici contribuendo allo smog fotochimico e possono essere, in alcuni casi, tossici e cancerogeni. La maggior parte dei solventi inoltre deriva da fonti non rinnovabili. Al fine di limitare l'utilizzo di sostanze pericolose per l'uomo e per l'ambiente, negli ultimi 10 anni la chimica sostenibile promuove la progettazione di solventi maggiormente ecocompatibili in termini di sintesi ed utilizzo[2] [49].

In linea con gli obiettivi della chimica sostenibile, lo scopo del seguente lavoro di tesi è di definire una strategia sostenibile di valorizzazione e contemporanea estrazione del poliidrossibutirrato attraverso la sintesi di nuovi solventi dalla degradazione del PHB di scarto che siano poi in grado di sostituire i solventi organici tradizionali nella fase di estrazione del polimero stesso. Il PHB di scarto viene inteso come prodotto giunto a fine del suo ciclo di vita, cioè che tale materiale non costituisce più un valore aggiunto, o come prodotto che presenta delle scarse proprietà di lavorazione.

Sono stati ottenuti e poi studiati due diversi solventi in grado di estrarre il PHB: il 3-metossimetilbutirrato (3-MMB) e l'idrossimetilbutirrato (HMB), *Figura 8*.



**Figura 8:** Struttura chimica del 3-Metossimetilbutirrato (3-MMB) e dell'idrossimetilbutirrato (HMB)

Entrambi vengono sintetizzati dallo stesso PHB di scarto, impiegando diverse condizioni di reazione. Dopodiché sono state studiate varie tecniche di estrazione utilizzando sia batteri liofilizzati derivanti da una coltura pura contenete dal 40 al 56% di PHB, sia da batteri di coltura mista. Nel caso della coltura mista è stata applicata l'estrazione sia su biomassa liofilizzata sia umida, contenenti dal 22 al 40% di PHB. Le capacità estrattive dei solventi e le loro possibilità di riutilizzo sono stati confrontati con i metodi standardizzati.

Infine il 3-MMB e l'HMB sono stati caratterizzati al fine di determinare la sostenibilità ambientale. In particolare sono state definite la percentuale di biodegradazione aerobica, la costante di ripartizione ottanolo/acqua e la solubilità in acqua.



## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Solventi e reagenti

Tutti i reagenti ed i solventi utilizzati nel presente lavoro di tesi, elencati nella *Tabella 3*, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich ed utilizzati senza ulteriori purificazioni.

*Tabella 3: Elenco solventi e reagenti utilizzati.*

Solventi e reagenti
1,4-diclorobenzene (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ), ≥ 99%;
2-nitrofenolo (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> ), 98%;
Acetone (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O) ≥99.5%;
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN) 99,8%;
Acido 2-etilbutirrico (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ) 99%;
Acido solforico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), 99,9%;
Acqua deuterata (D <sub>2</sub> O), 99,8%;
Alcol cinnamico (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O) 98%;
Amberlyst H15, resina scambio ionico;
Aniline (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> ), ≥ 99,5%
Atrazina (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O);
Batteri aerobici prelevati presso il depuratore Hera di Ravenna;
Batteri ceppi misti (MMC) prelevati presso l'impianto B-PLAS;
Batteri ceppi puri
Carbonato di potassio (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), ≥ 99%,
Carbonato di sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), ≥ 99,5,
Char-Mais-SO <sub>3</sub> H;
Cloruro d'ammonio (NH <sub>4</sub> Cl) ≥ 99,5%;
Cloruro di calcio idrato (CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O) ≥ 93%;
Cloruro di sodio (NaCl) 99,8 %;
Cloruro ferrico esaidrato (FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O) 97%;
DBU (C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ), 98%;
Diacetossidibutilstagno [(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Sn(OOCCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], ≥ 96%;
Diclorometano (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ), 99,8%;
Diidrogeno ortofosfato di potassio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ≥ 99%;

Dimetil carbonato (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ) 99%;
Fenantrene (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> ), 98%;
Fenolo (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH), ≥ 99,5%
Idrogeno ortofosfato di dipotassio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ≥ 98%;
Idrogeno ortofosfato di disodio biidrato (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O) ≥ 99%;
Idrossido di potassio (KOH), ≥ 85%;
Idrossido di sodio (NaOH), ≥ 98%;
Metanolo (CH <sub>3</sub> OH), ≥ 99,6%;
Metanolo per HPLC (CH <sub>3</sub> OH), ≥ 99,9%;
Metilcrotonato (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ), 98%;
Metossido di sodio (CH <sub>3</sub> ONa), 95%;
PHB in polvere, commerciale;
Sodio tert-butossido (tBuONa), 97%;
Solfato di magnesio eptaidrato (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O) ≥ 99,5%;
Standard solubilità
Tiourea (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S), ≥ 99%;
Toluene (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ), ≥ 99,5%;

## 2.2. Strumenti utilizzati

Gli strumenti utilizzati in questo lavoro di tesi sono:

- GC-MS con colonna cromatografica apolare. 6850 Agilent HP connessa a 5975 Agilent HP spettrometro di massa quadrupolo;
- GC-MS con colonna cromatografica polare. 7820 Agilent HP connessa a 5977E spettrometro di massa quadrupolo;
- LAR'S COD analyzer QuikCODlab;
- HPLC serie 1200;
- BOD sensor VELP SCIENTIFICA.

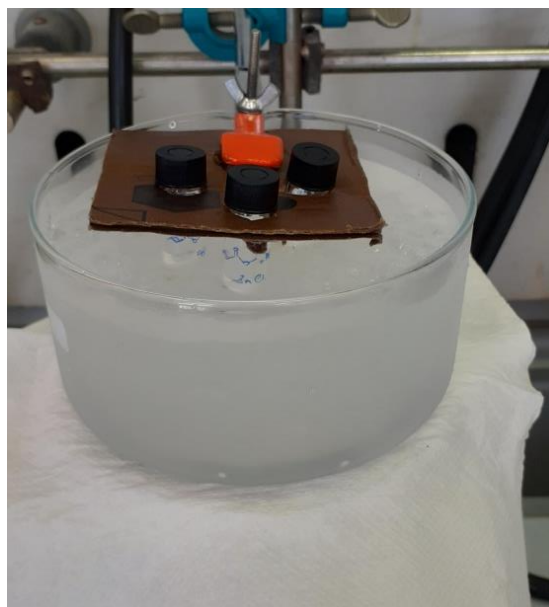
## 2.3. Sintesi del solvente

Sono state testate differenti strategie di sintesi del solvente 3-metossimetilbutirrato (3-MMB) come riportato nel capitolo risultato e discussioni.

La prima strategia si basa sulla distillazione termolitica del PHB a 170 °C per 45 minuti con formazione dell'acido crotonico che viene successivamente esterificato in metil crotonato facendolo

reagire a 130 °C con metanolo e Char-Mais-SO<sub>3</sub>H come catalizzatore, in diverse concentrazioni e tempi di contatto. La stessa procedura è stata applicata utilizzando come catalizzatore l'Amberlyst H15, una resina a scambio ionico.

Il metil crotonato è stato separato tramite distillazione dalla soluzione e fatto reagire con metanolo e un catalizzatore basico con formazione del 3-metossimetilbutirrato, attraverso una reazione di addizione Oxa-Michael. In particolare sono stati testati diversi catalizzatori, ma quelli che hanno fornito risultati migliori sono: il sodio ter-butossido (tBuONa), l'idrossido di sodio (NaOH), l'idrossido di potassio (KOH), il metossido di sodio (CH<sub>3</sub>ONa), il potassio carbonato (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e il sodio carbonato (NaCO<sub>3</sub>). Questi sono stati testati a diverse condizioni di concentrazione ed equivalenti di metanolo. Tutte le reazioni sono state condotte per 24 ore su una piastra in agitazione magnetica ad una temperatura iniziale di 0°C fino al raggiungimento della temperatura ambiente, *Figura 9*.



**Figura 9:** Processo di conversione del metilcrotonato in 3-MMB.

Il prodotto è stato poi separato dalla soluzione tramite distillazione sottovuoto a 60°C ed utilizzato come solvente di estrazione del PHB.

La seconda strategia, invece, si basa sulla transesterificazione del PHB mediata da metanolo ed un catalizzatore acido con formazione dell'idrossimetilbutirrato (HMB). Tale reazione è stata studiata a 140 °C sotto pressione e fatta andare per sei ore e trenta minuti. Sono stati testati due catalizzatori acidi: il diacetildibutilstagno  $[(CH_3CH_2CH_2CH_2)_2Sn(OOCCH_3)_2]$  e l'acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), in diverse condizioni di concentrazione e equivalenti di metanolo. L'HMB è stato separato dalla soluzione tramite distillazione sottovuoto a 80°. Lo stesso idrossimetilbutirrato è stato testato come solvente di estrazione del PHB.

## 2.4. Determinazione del contenuto di PHB nella biomassa batterica

Al fine di determinare il contenuto di PHB nella biomassa batterica di ceppi puri, questi sono stati sottoposti al processo di metapirolisi; questo metodo si basa sull'analisi al GC-MS dei prodotti di pirolisi utilizzati come marcatori molecolari per identificare il contenuto di PHB [50].

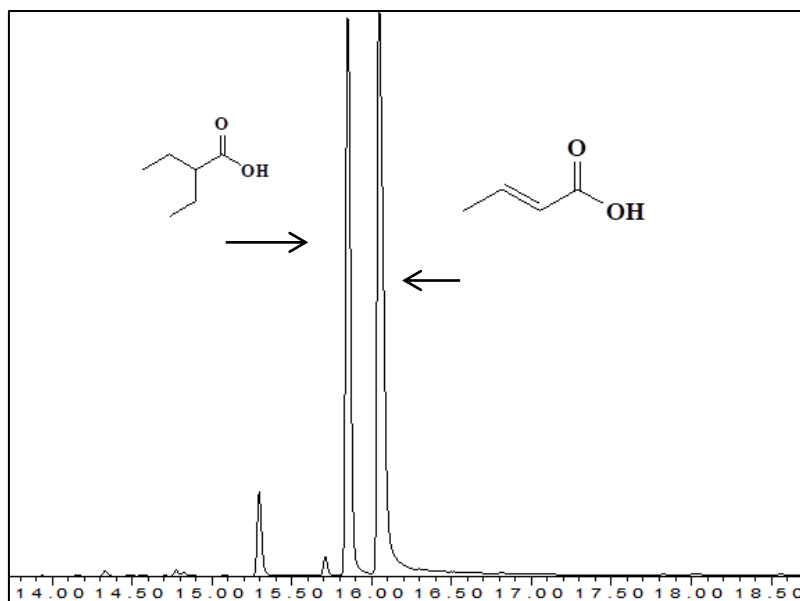
I prodotti di pirolisi cambiano in base al tipo di monomero presente. In tal caso ci aspettiamo di trovare dell'acido crotonico, il monomero costituente del PHB.

La biomassa batterica è arrivata in laboratorio congelata all'interno di otto differenti vial di plastica, e posti successivamente all'interno di un liofilizzatore per 2 ore. Una volta liofilizzati, i campioni vengono omogeneizzati con l'aiuto di una spatola. Circa 5 mg di biomassa batterica viene inserita all'interno di vial di vetro da 4 mL, chiusi con gli appositi tappi e posti al di sopra di una piastra preriscaldata a 350 °C per 20 minuti, *Figura 10: Vial sottoposti alla metapirolisi*. I tappi di ogni singolo vial sono stati coperti con della carta bagnata al fine di evitare perdite.



*Figura 10: Vial sottoposti alla metapirolisi.*

Terminati i 20 minuti i vial vengono tolti dalla piastra e raffreddati a temperatura ambiente. Successivamente sono stati inseriti in ogni vial 4 mL di acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  di standard interno, il 2-etilbutirrico ad una concentrazione di 5000 mg/L in acetonitrile. Prelevata 1 mL della soluzione, questa viene inserita all'interno di un micro-vial ed iniettata al GC-MS. Nella *Figura 11* è rappresentata la tipologia di cromatogramma che ci viene restituito dallo strumento. Il contenuto di PHB viene determinato in base alla percentuale di acido crotonico formatosi.



**Figura 11:** Cromatogramma della metapirolisi.

## 2.5. Estrazione del PHB

La procedura di estrazione è stata applicata sia su ceppi di batteri puri liofilizzati, sia su ceppi di batteri misti (MMC), umidi e liofilizzati. I ceppi di batteri puri sono arrivati in laboratorio già liofilizzati. Invece, i ceppi di batteri puri, campionati nell'impianto B-PLAS di Faenza, sono stati posti in centrifuga (5000 rpm per 5 minuti), posti in congelatore per 1 ora e poi sono stati liofilizzato per 2 ore.

*Batteri puri e misti liofilizzati.* 40 mg di batteri liofilizzati, contenenti diverse percentuali di PHB, sono stati estratti utilizzando 1 mL di solvente. I solventi testati sono stati: il 3-metossimetilbutirrato, l'idrossimetilbutirrato, il metilcrotonato e il diclorometano. Per il 3-MMB e l'HMB la reazione è stata realizzata a 130-140 °C per 5 minuti, mentre l'MC a 120 °C per 5 minuti e il DCM a 60 °C per 60 minuti, tutte sotto pressione. Terminati i 5 minuti la soluzione è stata posta in centrifuga a 4100 ppm per 30 secondi. Tale passaggio deve essere attuato con la massima velocità poiché l'abbassamento della temperatura può provocare la gelificazione del composto con difficoltà di estrazione del PHB. Viene prelevato il surnatante e posto all'interno di un pallone. Il polimero viene recuperato o tramite distillazione sotto vuoto o tramite essiccazione, sotto azoto, del solvente.

*Batteri misti tal quali.* 260 mg di biomassa umida, costituita dal 78% d'acqua, sono stati estratti utilizzando 1,2 mL di solvente, 3-MMB e HMB, a 130°C sotto pressione per 9 minuti. La soluzione è stata posta poi in centrifuga a 4100 ppm per 30 secondi. Prelevata la parte surnatante, viene posta all'interno di un pallone e il polimero viene recuperato tramite distillazione sotto vuoto del solvente.

## 2.6. Test di biodegradazione aerobica dei solventi

Per il test è stato seguito il protocollo OECD 301 F, che determina la completa biodegradabilità delle sostanze organiche in un mezzo acquoso determinando il consumo di ossigeno in un respirometro chiuso. Tramite questa procedura, vengono testati i solventi sintetizzati, 3-MMB e HMB e vengono inoltre realizzati dei bianchi da utilizzare come confronto.

Ogni campione è costituito da una bottiglia di vetro, *Figura 14*, contenente l'inoculo (fango attivo) ed una soluzione minerale. Per la preparazione dell'inoculo sono stati prelevati campioni di fanghi attivi presso il depuratore di Ravenna e lasciati decantare. Eliminata la parte surnatante con l'aiuto di una pipetta, sono stati prelevati 50 mL di batteri ed inseriti all'interno di un beaker e portati a un volume di 500 ml con una soluzione minerale. Tale soluzione stock è stata preparata in base alle indicazioni riportate nel protocollo OECD 301 F che consiste nella preparazione di quattro soluzioni [51]:

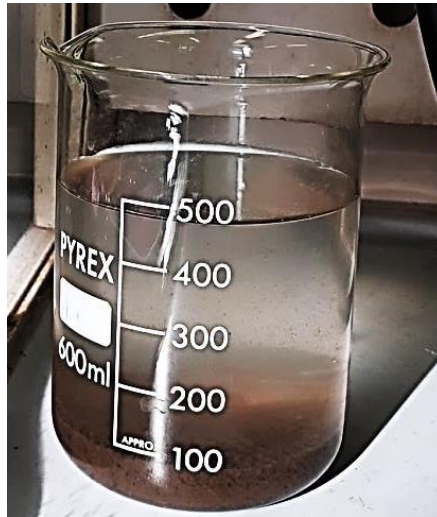
- Soluzione A: inserire in un beaker 2,125g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,4375g di  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,125g di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,75056 di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e portare a volume di 250 mL con acqua di rubinetto;
- Soluzione B: inserire in un beaker 0,91g di  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e portare a volume di 25 mL con acqua di rubinetto;
- Soluzione C: inserire in un beaker 0,562g di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e portare a volume di 25 mL con acqua di rubinetto;
- Soluzione D: inserire in un beaker 0,00625g di  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e portare a volume di 25 mL con acqua di rubinetto.

10 mL della soluzione A sono stati inseriti in 800 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  di rubinetto e di seguito sono stati aggiunti 1 mL di B, 1 mL di C e 1 mL di D. Infine il tutto è stato portato a 1L all'interno di un matraccio da 1L, *Figura 12*.



*Figura 12: Preparazione della soluzione stock.*

Il beaker contenente i batteri e la soluzione stock, *Figura 13*, sono stati lasciati riposare per 5 giorni con lo scopo di adattare a temperatura ambiente i batteri.



*Figura 13: Soluzione stock con batteri.*

Il test è svolto in un'apparecchiatura dedicata costituita da sei bottiglie di vetro scuro da 500 mL, un sottotappo per l'assorbimento dell'anidride carbonica ed un'ancoretta magnetica. A chiudere le bottiglie vi sono misuratori di pressione modello BOD della VELP SCIENTIFICA che misurano la diminuzione di ossigeno.,

In ogni bottiglia sono stati inseriti 2,5 mL di batteri lasciati riposare sotto cappa nella soluzione stock e portati a volume di 250 mL con tale soluzione. In quattro di esse sono stati inseriti anche tra i 50 mg/L e 100 mg/L di HMB o 3-MMB, mentre le restanti due bottiglie sono state utilizzate come bianco per il confronto. In ciascun sottotappo è stato inserito l'idrossido di potassio (KOH), utilizzato per la lettura della variazione di pressione, ma facendo attenzione a non superare i buchi presenti, altrimenti la KOH andrebbe nella soluzione con conseguente moria dei batteri.

Le bottiglie sono state posizionate al di sopra di un agitatore VELP SCIENTIFICA attivando, su ogni bottiglia, il relativo sensore di pressione, *Figura 14*. Il BOD è definito come la quantità di ossigeno consumata dai batteri per biodegradare un composto organico.



**Figura 14:** Test di biodegradazione.

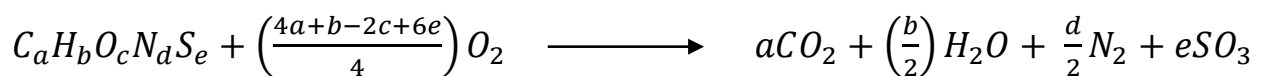
La scala utilizzata è pari a 250 mgO/L di BOD e i risultati vengono rilevati nel display ogni giorno. Il sensore si basa su un metodo respirometrico che fornisce una misurazione diretta dell'ossigeno consumato dai microrganismi tramite un cambiamento di pressione dovuto alla produzione di anidride carbonica che viene assorbita dalla KOH. Tale esperimento è stato condotto per 28 giorni in una camera termostata [51].

La percentuale di biodegradazione è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

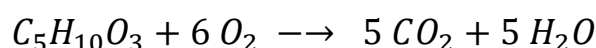
$$\% \text{ Biodegradazione} = \frac{BOD - BOD_{\text{bianco}}}{ThOD} \times 100$$

dove il BOD (mgO/L) è il valore misurato del solvente, il BOD<sub>bianco</sub> (mgO/L) è il valore misurato del bianco e il ThOD (mgO/L) è la domanda teorica d'ossigeno determinato in base ai mg/L di solvente inseriti all'interno di ogni singola bottiglia. Il BOD<sub>bianco</sub>, normalmente, è un valore che oscilla tra 20 e 30 mgO/L e non supera i 60 mgO/L [51].

Il ThOD [gO<sub>2</sub>/g substrato] esprime la richiesta stechiometrica di ossigeno necessaria per l'ossidazione dei composti organici, considerando che tutte le molecole di carbonio organico sono convertite in CO<sub>2</sub> e l'idrogeno in acqua e si determina utilizzando la seguente equazione stechiometrica:

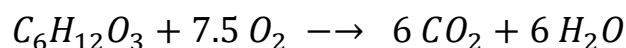


In particolare per l'HMB la reazione diventa:





mentre per il 3-MMB diventa:



## 2.7. Determinazione del log $K_{ow}$ dei solventi

La costante di ripartizione ottanolo/acqua indica la tendenza di un composto a ripartirsi tra una fase solida e una fase organica. Il metodo utilizzato viene riportato nel protocollo OECD 117, che si basa sull'utilizzo della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) a fase inversa, *Figura 15*. Una sostanza viene iniettata nell'HPLC, dove si divide tra la fase solvente mobile e la fase stazionaria idrocarburica e le sostanze vengono trattenute in base al loro coefficiente di ripartizione.



*Figura 15: HPLC*

Si definisce un fattore di capacità  $k$ :

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

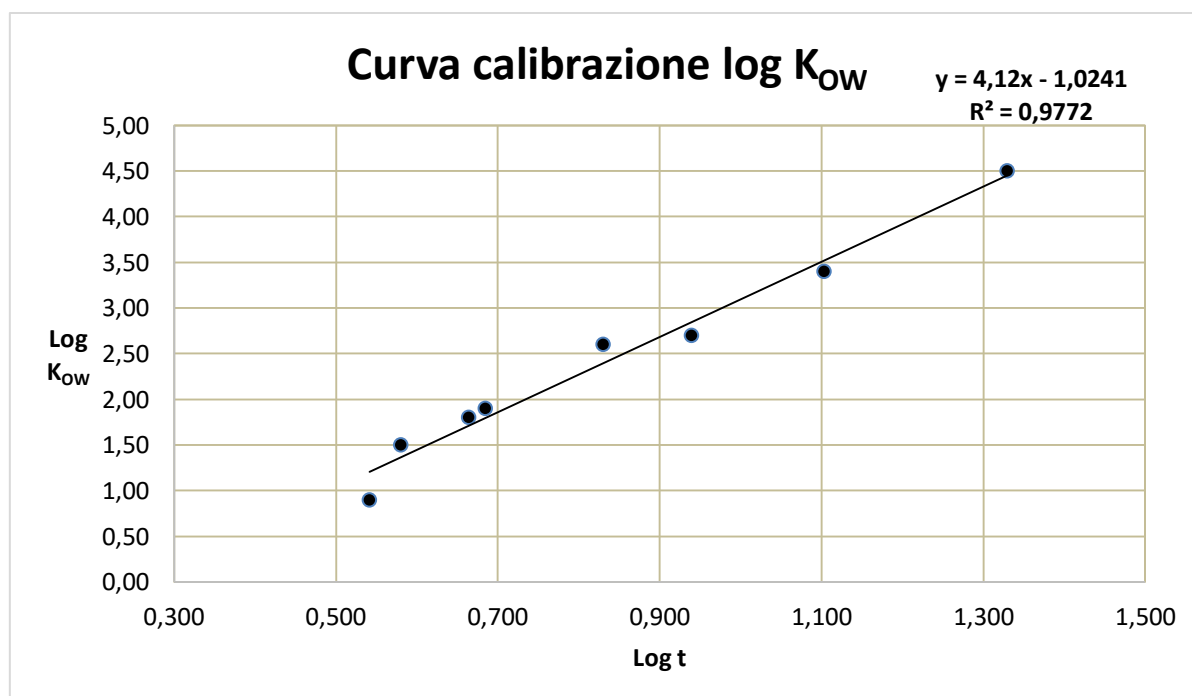
dove  $t_r$  è il tempo di ritenzione della sostanza in esame e  $t_0$  è il tempo morto, ovvero il tempo medio necessario a una molecola di solvente per passare la colonna, definito dal tempo di ritenzione di sostanze non trattenute come ad esempio la tiourea. Per la fase mobile dell'HPLC sono stati utilizzati metanolo e acqua in un rapporto 3:1 (v/v) e la rilevazione è stata eseguita con letture per

gli eluati a 254 nm [52]. Le misurazioni per ciascun composto sono state ripetute due volte, prendendo la media dei tempi di ritenzione.

Per la determinazione della retta di regressione (*Grafico 1*) abbiamo utilizzato sostanze di riferimento con  $\log K_{ow}$  nota, prossimi al valore atteso per le sostanze in esame. 1,2 mg di queste sostanze sono state inserite all'interno di un microvial e diluite in 1 mL di soluzione 60/40 di metanolo e acqua per poi iniettarli all'HPLC. Preso nota dei tempi di ritenzione delle varie sostanze, abbiamo definito il fattore di capacità e il rispettivo logaritmo, *Tabella 4*.

**Tabella 4:** Soluzioni di riferimento con il corrispettivo  $\log K_{ow}$ ,  $t$ ,  $\log k$  e  $\log t$ .

Standard	Log $K_{ow}$	t	k	log k	log t
Tiourea ( $t_0$ )	-1,08	2,625	0		
Aniline	0,90	3,479	0,32533333	-0,488	0,541
Fenolo	1,50	3,806	0,44990476	-0,347	0,580
2-nitrofenolo	1,80	4,612	0,75695238	-0,121	0,664
Alcol cinnamico	1,90	4,843	0,84495238	-0,073	0,685
Atrazina	2,60	6,761	1,57561905	0,197	0,830
Toluene	2,70	8,692	2,3112381	0,364	0,939
1,4-diclorobenzene	3,40	12,695	3,83619048	0,584	1,104
Fenantrene	4,50	21,349	7,13295238	0,853	1,329



**Grafico 1:** Curva di calibrazione  $\log K_{ow}$ .

Le sostanze in esame, HMB e 3-MMB, vengono iniettate con una concentrazione pari a 500 ppm e il coefficiente di ripartizione si ottiene tramite interpolazione del fattore di capacità calcolato sul grafico di calibrazione tramite l'equazione:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

## **2.8. Solubilità in acqua deuterata dei solventi**

E' stata definita la solubilità in acqua deuterata dei solventi al fine di determinare la loro capacità di estrazione del PHB utilizzando biomassa umida.

Il metodo utilizzato si basa sull'inserimento, in un vial, dello stesso volume di solvente e acqua deuterato (D<sub>2</sub>O) con formazione di due fasi distinte. Dopo averlo lasciato in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente, viene prelevata la fase di D<sub>2</sub>O, aggiunto al suo interno una quantità nota di standard ed analizzato all'NMR. Conoscendo le quantità di standard inseriti, attraverso l'integrazione dei segnali è possibile risalire alla quantità dei composti disciolti in D<sub>2</sub>O e quindi di solvente alla solubilità in acqua in g/L.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1. Sintesi del solvente

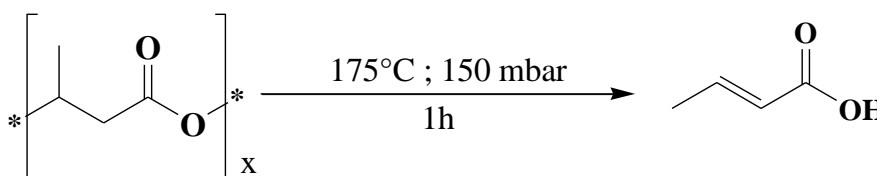
Il riciclo chimico del PHB, scopo di questo progetto di tesi, mira alla sintesi di nuovi composti chimici da utilizzare poi come solventi per estrarre il PHB dalle colture microbiche. Come specificato precedentemente, sono state studiate due vie di sintesi.

##### 3.1.1. Prima strategia di sintesi

La prima strategia di sintesi prevede tre differenti step:

1. Depolimerizzazione del PHB, ottenuta attraverso una distillazione termolitica, con formazione dell'acido crotonico;
2. Esterificazione in metanolo dell'acido crotonico in metil crotonato, con l'utilizzo di un catalizzatore eterogeneo;
3. Sintesi del 3-metossimetilbutirrato, attraverso una reazione di addizione Oxa-Michael del metil crotonato con metanolo e un catalizzatore basico.

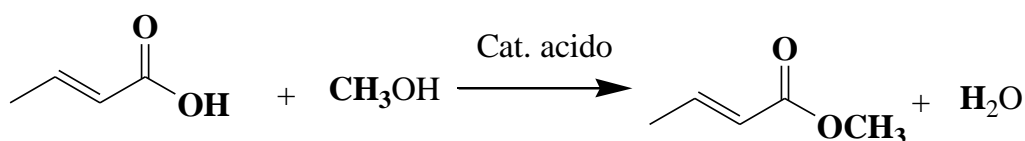
La depolimerizzazione del PHB viene mediata da una distillazione termolitica a 170°C per 45 minuti con una conversione del 94% in acido crotonico, *Figura 16*.



*Figura 16: Depolimerizzazione del PHB con formazione dell'acido crotonico.*

In particolare, è stato precedentemente dimostrato che la degradazione del PHB può avvenire alla stessa temperatura di distillazione dell'acido crotonico, principale prodotto di termolisi del poliestere. Quindi, per la sua sintesi si utilizza un semplice apparato di distillazione, in tal modo l'acido crotonico gradualmente formato si separa grazie al suo diverso punto di ebollizione da PHB e oligomeri. L'acido crotonico recuperato dopo distillazione se sufficientemente puro è, come atteso, un solido di colore bianco. Se ciò non avviene, probabilmente l'acido crotonico prodotto non sarà abbastanza puro, infatti nel liquido distillato non sarà presente solo l'acido crotonico ma anche degli isomeri, come l'acido isocrotonico o oligomeri (principalmente dimeri), i quali sono liquidi a temperatura ambiente. Se sono presenti dei dimeri la soluzione si colorerà anche di giallo. La purezza e la resa dell'acido crotonico sono state misurate tramite analisi gas-cromatografica.

Successivamente, l'acido crotonico distillato viene fatto reagire con metanolo ed un catalizzatore eterogeneo con formazione di metil crotonato in una reazione di esterificazione, *Figura 17*.



*Figura 17: Esterificazione dell'acido crotonico in metil crotonato.*

La reazione è stata condotta inizialmente senza l'ausilio di catalizzatori a 130 °C per 5 ore utilizzando 20 equivalenti di metanolo, ma la percentuale di resa è stata molto bassa, 20%. Al fine di ottenere una maggiore conversione sono stati impiegati dei catalizzatori eterogenei a diverse concentrazioni e condizioni di temperatura e tempo di reazione elencati nella *Tabella 5*. L'utilizzo di tali catalizzatori è un vantaggio poiché, essendo solidi, è facile recuperarli dalla miscela di reazione attraverso una filtrazione, evitando lavaggi acquosi o procedure di work-up più complesse. In particolare sono stati impiegati due differenti catalizzatori eterogenei: Char-Mais-SO<sub>3</sub>H, prodotto dalla funzionalizzazione con acido solforico di un char derivante da pirolisi dell'amido di mais, e l'Amberlyst H15, una resina a scambio ionico con gruppo solfonico fortemente acido [53].

*Tabella 5: Catalizzatori utilizzati per la reazione di esterificazione in diverse condizioni.*

Catalizzatore	w/w%	Equivalenti di MeOH	T (°C)	Tempo (h)	Conversione GC-MS (%)	Resa isolata(%)
-		20	130	5	20	/
Amberlyst H15	2,5 (w/w%)	10	130	5	98	/
Amberlyst H15	5 (w/w%)	5	130	5	97,5	/
Amberlyst H15	2,5 (w/w%)	5	130	5	94	/
Amberlyst H15	2,5 (w/w%)	5	130	7	<b>98</b>	90
Char-maisSO <sub>3</sub> H	2,5 (w/w%)	5	130	5	96	/
Char-mais-SO <sub>3</sub> H	2,5 (w/w%)	5	130	7	<b>&gt;99</b>	93

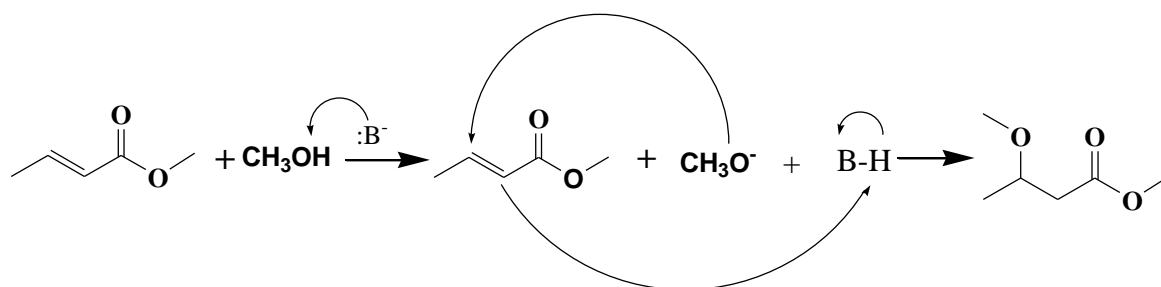
In assenza di catalizzatore, come atteso, la reazione non procede, negli altri casi si ottengono valori di conversione molto buoni. La massima percentuale di conversione utilizzando l'Amberlyst H15 a 2,5 w/w% è stata 98%, impiegando 5 equivalenti di metanolo a 130 °C per sette ore, mentre utilizzando il Char-Mais-SO<sub>3</sub>H a 2,5 w/w% è stata di 99,9%, impiegando le stesse condizioni. Si è riscontrato che, aumentando il tempo di contatto, la reazione giunge a completezza.

Uno dei prodotti della reazione di esterificazione è l'acqua, per cui bisogna necessariamente distillare il grezzo di reazione per isolare il metil crotonato, oppure anidrificare la soluzione. Questo

perché l'acqua risulterebbe dannosa nello step successivo. L'utilizzo di un catalizzatore eterogeneo è essenziale e vantaggioso in quanto basterebbe filtrare la soluzione per separarlo dalla miscela poiché l'acqua, durante il processo di distillazione con la presenza di un catalizzatore acido, reagirebbe nuovamente con il metil crotonato idrolizzandolo e abbassando drasticamente la resa.

Per cui, le reazioni con una maggiore percentuale di resa sono state prima filtrate e poi distillate e il metil crotonato è stato isolato con una percentuale di resa del 90 e del 93% rispettivamente utilizzando Amberlyst H15 e Char-Mais-SO<sub>3</sub>H.

Il metil crotonato isolato è stato fatto reagire con metanolo e un catalizzatore basico dando origine ad una reazione di addizione Oxa-Michael, addizione nucleofila 1,2, il cui meccanismo di reazione è rappresentato nella *Figura 18*.



*Figura 18: Meccanismo di reazione Oxa-Michael*

Sono stati condotti tre diversi screening di reazioni; nel primo screening, *Tabella 6*, sono state testate diverse basi e poste tutte alle stesse condizioni di temperatura e concentrazione per valutare quali abbiano la maggior resa di conversione al GC-MS in 3-MMB ed ottimizzarne le condizioni. In particolare, le reazioni sono state condotte ad una temperatura di 0°C fino al raggiungimento della temperatura ambiente, con 5 equivalenti di metanolo e 10 mol% di catalizzatore per 24 ore.

*Tabella 6: Selezione dei catalizzatori*

Catalizzatore	Conversione GC-MS (%)	pKa dell'acido coniugato [54]	Solubilità in metanolo (g/100 mL)
NaOH	89,5	15,74	23,8 [55]
KOH	68,1	15,74	43.5 [56]
tBuONa	95,9	19,2	3 g/100 mL in tert-butanol [57]
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82,4	9,1	3,11 [58]
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0	9,1	0,27 [59]
CH <sub>3</sub> ONa	95	15,1	15.82 [60]

L'elevata resa di conversione è dipesa da due fattori: la solubilità della base in metanolo e la sua basicità. L'tBuONa e CH<sub>3</sub>ONa sono le basi con la maggiore resa di conversione, 95,9% e 95% rispettivamente, perché hanno una basicità elevata, quindi tendono, rispetto alle altre basi, a strappare più efficientemente il protone del metanolo. Il Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ha una resa di conversione dello 0%, nonostante abbia la stessa basicità del K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, che ha una resa di conversione dell'82,4%. Un'ipotesi può essere la diversa solubilità delle basi in metanolo. In particolare, il sodio carbonato con una bassa solubilità pari a 2,13 g/100mL potrebbe non essere in grado di interagire con il metanolo, per cui la reazione non avviene.

Nel secondo screening, *Tabella 7*, invece, sono state prese in considerazione solo quelle basi che, nel primo screening, hanno avuto una conversione maggiore del 60%. Per cui sono state prese in considerazione NaOH, KOH, tBuONa, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>ONa. L'uso di tali basi è stato ottimizzato conducendo una reazione con 2,5 equivalenti di metanolo e 10 mol% di catalizzatore per 24 ore, nella stessa condizione di temperatura delle precedenti analisi e le reazioni con una elevata percentuale di conversione sono state ulteriormente ottimizzate diminuendo le mol% di catalizzatore utilizzato.

*Tabella 7: Ottimizzazione delle condizioni di reazione*

Catalizzatore	Mol%	Equivalenti di MeOH	Conversione GC-MS (%)
NaOH	10	2,5	48,3
KOH	10	2,5	42,5
tBuONa	10	2,5	97,6
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10	2,5	78,8
CH <sub>3</sub> ONa	10	2,5	97
tBuONa	3	2	95
CH <sub>3</sub> ONa	3	2	94
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3	2	19,6

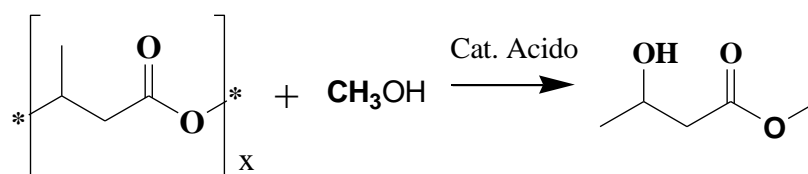
Le basi che hanno portato ad una maggiore conversione, impiegando 2,5 equivalenti di metanolo e 10 mol% di catalizzatore, sono state tBuONa con 97,6%, CH<sub>3</sub>ONa con 97% e il K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con 78,8%. Lasciando andare la reazione, contenente il potassio carbonato, per 48 ore questa raggiunge una resa di conversione pari al 92%, paragonabile al CH<sub>3</sub>ONa. L'idrossido di sodio e l'idrossido di potassio portano invece a simili conversioni, rispettivamente, a 48,3 % e 42,5 %, entrambi inferiori rispetto al potassio carbonato nonostante abbiano una solubilità in metanolo ed una basicità maggiore. Questo avviene perché, durante la reazione, la base, OH<sup>-</sup>, strappando il protone al metanolo, forma

acqua la quale, in presenza di una base, saponifica l'estere spegnendo il catalizzatore e bloccando l'intera reazione.

Il 3-MMB è stato poi distillato dando una resa finale del 92% (partendo dalla reazione contenente 3 mol% di  $\text{CH}_3\text{ONa}$  che ha dato la maggior resa di conversione pari al 94%).

### 3.1.2. Seconda strategia di sintesi

La seconda strategia prevede la sintesi dell'idrossimetilbutirrato (HMB) attraverso una reazione di transesterificazione del PHB mediata da metanolo e da un catalizzatore acido, *Figura 19*. In questo studio sono stati utilizzati come catalizzatori il diacetildibutilstagno e l'acido solforico.



**Figura 19:** Reazione di transesterificazione con sintesi dell'HMB.

I catalizzatori selezionati sono stati testati ad una temperatura di 140 °C, sotto pressione per 7 ore, variando la stechiometria, *Tabella 8*.

**Tabella 8:** Reazione di transesterificazione catalizzata da  $\text{Sn}(\text{diBu})(\text{diAc})$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a diverse condizioni di reazione.

PHB (g)	Catalizzatore	Moli% cata.	MeOH (eq)	T (°C)	Tempo (h)	Composizione della frazione solubile (%)	Resa (%)
0,3	$\text{Sn}(\text{diBu})(\text{diAc})$	1	20	140	7	89	87
0,3	$\text{H}_2\text{SO}_4$	1	20	140	7	91,6	/
0,6	$\text{H}_2\text{SO}_4$	1	10	140	7	90,3	/
0,3	$\text{H}_2\text{SO}_4$	0,25	20	140	7	69,3	/
0,4	$\text{H}_2\text{SO}_4$	0,5	15	140	7	92,1	95

Il diacetildibutilstagno ha un'attività catalitica elevata e viene utilizzata già in campo industriale per la sintesi dei poliuretani. La reazione di transesterificazione utilizzando 1 mol% di catalizzatore e 20 equivalenti di metanolo ha dato una conversione dell'89 % al GC-MS, il resto è rappresentato da dimeri. Per essere più economicamente competitivo, la reazione è stata testata utilizzando l'acido solforico, più facilmente reperibile e meno costoso. Alle stesse condizioni dello stagno ha dato una conversione in HMB pari al 91,6 %, per cui si è cercato di ottimizzare la reazione. Diminuendo la concentrazione di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2,5 moli%, però, la reazione si blocca dando una conversione pari al 69,3% di HMB e 30,7% di dimeri. La massima resa, 92,1% , è stata raggiunta facendo reagire 0,4 g



di PHB con 0,5 moli% di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 15 equivalenti di metanolo. Il grezzo di reazione è stato distillato in modo da isolare l'idrossimetilbutirrato, determinando una resa isolata finale pari a 94%.

### 3.2. Estrazione del PHB

Per il processo di estrazione sono stati testati tutti i solventi ottenuti, il 3-MMB, l'HMB e il metil crotonato, con lo scopo di valutare la loro resa di estrazione come solventi alternativi. Tale resa è stata confrontata con quella ottenuta da un solvente clorurato, il diclorometano (DCM). La percentuale di accumulo di PHB all'interno delle colture batteriche dipende da diversi fattori quali le fonti di carbonio utilizzati, il ceppo batterico e la strategia di accumulo. Quindi non tutte le colture batteriche accumulano la stessa percentuale di PHB per cui i solventi sono stati testati su biomassa batterica di ceppi puri e misti a diverse concentrazioni di PHB, *Tabella 9*. Questo per verificare se la percentuale di PHB iniziale presente, influisca sulla percentuale di recupero di estrazione dello stesso verificando quindi che il processo sia economicamente sostenibile nelle varie condizioni.

*Tabella 9: Solventi testati su differenti tipi di campione.*

Solventi	Tipi di campione
3-MMB HMB	Batteri puri liofilizzati, 56,7% di PHB Batteri misti liofilizzati, 22 e 39% di PHB Batteri misti umidi, 39,2% di PHB (dopo la liofilizzazione)
MC	Batteri puri liofilizzati, 56,7% di PHB
DCM	Batteri puri liofilizzati, 48% di PHB Batteri misti liofilizzati, 22 e 39% di PHB

Per ottenere la massima resa di estrazione e di recupero del solvente sono state ottimizzate le condizioni di estrazione, quali temperatura e la quantità di solvente utilizzata descritti nella *Tabella 10*. A questo scopo sono stati condotti degli screening, su ceppi di batteri puri, utilizzando i due solventi a temperature crescenti, per determinare la temperatura ottimale di solubilità del PHB in essi.

*Tabella 10: Ottimizzazione solubilità PHB in 3-MMB e HMB.*

Solvente	T (°C)	t (min)	Resa PHB (%)	Recupero solvente
----------	--------	---------	--------------	-------------------

3-MMB	rt	60	0	93
	70		0	99
	100		6	94
	115		44	73
	135		96	90
HMB	rt	60	0	96
	70		0	88
	100		0	89
	115		79	70
	135		90	75

Le temperature testate vanno dalla temperatura ambiente fino a 135°, vicino al punto di evaporazione dei solventi. Mentre il 3-MMB ha dato sempre esiti negativi a basse temperature, con una massima di resa del 44% ad una temperatura di 115°, l'HMB anche a 115° presenta una elevata resa di conversione pari al 79 %, ma non ottimale, che viene raggiunto a 135°C con una resa del 90%. In seguito all'esito dello screening si è deciso di eseguire le reazioni di estrazione a 130°/140°, al fine di ottenere la massima resa di estrazione del PHB.

Lo stesso metodo studiato per estrarre il PHB dai batteri puri liofilizzati è stato utilizzato anche per estrarre il PHB dai batteri misti liofilizzati, *Tabella 11*.

**Tabella 11:** Confronto tra le procedure di estrazione eseguite su batteri puri e misti liofilizzati.

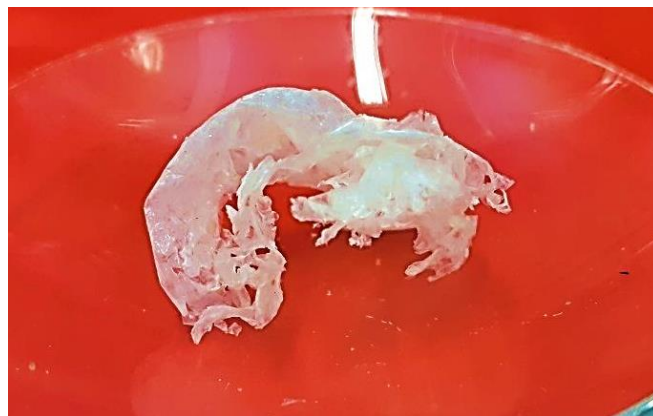
Tipo campione	PHB (wt%)	Solvente	T (°C)	t (min)	Resa PHB (%)	Recupero solvente
Batteri puri	56,7	3-MMB	130	5	98	92,5
	56,7	HMB	130	5	95	76,5
	56,7	MC	120	5	56	/
	48	DCM	60	5	94,5	/
Batteri misti	22	3-MMB	140	5	98,5	96
	39				97,5	92
	22	HMB	140	5	94	74,5
	39				96	88,5
	22	DCM	60	60	98	/
	39				97	/

Dai risultati ottenuti il 3-MMB è un solvente alternativo valido sia sull'estrazione da batteri puri, con una resa del 98%, sia su batteri misti, anche a basse percentuali di PHB presente nei batteri, dando una resa del 98,5%. Il PHB risultante è pulito, di colore bianco e ci viene restituito in forma di film leggermente frammentato, *Figura 20*.



**Figura 20:** Film PHB estratto con 3-MMB.

Allo stesso modo anche l'HMB presenta una elevata resa di estrazione pari al 95% per i batteri puri e 94% sui batteri misti contenete il 22% di PHB. Il PHB risultante è pulito, di colore bianco e ci viene restituito in forma di film compatto, *Figura 21*.



**Figura 21:** Film PHB estratto con HMB.

Si riscontra, invece, una differenza tra i due solventi nella percentuale di recupero del solvente stesso. Il 3-MMB viene recuperato tramite distillazione a 60°C con una pompa sotto vuoto a 13 mBar, mentre l'HMB a 105°C a 13 mBar. Mentre il 3-MMB presenta, in entrambi i casi, un'elevata percentuale di recupero pari al 96% e 92%, l'HMB presenta delle difficoltà di recupero con percentuali che vanno dal 74 all'88%.

Come solvente d'estrazione è stato testato anche il metilcrotonato con una resa sui batteri puri liofilizzati pari al 72,5%. Il PHB risultante però è sporco, di colore giallastro e ci viene restituito sotto forma di pellet. Nonostante il metilcrotonato sia una molecola C<sub>4</sub> come il monomero di cui è costituito il PHB, presenta una scarsa capacità di estrazione.

La capacità estrattiva dei due solventi migliori è stata testata anche su biomassa umida (slurry) *Tabella 12*. L'estrazione sullo slurry è la strategia più economica ed industrialmente riproducibile poiché viene eliminato il trattamento di liofilizzazione della biomassa, che comporterebbe ulteriori costi energetici, a fronte di rese di estrazione non significativamente più elevate.

*Tabella 12: Confronto tra le procedure di estrazione eseguito sullo slurry.*

<b>Tipo campione</b>	<b>PHB (wt%)</b>	<b>Solvente</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (min)</b>	<b>Resa PHB (%)</b>	<b>Recupero solvente</b>
Batteri misti	39,2	3-MMB	130	10	92	90
slurry	39,2	HMB	130	10	77	66,5

La resa di estrazione del PHB con il 3-MMB è pari al 92% con un recupero del solvente pari al 90%. Questo risultato dimostra che, tale solvente, può essere applicato anche su biomassa non liofilizzata. L'HMB, invece, presenta una resa di estrazione inferiore pari al 77%, con un recupero del solvente pari al 66,5%. La minor resa di estrazione è il risultato dell'elevata solubilità dell'HMB in acqua che limita la capacità estrattiva del solvente.

### 3.3. Caratterizzazione del polimero estratto

Al fine di valutare l'efficacia del metossimetilbutirato e dell'idrossimetilbutirato come solventi di estrazione, il PHB estratto è stato caratterizzato. In particolare sono stati determinati il peso molecolare medio ( $M_w$ ) e l'indice di polidispersità (PDI) e confrontati con i valori risultati da estrazione con solventi alogenati ed in particolare il diclorometano (*Tabella 13*).

*Tabella 13: Risultati relativi al peso molecolare e indice di polidispersione dei polimeri testati.*

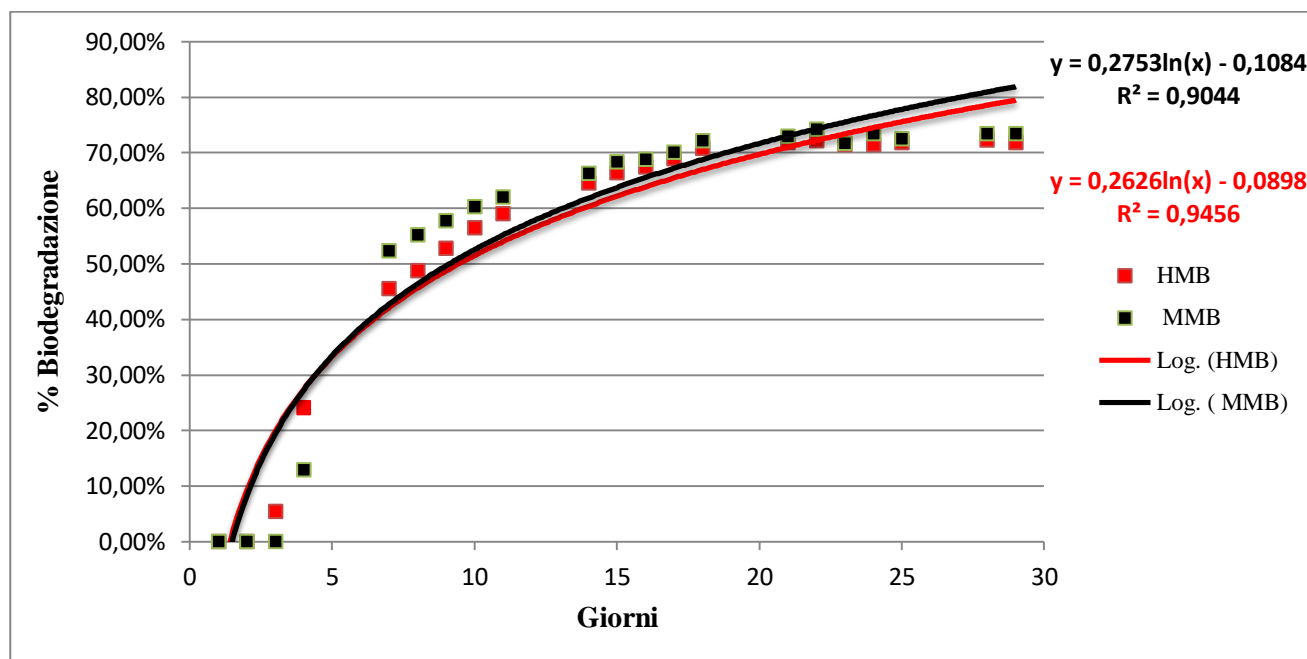
<b>Tipo di campione</b>	<b>Solvente</b>	<b><math>M_w</math> (MDa)</b>	<b>PDI</b>
Colture microbiche pure	DCM	2,1	3,33
Colture microbiche pure	3-MMB	2,3	3,93
Colture microbiche pure	HMB	1,1	2,84
Colture microbiche miste	DCM	3,5	3,1
Colture microbiche miste	3-MMB	3,1	4,71
Colture microbiche miste	HMB	1,4	4,82
PHB commerciale	/	0,8	5,9

Il peso molecolare del PHB estratto con il 3-MMB, sia da colture microbiche miste che pure, è paragonabile al peso molecolare del PHB estratto con diclorometano. Invece, utilizzando l'HMB come solvente di estrazione abbiamo una riduzione di circa la metà del peso molecolare in entrambe le colture microbiche, rispetto al peso molecolare del PHB estratto da DCM. Un'ipotesi potrebbe essere che il solvente stesso reagisce con il PHB, attraverso una reazione di transesterificazione, accorciandolo. Il dimezzamento dell'Mw non preclude l'utilizzo dell'HMB come solvente di estrazione, in quanto tale PHB può avere comunque utilizzato nel campo dell'industria, ovviamente differente dell'uso di un PHB con un Mw maggiore, come lo stampaggio ad iniezione e soffiaggio [20].

L'indice di polidispersità (PDI) misura la distribuzione del peso molecolare di un polimero e viene calcolato come il rapporto tra il peso molecolare medio ponderale e il peso molecolare medio numerico. Se un polimero presenta delle catene della stessa lunghezza viene definito monodisperso ed avrà un indice di PDI pari a 1 [61]. Dai risultati si evince che il polimero estratto è eterogeneo in quanto presenta un PDI compreso tra 3 e 4.

### 3.4. Test di biodegradazione aerobica dei solventi

Il test di biodegradabilità si basa su un monitoraggio periodico di 28 giorni del BOD di 6 bottiglie di vetro da 500 mL: due contenute il bianco, due l'HMB e due il 3-MMB, i cui risultati ottenuti sono rappresentati nel *Grafico 2*.



*Grafico 2: Monitoraggio del BOD.*

Dal grafico si evince che mentre l'HMB ha avuto una crescita nei primi 5 giorni fino al 24,12% , il 3-MMB ha iniziato a biodegradarsi dopo 4 giorni dall'inizio del test, superando anche lo stesso HMB nei giorni successivi. Per entrambi i solventi si osserva che la curva, dal 17esimo giorno, si stabilizza definendo un plateau dove i valori del BOD oscillano. In particolare, la biodegradazione massima dell'HMB è di 72,2 %, mentre del 3-MMB è di 74,2 %. Da tali risultati possiamo dedurre che i solventi sono prontamente biodegradabili in quanto una sostanza viene definita tale se la percentuale di biodegradazione una volta raggiunta il 10% impiega un intervallo di tempo minore di 10 giorni per superare il 60% [62].

### 3.5. Determinazione del $\log K_{ow}$ dei solventi

Nel campo della chimica ambientale il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è uno dei parametri utilizzati per l'applicazione dei modelli di trasporto-diffusione delle sostanze nei suoli, nei sedimenti e nelle acque e dipende dalla mobilità e dal comportamento di tali sostanze nelle varie matrici ambientali [63]. Al fine della determinazione della sostenibilità ambientale dei solventi è opportuno determinare il corrispettivo coefficiente di ripartizione e quindi determinare il comportamento della sostanza in ambiente e la sua tendenza di accumularsi o meno nei tessuti grassi degli organismi viventi. Più è alto il  $\log K_{ow}$ , più una sostanza viene associata all'ottanolo, quindi tende a bioaccumularsi piuttosto che disciogliersi in acqua.

I campioni di 3-MMB e HMB iniettati all'HPLC hanno riportato come tempi di ritenzione, rispettivamente, 4,143 e 3,009, come riportato nella *Tabella 14*.

*Tabella 14: Valori del  $\log K_{ow}$  dell' HMB e del 3-MMB.*

Campioni sconosciuti	t	k	log k	log t	Log $K_{ow}$
HMB	3,009	0,146	-0,835	0,478	0,078
3-MMB	4,143	0,578	-0,238	0,617	1,536

Calcolato il fattore di capacità la costante di ripartizione ottanolo/acqua risultante dalla retta d'interpolazione risulta pari a 0,078 per l'HMB e 1,536 per il 3-MMB. Nel campione contenente il 3-MMB, nel cromatogramma è presente un secondo picco, probabilmente dovuto alla presenza di acido crotonico nella soluzione ma questo non influenza la determinazione.

Secondo l'EPA le gamme di valori del  $\log K_{ow}$  che determinano l'affinità di una sostanza all'acqua o ai lipidi sono [64]:

- <1 Altamente solubile in acqua (idrofilo);
- > 4 Non molto solubile in acqua (idrofobo);
- > 8 Non prontamente biodisponibile;

- $> 10$  Non biodisponibile - difficile da misurare sperimentalmente.

Mentre le gamme di  $\log K_{ow}$  che determinano l'affinità di una sostanza ad essere assorbita attraverso le membrane biologiche sono:

- I liquidi con un  $\log K_{ow}$  di 2-4 tendono ad assorbirsi bene attraverso la pelle;
- I prodotti chimici con un  $\log K_{ow} > 4$  tendono a non assorbirsi bene;
- I prodotti chimici con un  $\log K_{ow}$  di 5-6 tendono a bioconcentrarsi nella porzione lipidica della membrana.

In base ai valori ottenuti l'HMB, avendo un valore inferiore a 1, è un solvente completamente affine all'acqua, dovuto presumibilmente dalla presenza del gruppo ossidrilico (-OH). Il 3-MMB, invece, non è considerato idrofobico ma avendo un valore prossimo a 2 potrebbe assorbirsi attraverso la pelle. Tale ipotesi è da verificarsi con studi successivi.

### **3.6. Solubilità in acqua deuterata dei solventi**

Determinare la solubilità in acqua dei due solventi ci aiuta a capire il loro comportamento quando vengono impiegati per estrarre il polimero da biomassa umida contenete, circa, l'80% di acqua.

Quando vengono inseriti 1 mL di HMB in 1 mL di  $D_2O$  non si formano due fasi distinte. Per cui abbiamo provato ad aumentare il volume di entrambi i solventi fino a 3 mL, ma le due fasi continuano a non separarsi per cui siamo arrivati alla conclusione che l'HMB è completamente miscibile in acqua. Questa conclusione combacia con il valore del  $\log K_{ow}$  determinato inferiore ad 1 che ne definisce l'elevata affinità di questo solvente con l'acqua. Questo spiega anche la bassa resa di estrazione e recupero del solvente impiegato nell'estrazione del PHB da biomassa umida.

Nel 3-MMB, invece, avviene la formazione di due fasi distinte e, attraverso l'interpretazione dell'NMR, la solubilità in acqua risulta pari a 144,58 g/L.

## 4. CONCLUSIONE

L'obiettivo principale affrontato in questo lavoro di tesi è stato quello di valutare varie strategie sostenibili di valorizzazione del PHB attraverso la sintesi di prodotti chimici, in linea con i principi della chimica sostenibile e dell'economia circolare. Infatti, con il progresso tecnologico e la crescente esigenza di un benessere ambientale ed economico, l'economia circolare è diventata un concetto in continua evoluzione, basandosi sul riutilizzo, rigenerazione e riciclaggio di materiali e prodotti. Riciclaggio che, in tal caso, viene preferito alla biodegradazione del materiale poiché non spreca l'energia contenuta nel PHB, ma la trasforma, convertendola in prodotto che presenta un valore aggiunto e nuove possibilità applicative.

In particolare, in questo lavoro di tesi, siamo riusciti a sintetizzare dal PHB di scarto, cioè un prodotto giunto a fine vita o che presenta delle scarse proprietà di lavorazione, due diversi solventi, il 3-metossimetilbutirrato (3-MMB) e l'idrossimetilbutirrato (HMB), testati in seguito come solventi di estrazione dello stesso PHB.

La sintesi del 3-MMB è stata ottenuta in tre differenti step: la depolimerizzazione del PHB, ottenuta attraverso una distillazione termolitica a 170°C, con formazione dell'acido crotonico, successiva esterificazione a 130°C per 7 ore in 5eq di metanolo e 2,5 w/w% di Char-Mais-SO<sub>3</sub>H, un catalizzatore eterogeneo, con formazione del metil crotonato che è stato fatto reagire successivamente con 2eq di metanolo e 3 mol% di CH<sub>3</sub>ONa per 24 ore con una resa di sintesi del 3-MMB di 92%. La sintesi dell'HMB, a differenza del 3-MMB, avviene in un unico step attraverso la reazione di transesterificazione del PHB a 140°C, sotto pressione per 7 ore mediata da 15eq di metanolo e 0,5 mol% di acido solforico, con una resa pari al 95%.

La sintesi dell'HMB appare più promettente poiché la reazione, attuata in un unico passaggio, prevede l'utilizzo minimo di solventi e sostanze ausiliarie con minor dispendio di energia e maggior atom economy. La sintesi del 3-MMB, invece, avviene in tre passaggi, e necessita l'aggiunta di diversi reagenti, aspetti che considerati su grande scala possono portare ad un notevole consumo di energia e produzione di scarti.

La strategia di estrazione del polimero utilizzando i due solventi ha mostrato risultati convincenti per quanto riguarda l'estrazione su biomassa liofilizzata, anche a basse concentrazioni di PHB nelle cellule batteriche, raggiungendo delle rese elevate del 96% e del 98,5%, rispettivamente dell'HMB e del 3-MMB, su biomassa mista e del 95% e 98% su biomassa pura. La differenza si è riscontrata nel tasso di recupero del solvente stesso dalla biomassa batterica. Infatti mentre il 3-MMB presenta, in entrambi i casi, recupero del solvente elevato del 92% e del 96%, rispettivamente per la biomassa pura e mista liofilizzata, l'HMB presenta una diminuzione della resa di recupero del solvente pari al 76,5% e all'88,5%. I risultati ottenuti da processi di estrazione sulla biomassa mista umida



utilizzando come solvente il 3-MMB si sono rivelati altrettanto efficienti, con una resa di estrazione del PHB pari al 92% e di recupero del solvente pari al 90%. Questo risultato dimostra che, tale solvente, può essere applicato anche sullo slurry, procedura che viene preferita in campo industriale al fine di limitare il consumo di energia derivante dai pretrattamenti sulla biomassa. L'HMB, invece, presenta una resa di estrazione inferiore pari al 77%, con un recupero del solvente pari al 66,5%. La minor resa di estrazione è il risultato dell'elevata solubilità dell'HMB in acqua che limita la sua capacità estrattiva.

Del PHB così estratto ne è stato determinato il peso molecolare: su colture microbiche pure l'Mw è stato di 2,3 MDa e di 1,1 MDa, rispettivamente utilizzando 3-MMB e l'HMB, mentre su colture microbiche miste l'Mw è risultato pari a 3,1 MDa e 1,4 MDa. Da tali risultati si evince che, in entrambi i casi, il 3-MMB presenta una migliore efficacia di estrazione mantenendo intatto il peso molecolare, poiché paragonabile a quello estratto con il DCM. Utilizzando l'HMB, invece, abbiamo una riduzione di circa la metà del peso molecolare rispetto al DCM. Un'ipotesi potrebbe essere che il solvente stesso reagisce il PHB, accorciandolo.

Nonostante i risultati riportati siano promettenti ci sono ancora alcuni aspetti da chiarire quali i potenziali campi di applicazione di tali strategie e ampliare il confronto con altri solventi per una valutazione più ampia della scalabilità.

Il 3-MMB e l'HMB sono stati poi caratterizzati per alcune preliminari valutazioni di sostenibilità. In particolare sono state definite la percentuale di biodegradazione, la costante di ripartizione ottanolo acqua e la solubilità in acqua. La percentuale di biodegradazione aerobica è stata determinata attraverso la misurazione del BOD. Entrambi i solventi si sono biodegradati con un percentuale pari a 72,2% per l'HMB e 74,2% per il BOD, per cui possono essere definiti prontamente biodegradabili.

La costante di ripartizione ottanolo/acqua è stata determinata con l'utilizzo del metodo riportato nel protocollo OECD 117, che si basa sull'utilizzo della cromatografia liquida ad alte prestazione (HPLC). Il  $\log K_{ow}$  determinata è pari a 0,078 per l'HMB e 1,536 per il 3-MMB. In base alle linee guida dell'EPA, l'HMB, avendo un valore inferiore a 1, è un solvente completamente affine all'acqua. Il 3-MMB, invece, non è considerato idrofobico ma avendo un valore prossimo a 2 potrebbe assorbirsi attraverso la pelle. Tale ipotesi, però, deve essere ancora valutata, ad esempio con ulteriori valutazioni su micro alghe e organismi acquatici come *Daphnia Magna*.

La solubilità in acqua pari a 144,58 g/L per il 3-MMB, mentre l'HMB è risultato completamente miscibile in acqua.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] O. V. Kharissova, B. I. Kharisov, C. M. Oliva González, Y. P. Méndez, e I. López, «Greener synthesis of chemical compounds and materials», *R. Soc. open sci.*, vol. 6, n. 11, pag. 191378, nov. 2019, doi: 10.1098/rsos.191378.
- [2] P. T. Anastas e M. M. Kirchhoff, «Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry», *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, n. 9, pagg. 686–694, set. 2002, doi: 10.1021/ar010065m.
- [3] P. Anastas e N. Eghbali, «Green Chemistry: Principles and Practice», *Chemical Society Reviews*, vol. 39, n. 1, pagg. 301–312, 2010, doi: 10.1039/B918763B.
- [4] C. F. Dacosta, «Alternative sources to fossil carbon: Ex-ante assessment of novel technologies using waste as a resource», pag. 236.
- [5] T. Narancic, F. Cerrone, N. Beagan, e K. E. O'Connor, «Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation», *Polymers*, vol. 12, n. 4, pag. 920, apr. 2020, doi: 10.3390/polym12040920.
- [6] C. H. Christensen, J. Rass-Hansen, C. C. Marsden, E. Taarning, e K. Egeblad, «The Renewable Chemicals Industry», *ChemSusChem*, vol. 1, n. 4, pagg. 283–289, apr. 2008, doi: 10.1002/cssc.200700168.
- [7] P. N. R. Vennestrøm, C. M. Osmundsen, C. H. Christensen, e E. Taarning, «Beyond Petrochemicals: The Renewable Chemicals Industry», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n. 45, pagg. 10502–10509, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201102117>.
- [8] V. L. Pachapur, S. J. Sarma, S. K. Brar, e E. Chaabouni, «Chapter 1 - Platform Chemicals: Significance and Need», in *Platform Chemical Biorefinery*, S. Kaur Brar, S. Jyoti Sarma, e K. Pakshirajan, A c. di Amsterdam: Elsevier, 2016, pagg. 1–20.
- [9] S. Chanprateep, «Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, n. 6, pagg. 621–632, dic. 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.
- [10] C. S. K. Reddy, R. Ghai, e V. C. Kalia, «Polyhydroxyalkanoates: an overview», *Bioresource Technology*, pag. 10, 2003.
- [11] L. Sang Yup, «Bacterial polyhydroxyalkanoates», pag. 14, lug. 1995.
- [12] European Bioplastics, «What are bioplastics». lug. 2018, [Online]. Disponibile su: [https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP\\_FS\\_What\\_are\\_bioplastics.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf).
- [13] C. S. K. Reddy, R. Ghai, e V. C. Kalia, «Polyhydroxyalkanoates: an overview», *Bioresource Technology*, pag. 10, 2003.

- [14] T. Shalin *et al.*, «Mixed Cultures Fermentation for the Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate», *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, n. 5, pagg. 644–652, ott. 2014, doi: 10.1590/S1516-89132013005000016.
- [15] Y.-W. Cui, H.-Y. Zhang, P.-F. Lu, e Y.-Z. Peng, «Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process», *Sci Rep*, vol. 6, n. 1, pag. 30766, ago. 2016, doi: 10.1038/srep30766.
- [16] C. Kourmentza *et al.*, «Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production», *Bioengineering*, vol. 4, n. 4, pag. 55, giu. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4020055.
- [17] di M. Valera, «polimeri biodegradabili del futuro?», pag. 7, 2001.
- [18] X. Gao, J.-C. Chen, Q. Wu, e G.-Q. Chen, «Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, n. 6, pagg. 768–774, dic. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.005.
- [19] K. Sudesh, H. Abe, e Y. Doi, «Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters», *Progress in Polymer Science*, vol. 25, n. 10, pagg. 1503–1555, dic. 2000, doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [20] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, e V. Alvarez, «Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging», *Express Polym. Lett.*, vol. 8, n. 11, pagg. 791–808, 2014, doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
- [21] M. L. Fiorese, F. Freitas, J. Pais, A. M. Ramos, G. M. F. de AragãŁo, e M. A. M. Reis, «Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate», *Eng. Life Sci.*, vol. 9, n. 6, pagg. 454–461, dic. 2009, doi: 10.1002/elsc.200900034.
- [22] S. Chanprateep, «Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, n. 6, pagg. 621–632, dic. 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.
- [23] M. B. Batista *et al.*, «PHB Biosynthesis Counteracts Redox Stress in *Herbaspirillum seropedicae*», *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00472.
- [24] C. Ratledge e B. Kristiansen, A c. di, *Basic biotechnology*, 2nd ed. Cambridge, U.K. ; New York, NY: Cambridge University Press, 2001.
- [25] B. McAdam, M. Brennan Fournet, P. McDonald, e M. Mojicevic, «Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics», *Polymers*, vol. 12, n. 12, Art. n. 12, dic. 2020, doi: 10.3390/polym12122908.
- [26] Y.-W. Cui, H.-Y. Zhang, P.-F. Lu, e Y.-Z. Peng, «Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic

- dynamic feeding process», *Scientific Reports*, vol. 6, n. 1, Art. n. 1, ago. 2016, doi: 10.1038/srep30766.
- [27] M. Villano, F. Valentino, A. Barbetta, L. Martino, M. Scandola, e M. Majone, «Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process», *New Biotechnology*, vol. 31, n. 4, pagg. 289–296, giu. 2014, doi: 10.1016/j.nbt.2013.08.001.
- [28] C. Samorì *et al.*, «Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass», *Green Chem.*, vol. 17, n. 2, pagg. 1047–1056, 2015, doi: 10.1039/C4GC01821D.
- [29] M. Koller, H. Niebelschütz, e G. Braunegg, «Strategies for recovery and purification of poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass», *Eng. Life Sci.*, vol. 13, n. 6, pagg. 549–562, nov. 2013, doi: 10.1002/elsc.201300021.
- [30] C. Kourmentza *et al.*, «Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production», *Bioengineering*, vol. 4, n. 4, pag. 55, giu. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4020055.
- [31] T. Fei, S. Cazeneuve, Z. Wen, L. Wu, e T. Wang, «Effective recovery of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *C. upriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system», *Biotechnol Progress*, vol. 32, n. 3, pagg. 678–685, mag. 2016, doi: 10.1002/btpr.2247.
- [32] A. Burniol-Figols, I. V. Skiadas, A. E. Daugaard, e H. N. Gavala, «Polyhydroxyalkanoate (PHA) purification through dilute aqueous ammonia digestion at elevated temperatures», *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 95, n. 5, pagg. 1519–1532, mag. 2020, doi: 10.1002/jctb.6345.
- [33] P. G. Jessop, D. J. Heldebrant, X. Li, C. A. Eckert, e C. L. Liotta, «Reversible nonpolar-to-polar solvent», *Nature*, vol. 436, n. 7054, Art. n. 7054, ago. 2005, doi: 10.1038/4361102a.
- [34] Z. A. Raza, S. Abid, e I. M. Banat, «Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications», *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 126, pagg. 45–56, gen. 2018, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001.
- [35] A. Aramvash, N. Gholami-Banadkuki, F. Moazzeni-Zavareh, e S. Hajizadeh-Turchi, «An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents», *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, n. 11, pagg. 1936–1943, nov. 2015, doi: 10.4014/jmb.1505.05053.
- [36] M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, e G. Braunegg, «Extraction of short-chain-length poly-[(*R*)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure», *Biotechnol Lett*, vol. 35, n. 7, pagg. 1023–1028, lug. 2013, doi: 10.1007/s10529-013-1185-7.

- [37] G. Jiang *et al.*, «Biomass Extraction Using Non-Chlorinated Solvents for Biocompatibility Improvement of Polyhydroxyalkanoates», *Polymers*, vol. 10, n. 7, pag. 731, lug. 2018, doi: 10.3390/polym10070731.
- [38] A. Rosengart *et al.*, «Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents», *Biochemical Engineering Journal*, vol. 103, pagg. 39–46, nov. 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.06.013.
- [39] M. S. Divyashree, T. R. Shamala, e N. K. Rastogi, «Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate», *Biotechnol Bioproc E*, vol. 14, n. 4, pagg. 482–489, ago. 2009, doi: 10.1007/s12257-008-0119-z.
- [40] N. Jacquel, C.-W. Lo, Y.-H. Wei, H.-S. Wu, e S. S. Wang, «Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)», *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, n. 1, pagg. 15–27, apr. 2008, doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029.
- [41] E. Feghali, L. Tauk, P. Ortiz, K. Vanbroekhoven, e W. Eevers, «Catalytic chemical recycling of biodegradable polyesters», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 179, pag. 109241, set. 2020, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109241.
- [42] J. Spekrijse, J. Le Nôtre, J. P. M. Sanders, e E. L. Scott, «Conversion of polyhydroxybutyrate (PHB) to methyl crotonate for the production of biobased monomers», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, n. 35, pag. n/a-n/a, set. 2015, doi: 10.1002/app.42462.
- [43] A. J. dos Santos, L. V. O. D. Valentina, A. A. H. Schulz, e M. A. T. Duarte, «From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I», *Ingeniería y Ciencia*, vol. 13, n. 26, pagg. 269–298, nov. 2017, doi: 10.17230/ingciencia.13.26.10.
- [44] X. Song, F. Liu, H. Wang, C. Wang, S. Yu, e S. Liu, «Methanolysis of microbial polyester poly(3-hydroxybutyrate) catalyzed by Brønsted-Lewis acidic ionic liquids as a new method towards sustainable development», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 147, pagg. 215–221, gen. 2018, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.12.009.
- [45] Y. Lee, S. H. Park, I. T. Lim, K. Han, e S. Y. Lee, «Preparation of alkyl (R)-(X)-3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly-(R)-(X)-3-hydroxybutyrate», *Enzyme and Microbial Technology*, pag. 4, 2000.
- [46] J. Yu, D. Plackett, e L. X. L. Chen, «Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 89, n. 2, pagg. 289–299, ago. 2005, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.026.
- [47] S. Kaihara, Y. Osanai, K. Nishikawa, K. Toshima, Y. Doi, e S. Matsumura, «Enzymatic Transformation of Bacterial Polyhydroxyalkanoates into Repolymerizable Oligomers Directed towards Chemical Recycling», *Macromol. Biosci.*, vol. 5, n. 7, pagg. 644–652, lug. 2005, doi: 10.1002/mabi.200500030.

- [48] A. Rodríguez-Contreras, M. Calafell-Monfort, e M. S. Marqués-Calvo, «Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, n. 4, pagg. 597–604, apr. 2012, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.007.
- [49] F. G. Calvo-Flores, M. J. Monteagudo-Arrebola, J. A. Dobado, e J. Isac-García, «Green and Bio-Based Solvents», *Top Curr Chem (Z)*, vol. 376, n. 3, pag. 18, giu. 2018, doi: 10.1007/s41061-018-0191-6.
- [50] F. Abbondanzi *et al.*, «Fast method for the determination of short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHAs) in bacterial samples by In Vial-Thermolysis (IVT)», *New Biotechnology*, vol. 39, pagg. 29–35, ott. 2017, doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.012.
- [51] OECD Nuclear Energy Agency e Organisation for Economic Co-operation and Development, A c. di, *Anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge: by measurement of gas production*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2006.
- [52] Organisation for Economic Co-operation and Development e Organisation for Economic Co-operation and Development, *Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*. Paris: OECD Publishing, 2004.
- [53] «Amberlyst<sup>®</sup> 15 hydrogen form 216399», 39389-20-3. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/216399> (consultato gen. 20, 2021).
- [54] R. K. Henderson, A. P. Hill, A. M. Redman, e H. F. Sneddon, «Development of GSK's acid and base selection guides», *Green Chem.*, vol. 17, n. 2, pagg. 945–949, 2015, doi: 10.1039/C4GC01481B.
- [55] PubChem, «Sodium hydroxide». <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14798> (consultato dic. 09, 2020).
- [56] V. A. Rabinovich e Z. Y. Khavin, *A short chemistry reference book*. L. Chemistry, 1977.
- [57] «T401225.pdf». Consultato: dic. 09, 2020. [Online]. Disponibile su: <https://www.albemarle.com/storage/components/T401225.PDF>.
- [58] A. Yu. Platonov, A. N. Evdokimov, A. V. Kurzin, e H. D. Maiyoroova, «Solubility of Potassium Carbonate and Potassium Hydrocarbonate in Methanol», *J. Chem. Eng. Data*, vol. 47, n. 5, pagg. 1175–1176, set. 2002, doi: 10.1021/je020012v.
- [59] J. L. Ellingboe e J. H. Runnels, «Solubilities of Sodium Carbonate and Sodium Bicarbonate in Acetone-Water and Methanol-Water Mixtures.», *J. Chem. Eng. Data*, vol. 11, n. 3, pagg. 323–324, lug. 1966, doi: 10.1021/je60030a009.
- [60] B. Kaewsubdejsiri, T. Mueansichai, e W. Appamana, «SOLUBILITY OF SODIUM METHOXIDE IN PURE AND MIXED SOLVENTS», pag. 8, 2018.

- [61] A. Shrivastava, *Introduction to plastics engineering*. Oxford, United Kingdom : Cambridge, MA: William Andrew, 2018.
- [62] «REGOLAMENTO (UE) N. 260/2014 DELLA COMMISSIONE EUROPEA». .
- [63] G.-M. Cárdenas-Youngs e J.-L. Beltrán, «Dissociation Constants and Octanol–Water Partition Equilibria for Several Fluoroquinolones», *J. Chem. Eng. Data*, vol. 60, n. 11, pagg. 3327–3332, nov. 2015, doi: 10.1021/acs.jced.5b00556.
- [64] «Estimating Physical / Chemical and Environmental Fate Properties with EPI Suite», pag. 22, 2012.