



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



LIGIA LINARDI NIERO ROCHA

**UTILIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NA PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS**

Botucatu

2017

LIGIA LINARDI NIERO ROCHA

**UTILIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NA PRODUÇÃO
DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

Orientador: Prof. Dr. Alcides Lopes Leão

Coorientador: Prof. Dr. José
Gregório Cabrera Gomez

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R672u Rocha, Ligia Linardi Niero, 1987-
Utilização do óleo residual de fritura na produção de polihidroxialcanoatos / Ligia Linardi Niero Rocha . - Botucatu: : [s.n.], 2017
69 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Alcides Lopes Leão
Coorientador: José Gregório Cabrera Gomez
Inclui bibliografia

1. Óleos vegetais - Reaproveitamento. 2. Resíduos. 3. Bipolímeros. 4. Bactérias. I. Leão, Alcides Lopes. II. Cabrera Gomez, José Gregório. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

AUTORA: LIGIA LINARDI NIERO ROCHA

ORIENTADOR: ALCIDES LOPES LEÃO

COORIENTADOR: JOSÉ GREGÓRIO CABRERA GOMEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALCIDES LOPES LEÃO
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP

Prof. Dr. FELIPE KORBUS SUTILI
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Câmpus de Botucatu

Prof. Dr. DERVAL DOS SANTOS ROSA
Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas / Universidade Federal do ABC

Botucatu, 31 de julho de 2017

Pos meus maravilhosos pais,

Zé e Regina,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais pelo apoio incondicional, sem eles nada disso faria sentido. Amo vocês.

Ao meu irmão Má, que me ensinou a ter calma e paciência quando as coisas estavam de ponta cabeça.

Ao meu irmão Dudi, que me apoiou em todas as decisões ao longo desses anos. À tia Lota, que me inspira em ser uma pessoa calma e acreditar que tudo dá certo.

Ao Prof. Dr. Alcides Leão, pela orientação, pela oportunidade de aprendizado, por confiar no meu potencial, pelas oportunidades no exterior e pelo apoio em todas as situações durante o mestrado.

À Prof^a. Dra Ivana Cesarino, pela disposição em me ajudar sempre que procurei por orientação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Gregório Gomez, por disponibilizar o Laboratório de Bioprodutos – USP/SP e por me ajudar com todas as dúvidas que surgiram.

A Jhoanne e a Gabi, que disponibilizaram seu tempo para me ensinar os ensaios, sempre com muita paciência.

Aos colegas do Laboratório Residual, sempre prontos para ajudar no que fosse preciso.

A Dja e Dani, que me orientaram e me inspiram a fazer ciência de uma forma maravilhosa.

As queridas amigas Ju e Carol, que se tornaram irmãs de mestrado, sem vocês eu não teria chegado no final.

Ao Martin, pela ajuda com meu trabalho, pela disposição em ajudar sempre e por todas as caronas durante esses tempos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Rep. Itapuã e todos os agregados, que são minha família de amor. Obrigada pelas incontáveis histórias, por tanta felicidade, por me fazerem acreditar nas pessoas boas, na sinceridade, na amizade incondicional e por construírem maravilhosamente um pedacinho de lar nessa cidade. Todo meu amor por vocês, infinitamente!

As Tatinhas, melhores amigas que existem no mundo, que me apoiam incondicionalmente e nunca me deixam desistir. Amo vocês!!!

À Xirubiruliru mais linda dessa vida, que tornou uma irmã e me incentivou o tempo todo a continuar fazendo um bom trabalho. Aishiteru!

RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma família de biopolímeros biodegradáveis, que podem substituir os plásticos petroquímicos em muitas aplicações, principalmente embalagens e utensílios domésticos. Contudo, estes bioplásticos são atualmente mais caros do que os de origem petroquímica. É possível encontrar vários estudos na literatura que investigam o uso de resíduos e substratos mais baratos, com o intuito de permitir a produção em grande escala do PHA. Os óleos vegetais são largamente utilizados na preparação de alimentos, na maioria das vezes no processo de fritura, o que acarreta grandes quantidades de resíduo, muitas vezes descartados incorretamente, trazendo prejuízo ao meio ambiente e à população. Sob esta consideração, os resíduos de óleo de fritura são abundantes e podem ser utilizados na produção de PHA sem qualquer tratamento adicional. Portanto, este trabalho analisou a produção de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de duas linhagens de bactérias, *Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus megaterium*, utilizando-se óleos residuais de frituras como fonte de carbono (óleo residual de fritura de batata, frango e pastel) e foram utilizados nas concentrações de 10 g.l⁻¹ e 20 g.l⁻¹, separadamente. Os ensaios de produção do biopolímero foram realizados em frascos agitados, em meio de cultura limitante em nitrogênio. A massa seca celular (MSC) foi determinada por gravimetria e a porcentagem de acúmulo e a composição do PHA foram determinados por cromatografia gasosa. A melhor condição de reação foi observada no óleo residual de fritura de batata, no qual a bactéria *Bacillus megaterium* alcançou uma concentração de 13,03 % de acúmulo de PHA (% MSC) e 3,93 g.l⁻¹ de massa seca celular. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que esta alternativa é promissora, além de não competir com a produção baseada em fontes de açúcar, que é comercialmente utilizada.

Palavras-chave: óleo residual de fritura, resíduos, polihidroxicanoatos, bioplásticos

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a family of biodegradable biopolymers that can replace petrochemical plastics in many applications, especially packaging and household appliances. However, these bioplastics are currently more expensive than those of petrochemical origin. It is possible to find several studies in the literature that investigate the use of residues and cheaper substrates, in order to allow large scale production of the PHA. Vegetable oils are widely used in food preparation, most often in the frying process, which leads to large amounts of waste, often incorrectly discarded, causing damage to the environment and the population. Under this consideration, waste frying oils are abundant and can be used in the production of PHA without any further treatment. Therefore, this work studied the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from two strains of bacteria, *Pseudomonas oleovorans* and *Bacillus megaterium*, using waste frying oils as a source of carbon (waste oils from potato, chicken and pastel) and were used at concentrations of 10 g.l⁻¹ and 20 g.l⁻¹, separately. The biopolymer production assays were performed in shaken flasks, in nitrogen-limiting culture medium. The dry cell mass (DCM) was determined by gravimetry and the percentage of accumulation and the PHA composition were determined by gas chromatography. The best reaction condition was observed in the residual frying oil from potato, in which the bacterium *Bacillus megaterium* reached a PHA accumulation of 13.03 % and 3,93 g.l⁻¹ of dry cell mass. From the results obtained it can be concluded that this alternative is promising, besides not competing with the production based on sources of sugar, that is commercially used.

Keywords: waste frying oil, residues, polyhydroxyalkanoates, bioplastics

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Polímeros biodegradáveis.....	17
2.2	Polihidroxicanoatos.....	20
2.2.1	Histórico.....	21
2.2.2	Propriedades.....	23
2.2.3	Classificação.....	26
2.2.4	Polihidroxibutirato (PHB).....	26
2.2.5	Biossíntese.....	27
2.2.6	Aplicações.....	31
2.2.7	Produção industrial.....	32
2.3	Óleos vegetais.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Microrganismos e condições de cultivo.....	39
3.1.1	Determinação das colônias produtoras de PHA.....	39
3.1.2	Preservação das linhagens bacterianas.....	39
3.2	Meios deculturas.....	39
3.2.1	Meio Nutriente ágar (NA).....	40
3.2.2	Meio Mineral (MM) (RAMSAY et al., 1990).....	40
3.2.3	Meio Luria Bertani (LB).....	41
3.2.4	Esterilização dos meios.....	41
3.3	Óleo vegetal como fonte de carbono.....	41
3.3.1	Índice de peróxidos.....	41
3.3.2	Teor de compostos polares totais (CPT).....	42
3.3.3	Teor de ácidos graxos livres.....	42
3.3.4	Composição dos ácidos graxos.....	43
3.3.5	Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho.....	43
3.4	Ensaio de produção de PHA em frascos agitados.....	43

3.5	Métodos analíticos.....	44
3.5.1	Determinação do pH.....	44
3.5.2	Determinação da massa seca celular (MSC).....	44
3.5.3	Composição monomérica e quantificação do PHA.....	45
3.6	Análise estatística.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Determinação das colônias bacterianas produtoras de PHA.....	47
4.2	Caracterização dos óleos vegetais.....	47
4.2.1	Óleo de soja puro.....	50
4.2.2	Óleo residual de fritura.....	50
4.3	Ensaio de produção de PHA em frascos agitados.....	51
4.3.1	<i>Bacillus megaterium</i>	53
4.3.2	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	53
4.3.3	Composição monomérica dos PHAs produzidos.....	54
4.4	Extração dos biopolímeros.....	56
4.5	Espectroscopia vibracional de absorção na região do	
Infravermelho.....		56
4.6	Análise Estatística.....	57
5	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais - ABIOVE relata que no ano de 2015 o Brasil produziu em torno de 8 milhões de toneladas de óleo vegetal de soja, sendo que aproximadamente 6,5 milhões desse total foram utilizados para o consumo doméstico (ABIOVE, 2017).

Os óleos vegetais são muito utilizados no processo de fritura de alimentos em bares, restaurantes e domicílios. As indústrias de alimentos também são grandes consumidoras desse óleo, que servem de matéria prima para outros produtos como temperos para salada, maionese, gordura vegetal e margarinas, além de produzirem produtos específicos para o processo de fritura, como os alimentos pré-fritos congelados, que são bem aceitos pelo mercado consumidor, uma vez que a praticidade em preparar a refeição é um aspecto relevante na sociedade atual (FREIRE; MANCINI-FILHO; FERREIRA, 2013).

Com essa ampla utilização do óleo de soja o que ocorre é que uma grande parcela desse resíduo é descartada de forma incorreta, sendo jogado em ralos e pias, aglutinando-se com o lixo jogado indevidamente nas tubulações de esgoto, formando um bloco rígido, que torna difícil sua desobstrução (PANADARE; RATHOD, 2015).

O custo da SABESP com serviços de desobstrução de redes coletoras de esgoto entupidas por lixo agregado por óleos chega a R\$ 28 milhões/ano, já que estas redes possuem diâmetro reduzido e foram desenvolvidas para receber apenas os efluentes gerados pela água utilizada no banheiro, chuveiro, pia da cozinha, tanque ou vaso sanitário. A saúde da população é colocada em risco quando as redes de esgotos são utilizadas incorretamente, já que o uso inadequado aumenta o risco de retorno de esgoto para dentro dos imóveis, a ocorrência de enchentes e exposição a vetores e pragas urbanas (SABESP, 2013).

Para amenizar o problema do descarte incorreto do óleo, diversos usos estão sendo atribuídos aos óleos residuais de fritura, como a fabricação caseira de sabão, produção de tinta a óleo, entre outras, além de ser amplamente utilizado em pesquisas de produção de biodiesel, se mostrando uma importante matéria-prima para produção desse combustível (CÉSAR et al., 2017; MORGAN-MARTINS et al., 2016).

Outro problema em nossa sociedade são as grandes quantidades de plásticos acumulados em aterros sanitários, prejudicando a circulação de gases e a troca de líquidos resultantes do processo de decomposição dos materiais orgânicos, além

desse material se desfazer em pequenas partículas, causando prejuízo à vida humana e selvagem (BARNES et al., 2009; DIAZ SILVARREY; PHAN, 2016).

Devido as propriedades versáteis, os plásticos petroquímicos têm sido amplamente empregados nos mais diversos ramos de atividades, como na indústria de alimentos (embalagens), na indústria automobilística (painel e peças), na construção civil (tubulações e peças em geral), em mobílias, utensílios domésticos e diversos outros produtos, sendo difícil reduzir seu consumo (KAZMER, 2017; RAO; SULTANA; KOTA, 2017).

Assim, a substituição por materiais biodegradáveis com propriedades semelhantes aos dos plásticos convencionais seria uma saída para esse problema ambiental e esta preocupação vem motivando a pesquisa acadêmica e industrial para desenvolver materiais inovadores rotulados como "ecológicos", ou seja, materiais produzidos a partir de recursos alternativos, com menor consumo de energia, biodegradáveis e não tóxicos para o meio ambiente (JIANG; ZHANG, 2017).

Os polímeros biodegradáveis podem ser obtidos através de recursos renováveis agroindustriais e representam uma rota alternativa e interessante aos polímeros não-degradáveis comuns, substituindo-os nas suas aplicações mais diversas, como embalagens, aplicações na agricultura, materiais médicos, etc. No entanto, além de apresentar custos elevados de produção em relação aos produtos convencionais podem apresentar características mecânicas e físicas inferiores (ASHTER, 2016).

Dentre os biopolímeros conhecidos, uma alternativa amplamente estudada seria a produção de polihidroxialcanoatos (PHA), um polímero bacteriano produzido por microorganismos e que pode utilizar diferentes substratos como fonte de matéria prima, permitindo o uso de diversos resíduos (TAN; YIN; CHEN, 2017).

Economicamente, há grande interesse industrial em produzir PHA a partir de óleo residual de soja descartado. A fonte é abundante e renovável, basta desenvolver o processo adaptado às condições de coleta desse resíduo e aos microrganismos produtores, tornando-os competitivos com os produtos obtidos pelas fontes não renováveis, além de agregar valor a este resíduo descartado (GOMEZ; BUENO NETO, 1997; BASKARAN et al., 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em analisar a capacidade de produção de PHA por *Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus megaterium*, utilizando-se óleo residual de fritura como fonte de carbono.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polímeros biodegradáveis

Segundo estabelecido pela "American Standard for Testing and Methods" através da ASTM-D-833, 2000, os polímeros biodegradáveis são todos os materiais poliméricos que sofrem naturalmente degradação pela ação de microorganismos, como fungos, bactérias e algas, levando a produção de gás carbônico, metano, componentes celulares e outros produtos e podem ser classificados de acordo com sua fonte de obtenção, entre rotas sintéticas ou naturais.

Os polímeros biodegradáveis sintéticos são produzidos por síntese química clássica e seu processo de produção pode ser controlado, permitindo a obtenção de materiais com características específicas. Dentre eles, o poli (ácido láctico) (PLA) é amplamente conhecido e muitos países estão engajados no desenvolvimento de produtos baseados em PLA, uma vez que este material tem potencial para substituir o polietileno ou polipropileno (ROCHA; ROSA, 2017).

O PLA é um polímero com propriedades termoplásticas, preparado através da fermentação de ácido láctico de milho, batatas ou outras matérias-primas de origem natural. Exibem alta resistência, biocompatibilidade, transparência e quando comparado ao polipropileno apresenta melhor capacidade para conservar sua forma após compressão ou torção. Assim, vem sendo utilizado em várias aplicações, como fibras têxteis, embalagens de alimentos e por ser compatível com tecido humano é empregado também em materiais biomédicos (PODZOROVA et al., 2016).

A Tabela 1 demonstra o potencial de substituição de alguns plásticos petroquímicos pelo PLA e por dois tipos de PHAs (PHB e PHBx), demonstrando que, apesar do PLA ser um polímero biodegradável com capacidade de substituir diversos plásticos petroquímicos, os polihidroxialcanoatos (PHA) apresentam a vantagem de poderem ser utilizados de uma forma mais abrangente, ou seja, são capazes de substituir uma gama maior de tipos de plásticos convencionais devido à grande variedade de PHAs existentes (BRITO et al., 2011).

Tabela 1 – Potencial de substituição de alguns polímeros petroquímicos por PLA, PHB e PHBHx

Polímero	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PA	PET
PLA	-	+	-	+	+	+	+
PHB	-	+	-	++	+	-	-
PHBHx	+	++	++	++	+	-	+

++ substituição completa; + substituição parcial; - não substitui

PLA: Poli (ácido láctico); PHB: Polihidroxibutirato; PHBHx: Poli (hidroxibutirato-co- hidroxihexanoato); PVC: Policloreto de vinila; PEAD: Polietileno de Alta Densidade; PEBD: Polietileno de Baixa Densidade; PP: Polipropileno; PS: Poliestireno; PA: Poliamida; PET: Politereftalato de etileno.

Fonte: (BRITO et al., 2011)

Os polímeros biodegradáveis naturais são os polímeros que ocorrem naturalmente e podem ser extraídos da biomassa, como por exemplo, a celulose, amido, quitina, quitosana, polipeptídeos entre outros (FECHINE, 2013).

Já os polímeros biodegradáveis produzidos durante o ciclo de crescimento de microorganismos são sintetizados através de processos metabólicos complexos, catalisados por enzimas e reações de crescimento. Denominados de polihidroxicanoatos (PHA) ou poliésteres bacterianos, têm chamado grande atenção para aplicações comerciais. Os PHAs são produzidos por uma grande variedade de bactérias, na forma de grânulos intracelulares de reserva de energia e podem ser produzidos por fontes renováveis ou resíduos (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

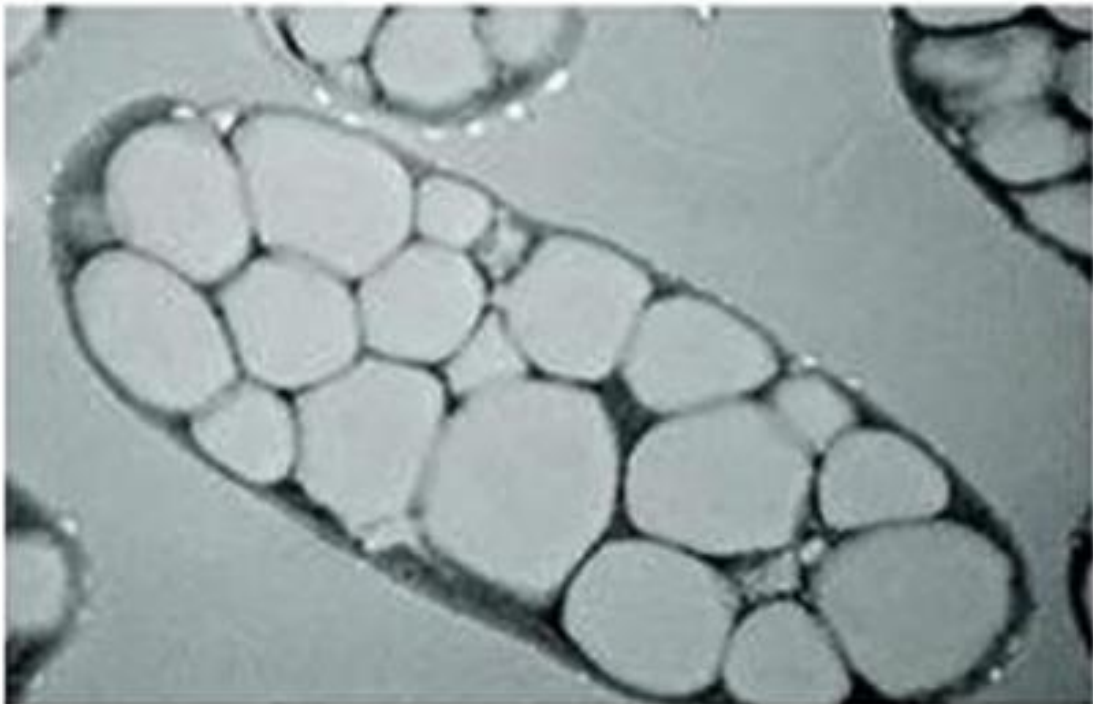
No ano de 2013, a capacidade mundial de produção de polímeros biológicos foi de 5,1 milhões de toneladas e estima-se que no ano de 2020 haverá um aumento para 17 milhões de toneladas desse material (AESCHELMANN; CARUS, 2015).

Apesar das vantagens oferecidas, os biopolímeros representam apenas uma pequena parcela no mercado devido ao alto custo de produção em relação aos polímeros convencionais. Segundo LEONG et al. (2016), a fonte de carbono empregada na produção do polihidroxicanoato contribui mais de 50 % do custo total de produção, reforçando a importância de utilizar resíduos no processo de produção desse material.

2.2 Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos, abreviados como PHA, são poliésteres sintetizados e armazenados, em forma de grânulos citoplasmáticos de 0,2-0,5 μm de diâmetro, por diversas bactérias encontradas no meio ambiente. O armazenamento pode ocorrer tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e atuam como reserva de carbono e energia para esses microorganismos, chegando até 80 % do seu peso seco celular (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; TAN; YIN; CHEN, 2017).

Figura 1 – Acúmulo intracelular de polihidroxicanoato em célula bacteriana



Fonte: (TAN; YIN; CHEN, 2017)

O acúmulo intracelular ocorre pela polimerização de intermediários solúveis em moléculas insolúveis, permitindo que a bactéria não apresente alterações em sua pressão osmótica, mantendo sua reserva de nutrientes com pouco gasto energético, assegurando sua sobrevivência em situações de escassez de recursos (MADISON; HUISMAN, 1999; REHM, 2003).

A formação desses grânulos de PHA ocorre quando o meio em que o microrganismo se encontra apresenta excesso de fonte de carbono e simultânea

limitação de algum nutriente necessário à multiplicação das células e ao crescimento bacteriano, como nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre, ferro, etc. Quando esses elementos essenciais estiverem novamente disponíveis no meio o conteúdo acumulado pode ser convertido em fonte de carbono e energia, sendo então utilizado no metabolismo celular (ANDERSON; DAWES, 1990).

A fonte de carbono disponível na produção dos polihidroxicanoatos apresenta um importante papel no processo produtivo, alterando as propriedades e resultando em diferentes composições do polímero, que apresentam propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas muito semelhantes aos polímeros sintéticos, com temperaturas de fusão entre os 40 e 180 °C e cristalinidade entre 30 a 70 %, dependendo dos monómeros que os constituem. Além de serem biocompatíveis, biodegradáveis, insolúveis em água, atóxicos e não dependentes do petróleo para sua produção, o que desperta grande interesse industrial (SUDESH; ABE; DOI, 2000; AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; REHM, 2010).

Os polímeros de origem microbiana ganham cada vez mais espaço por apresentarem diversidade de aplicações, como na indústria de embalagens, medicina, agricultura, indústria de alimentos, indústria farmacêutica, matéria prima para produtos químicos, produção de tintas, etc., já que se assemelham aos plásticos de origem petroquímica, podendo substituí-los em diversos níveis, além de apresentarem alto potencial de biodegradação, pois sofrem ação enzimática de diversas bactérias, fungos e algas. O tempo de degradação desses biopolímeros depende da sua composição e do tipo de ambiente, podendo variar de semanas e até mesmo ultrapassar um ano (HAMMOND; LIGGAT, 1995; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

2.2.1 Histórico

No ano de 1926, o microbiologista francês Maurice Lemoigne, no Instituto Pasteur, obteve pela primeira vez o composto de PHA utilizando a bactéria *Bacillus megaterium*. Lemoigne caracterizou e determinou a composição do primeiro e mais estudado PHA até os dias de hoje, o ácido 3-hidroxi-butírico (P(3HB)). Na época, a descoberta foi considerada apenas como uma curiosidade acadêmica, permanecendo sem aplicação na indústria (LEMOIGNE, 1926).

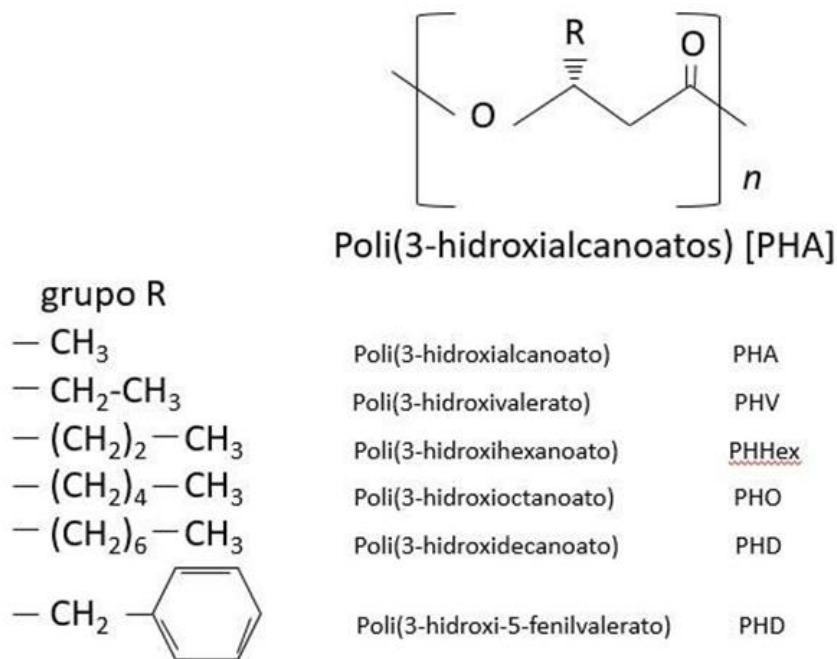
Na década de 50, os conhecimentos adquiridos durante anos de pesquisas permitiram sugerir que o P(3HB) era estocado intracelularmente como reserva de carbono e energia e que o acúmulo desses biopolímeros ocorre de forma natural entre a maioria das linhagens bacterianas gram-negativas (LENZ; ARCHESSAULT, 2005).

No ano de 1958, Macrae e Wilkinson, estudando o microorganismo *B. megaterium*, verificaram que o acúmulo de P(3HB) ocorria principalmente quando as proporções de glicose/nitrogênio estavam elevadas no meio, concluindo novamente que o P(3HB) era uma fonte de reserva de carbono e energia (MACRAE; WILKINSON, 1958).

Durante a década de 60 houve a descoberta das propriedades termoplásticas apresentadas pelos compostos, aumentando o interesse sobre esse plástico biodegradável. Finalmente no ano de 1965 James Noel Baptist e John Bosley Ziegler patentaram, pela primeira vez, o processo de produção do biopolímero P(3HB), que começou a ser produzido comercialmente nos EUA pela empresa Grace WR & Co. Contudo, a produção ineficiente e a falta de tecnologias quanto a estabilidade térmica e extração do polímero, limitaram sua aplicação (BAPTIST; ZIEGLER, 1965). Quase uma década depois outras 11 unidades monoméricas já tinham sido identificadas (FINDLAY; WHITE, 1983).

Essas descobertas científicas despertaram um grande interesse comercial. O P(3HB) era um material pouco flexível, com aplicações limitadas, assim, a incorporação de uma segunda unidade de HA poderia representar uma mudança significativa em suas propriedades. Como demonstrado na Figura 2, SUDESH e colaboradores (2000), ilustraram de forma didática os marcos no desenvolvimento científico dos PHAs, considerando que a produção em escala industrial do copolímero P(3HB-3HV) foi o terceiro marco importante na história dos polihidroxialcanoatos, após sua descoberta em 1926.

Figura 2 – Alguns dos marcos importantes no histórico dos PHAs



Fonte: Adaptado de (SUDESH; ABE; DOI, 2000)

Por volta de 1980, as pesquisas focaram em caracterizar as unidades monoméricas sintetizadas pelos microorganismos, resultando na identificação de diversas unidades monoméricas do HA. Ainda nesse período, os polihidroxiálcanoatos foram produzidos comercialmente sob os nomes comerciais de Biopol™, Nodax™, Biocycle™, Biomer™ e BioGreen™ (DOI et al., 1987; ; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016).

No ano de 1995, Alexander Steinbüchel e Henry E. Valentin publicaram uma revisão mostrando a cronologia de relatórios sobre novos HA constituintes de PHA, considerando apenas trabalhos em que a estrutura do biopolímero foi conclusivamente confirmada, encontrando 91 monômeros de HA (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

Já no ano de 2000, aproximadamente 125 HAs eram conhecidos e, devido a esse grande número de monômeros, um nome geral foi atribuído, i.e. poli-hidroxiálcanoatos (PHA), designando a família de polímeros de reserva bacterianas intracelulares (REHM; STEINBÜCHEL, 1999; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Aproximadamente 150 monômeros constituintes de PHA já foram identificados e são produzidos a partir de diversas fontes de carbono. Essa variação de estruturas

monoméricas, apresentadas por essa classe de poliéster bacterianos, resulta em polímeros com diferentes propriedades físicas e mecânicas (LUENGO et al., 2003; CARASCHI et al., 2002; GAO et al., 2011).

Até agora, apenas PHB, copolímeros de 3-hidroxi-butirato e de 3-hidroxi-valerato (PHBV), copolímeros de 3-hidroxi-butirato e de 4-hidroxi-butirato (P3HB4HB), copolímeros de 3-hidroxi-butirato e de 3-hidroxi-hexanoato (PHBHHx) têm sido usados para produção em escala industrial, e mais de 20 empresas em todo o mundo tem se empenhado na industrialização de PHA. Os pesquisadores confiam no potencial desses biomateriais, alegando que os polihidroxicanoatos são uma nova geração de biopolímeros e que seu mercado precisa de tempo para se desenvolver (CHEN, 2009; AESCHELMANN; CARUS, 2015; ANJUM et al., 2016).

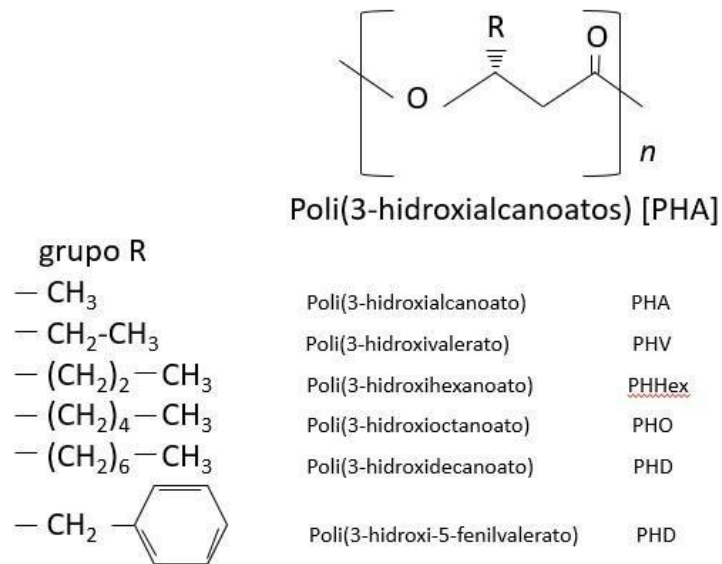
2.2.2 Propriedades

A linhagem bacteriana e o comprimento da cadeia da fonte de carbono utilizada na síntese dos PHA são responsáveis pela composição monomérica e a distribuição de massas moleculares do polímero, o que caracteriza as diferentes propriedades mecânicas e físicas encontradas nos cerca de 150 PHAs relatados, permitindo a produção de polímeros sob medida para diferentes aplicações. Uma das vantagens são as propriedades tanto termoplásticas quanto elastoméricas, que esses biopolímeros podem apresentar (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

Na polimerização, cada monômero forma uma ligação éster com o grupo hidroxilo de outro monômero e segundo STUBBE et al. (2005), se o grupo R for composto de hidrogênio, metila ou etila o PHA terá características de um termoplástico. Se o grupo R for composto de $(CH_2)_2CH_3$ a $(CH_2)_8CH_3$ o polímero apresentará característica elastoméricas. Portanto, a cadeia lateral varia conforme os tipos diferentes de monômeros (hidroxicanoatos) identificados (AMARA, 2008).

A Figura 3, a seguir, ilustra a estrutura básica dos monômeros de PHA, onde o radical "R" pode ser desde um átomo de hidrogênio até cadeias de carbono contendo 13 átomos de carbono, podendo conter insaturações, cadeias cíclicas, grupos aromáticos, inclusive outros átomos como bromo ou flúor (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; LEE, 1996).

Figura 3 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos (PHAs) e exemplos de derivados estruturais



Fonte: (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013)

STEINBÜCHEL e VALENTIN (1995) ilustraram as fórmulas estruturais de 91 monômeros diferentes de PHA, que podem ser consultados no apêndice A dessa dissertação.

Os PHAs podem se apresentar na forma de homopolímeros (repetição de apenas uma unidade monomérica), copolímeros (repetição de duas unidades monoméricas diferentes) ou terpolímeros (repetição de três unidades monoméricas diferentes) e sua constituição depende da fonte de carbono utilizada na produção e do microrganismo que os sintetiza (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

As propriedades físicas e mecânicas como ponto de fusão, temperatura de transição vítrea, rigidez e resistência a solventes orgânicos variam de acordo com a composição monomérica e os PHAs tornam-se altamente moldáveis em temperaturas próximas ou acima de seu ponto de fusão (BRANDL; PÜCHNER, 1990; STEINBÜCHEL, 1996).

Alguns PHAs apresentam propriedades semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, permitindo a substituição dos polímeros convencionais por esses bioplásticos, como o poli(3-hidroxi butirato) e o copolímero P(3HB-co-3HHx), que se

destacam pelas propriedades físicas semelhantes às dos plásticos convencionais (LEE, 1996). A Tabela 2 apresenta a comparação de algumas dessas propriedades.

Tabela 2 – Comparação de propriedades entre diferentes polihidroxicanoatos e polímeros petroquímicos

Polímero	TM (°C)	TG (°C)	Cristalinidade %	Resistência à Tração (MPa)	Alongamento à Ruptura %	Módulo de Young (GPa)	Ref.
P(3HB)	177	4	60	43	5	3,5	(TSUGE, 2002; LEE, 1996)
P(3HB-co-10%HV)	150	-	-	25	20	1,9	PRADELLA 2006; LEE 1996
P(3HB-co-20%3HV)	145	-1	56	20	50	1,2	TSUGE 2002; LEE 1996
P(3HB-co-3%4HB)	166	-	-	28	45	-	KHANNE, SRIVASTAVA, 2005
P(3HB-co-16%4HB)	150	-7	45	26	444	-	TSUGE 2002;
P(HB-co-10%HHx)	127	-1	34	21	400	-	TSUGE 2002;
Polipropileno	176	10	50-70	38	400	1,7	TSUGE 2002; LEE 1996
Polipropileno de baixa densidade	130	-36	20-50	10	620	-	TSUGE 2002;
Poliestireno	110	21	-	50	-	3,1	KHANNA, SRIVASTAVA, 2005; LEE 1996
Polietileno tereftalato	262	3400	-	10	620	2,2	KHANNA SRIVASTAVA, 2005; LEE 1996

2.2.3 Classificação

Os PHAs são classificados em dois grandes grupos, o primeiro são os PHAscl, polihidroxicanoatos de cadeia curta (HASCL – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”), constituído por monômeros contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e se apresentam como materiais duros e quebradiços. O PHB (poliéster bacteriano economicamente mais importante) é um dos exemplos de PHAscl (PARK et al., 2012).

O segundo grupo são os PHAmcl, polihidroxicanoatos de cadeia média (HAMCL – “HydroxyAcids of Medium-Chain-Length”), constituído por monômeros contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal e são caracterizados por suas propriedades elastoméricas (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; PARK et al., 2012). Além dos PHAscl e PHAmcl existem os PHAlcl, polihidroxicanoatos de cadeia longa (“HydroxyAcids of Long-Chain-Length”), que apresentam monômeros com mais de 14 átomos de carbono, porém, essa definição ainda é pouco usual (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011).

2.2.4 Polihidroxiбутирато (PHB)

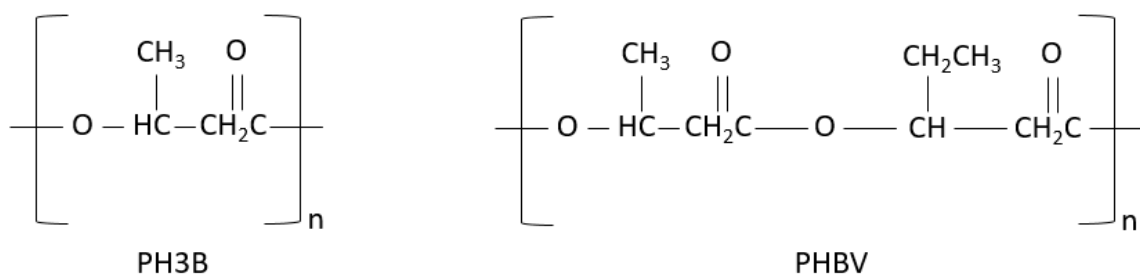
O polihidroxiбутирато P(3HB) se destaca por ser o biopolímero mais bem caracterizado e estudado da família dos polihidroxicanoatos (Figura 5). É um termoplástico cristalino, duro e quebradiço. Apresenta um grau de cristalinidade que varia entre 55 e 80 %, módulo de Young de 3,5 GPa e resistência à tração de 43 MPa.

Apesar da característica quebradiça, o PHB apresenta propriedades mecânicas semelhantes às do polipropileno, como alta cristalinidade, resistência à água, boa estabilidade à radiação ultravioleta, biocompatibilidade, alta regularidade da cadeia carbônica e elevada massa molecular (SUDESH; ABE; DOI, 2000; RODRIGUES; PARRA; LUGÃO, 2005).

Porém, sua aplicabilidade é restrita devido à elevada temperatura de fusão (entre 170 e 180 °C) e seu alongamento à ruptura é de cerca de 5 %, significativamente menor do que o de polipropileno (400 %) e segundo MACHADO et al. (2010), a utilização do PHB é limitada devido à forte tendência que esse polímero tem ao envelhecimento (trincas no interior de seus cristais) e a grande suscetibilidade à degradação térmica (LEE, 1996; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Contudo, a incorporação da fração 3-hidroxivalerato resulta no copolímero (3HB-co-3HV), que se torna mais rígido (aumento na resistência ao impacto) e mais flexível (diminuição do módulo de Young) conforme o aumento da fração do 3HV. O alongamento à ruptura também aumenta à medida que aumenta a fração do monômero e, além disso, a diminuição da temperatura de fusão com o aumento da fração de 3-hidroxivalerato, sem afetar a temperatura de degradação térmica, permite o processamento deste copolímero. Assim as propriedades do material podem ser controladas ajustando-se a fração de 3-hidroxivalerato durante a cultura em biorreator (LEE, 1996; OJUMU; YU; SOLOMON, 2004).

Figura 4 – Estrutura geral do polihidroxibutirato (PHB) e do copolímero polihidroxibutirato-co-valerato (3HB-co-3HV)



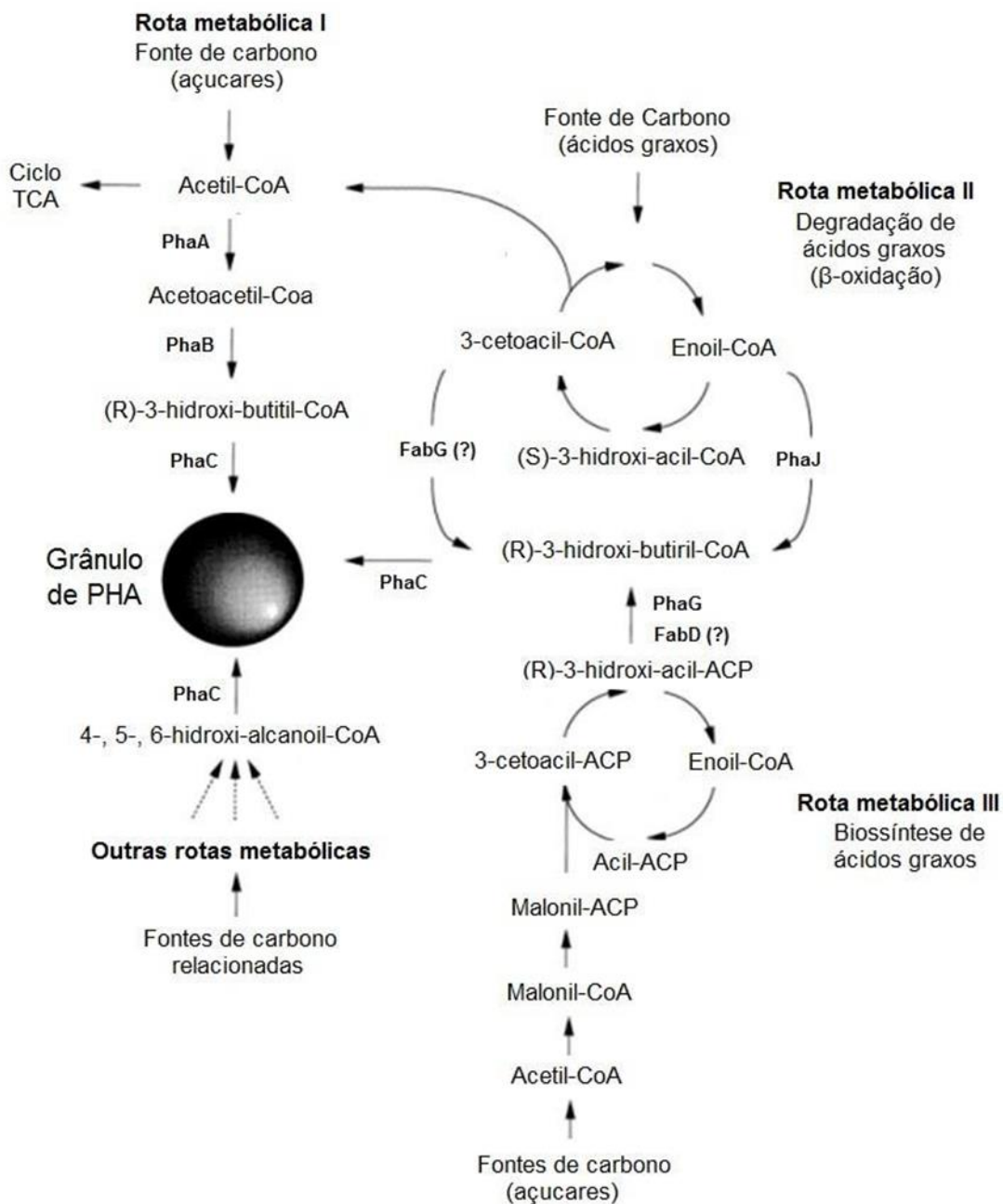
Fonte: (COELHO; ALMEIDA; VINHAS, 2008)

2.2.5 Biossíntese

O acúmulo de PHA ocorre tanto nas fases exponenciais de crescimento bacteriano quanto nas fases exponenciais tardias e fases estacionárias, dependendo do organismo em questão (STUBBE et al., 2005).

O conhecimento da biossíntese dos polihidroxialcanoatos é muito importante para o aprimoramento da produção desses biopolímeros e até os dias de hoje foram relatadas 14 rotas metabólicas. Dentre essas, as vias metabólicas mais estudadas estão representadas pela Figura 6, demonstrando que dependendo da fonte de carbono fornecida, a bactéria desvia o metabolismo para as diferentes rotas (SUDESH; ABE; DOI, 2000; MENG et al., 2014).

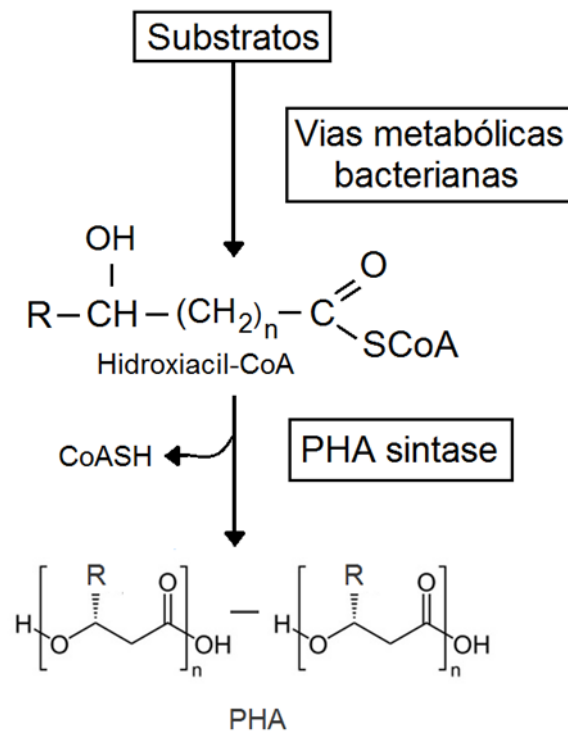
Figura 5 – Rotas metabólicas para produção de PHAs



Fonte: (SUDESH; ABE; DOI, 2000)

Os principais fatores envolvidos na biossíntese do PHAs são: a fonte de carbono utilizada, a rota metabólica encontrada em cada bactéria produtora de PHA e o tipo de PHA sintase que o microorganismo apresenta. A Figura 7 representa um esquema simplificado de como ocorre o acúmulo intracelular do PHA (TAN; YIN; CHEN, 2017).

Figura 6 – Esquema de acúmulo de PHA



Fonte: (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001)

Portanto, para que ocorra a incorporação dos monômeros, o substrato fornecido no momento da síntese deve ser adequado, ou seja, uma fonte de carbono que possa ser convertida no hidroxiaçil-CoA desejado, através das vias metabólicas presentes na célula bacteriana, deve ser fornecido. Além disso, a bactéria deve apresentar a PHA sintase, enzima capaz de incorporar o hidroxiaçil-CoA gerado, ao poliéster formado (MENG et al., 2014).

Existem 3 principais fases metabólicas que ocorrem durante o acúmulo do PHA. Primeiro, a absorção da fonte de carbono oferecida para a célula ocorre por um sistema de transporte específico ou por difusão do composto pela membrana. Na segunda fase, através de reações anabólicas e/ou catabólicas, ocorre a formação de compostos do tipo hidróxi-acil coenzima-A tio éster, substrato para a PHA sintase. A segunda fase é considerada como a de maior importância, uma vez que é nesse momento que a fonte de carbono é convertida em um substrato adequado para a enzima PHA sintase. Por fim, na terceira fase, a PHA sintase, também chamada de

PHA polimerase, catalisa a formação das ligações ésteres com liberação da coenzima A (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

As PHA sintases são divididas em quatro grupos, de acordo com a estrutura primária deduzida das seqüências de genes, especificidade ao substrato e subunidade de composição (REHM, 2003). A Figura 8 ilustra as quatro classes de PHA sintase.

Figura 7 – Divisão das PHA sintases

Classe	Subunidade	Microorganismos	Substratos
I	PhaC ~ 60 – 73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i> + a maioria das outras bactérias produtoras de PHA	3HAscl-CoA [~C ₃ -C ₅] também: 4HAscl-CoA 5HAscl-CoA, 3MAAscl-CoA
II	PhaC ~ 60 – 65 kDa	<i>Pseudomonas oleovorans</i> + a maioria das <i>Pseudomonas sp</i>	3HAMcl-CoA [~ ≥C ₅]
III	PhaC PhaE ~ 40 – 40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i> <i>Thiocapsa pfenningii</i> + as cianobactérias	3HAscl-CoA [~C ₃ -C ₅] (3HAMcl-CoA [~C ₆ -C ₈] também: 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	PhaC PhaR ~ 40 – 22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HAscl-CoA [~C ₃ -C ₅]

Fonte: (VALAPPIL et al., 2007)

A reação de obtenção do PHB ocorre em bactérias produtoras de PHB que possuem a enzima PhaA. Duas moléculas de acetil-coenzima A são condensadas pela ação da enzima β-cetotiolase (PhaA) a acetoacetil-coenzima A, que por sua vez é reduzida a 3-hidroxiacetil-coenzima A pela ação da enzima acetoacetil-coenzima A redutase NADPH dependente (PhaB), por fim, através da ação da enzima PHA sintase (PhaC), é obtido o polímero (STUBBE et al., 2005).

2.2.6 Aplicações

São poucos os PHAs comercialmente disponíveis no mercado, sendo eles o PHB, PHBV, P3(HB-4HB) e P(HBH-Hx), já que os outros PHAs são sintetizados individualmente por laboratórios em quantidades muito pequenas e apenas para curiosidade acadêmica, uma vez que não alcançam porcentagem suficiente para produção em grande escala ou suas propriedades térmicas e mecânicas não são satisfatórias para potenciais aplicações (CHEN et al., 2015).

O polihidroxitirato é o PHA mais estudado e comercializado nos dias de hoje e, por apresentar propriedades mecânicas similares às do polipropileno, pode ser aplicado em diversos materiais como embalagens de produtos alimentícios, de higiene, limpeza, cosméticos, produtos farmacêuticos, na produção de sacolas, garrafas, redes de peixe, vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, fabricação de vasos, colheres, dentre diversas outras aplicações (CARASCHI et al., 2002; KHARDENAVIS et al., 2007).

Outra vantagem é a biocompatibilidade apresentada por esses materiais, permitindo que o PHB seja amplamente estudado e aplicado em materiais de uso médico e veterinário, já que apresenta compatibilidade com sangue e tecidos de mamíferos, podendo substituir suturas, fios, implantes, reparação de tecidos ou construção de órgãos artificiais, tecidos para implantes, encapsulação de fármacos para liberação controlada de medicamentos e cosméticos, entre outros (WU; WANG; CHEN, 2009; KUMAR; GUPTA; THAKUR, 2016).

Nos últimos anos o polihidroxitirato também vem sendo utilizado como substituto de plásticos convencionais na produção de compósitos, que se caracterizam por serem materiais compostos de fibra/serragem de madeira, ou outra fibra vegetal, extrusados com polímeros termoplásticos, como o polipropileno. Os compósitos obtidos apresentam características superiores às dos produtos originais. A utilização do PHB, substituindo plásticos petroquímicos, permite que o novo material seja 100% biodegradáveis e com potencial para ser utilizados em diversos segmentos, como na confecção de móveis ou até mesmo na indústria automotiva (LEAO et al., 2010).

2.2.7 Produção Industrial

Os polihidroxialcanoatos ganharam destaque nos últimos anos, tanto nas pesquisas laboratoriais quanto na produção industrial. No entanto, a produção em grande escala deste biopolímero se caracteriza por ter alto custo financeiro, sendo este o motivo de não estar sendo produzido extensivamente, uma vez que materiais poliméricos de origem petroquímica, como o polipropileno, podem chegar a ser cerca de 5 vezes mais baratos quando comparados ao PHB (CHANPRATEEP, 2010; BUGNICOURT et al., 2014).

Na produção industrial de PHA, o poliéster é extraído e purificado das bactérias através da otimização das condições de fermentação microbiana de açúcar ou glicose. Outra limitação da produção industrial de PHAs é a dificuldade em manter as condições de crescimento bacteriano, já que na maioria dos estudos o processo de síntese e acumulação do PHA ocorre muito cedo, diminuindo a produtividade do processo (GHOLAMI et al., 2016).

BUGNICOURT e colaboradores (2016) realizaram um levantamento dos polihidroxialcanoatos produzidos comercialmente em diversos países e demonstraram suas características físicas e mecânicas, inclusive o PHB produzido nos dias de hoje no Brasil. A seguir estão ilustradas a Figura 9 e Figura 10, utilizadas no trabalho citado.

Figura 8 – Polihidroxialcanoatos comerciais: nomes, produtor, origem e produto

Nome comercial	Empresa	País	Produto
Biomer	Biomer	Alemanha	Biomer P209 Biomer P226 Biomer P240
Minerv-PHA	Bio-on	Itália	MINERV-PHA™
Biogreen	Mitsubishi Gas	Japão	Biogreen
Biocycle	PHB Industrial	Brasil	BIOCYCLE 1000 BIOCYCLE 18BC-1 BIOCYCLE 189C-1 BIOCYCLE 189D-1
Ecogen	Tianan Biological Material Polyone	China	ENMAT Y1000 ENMAT Y1000P ENMAT Y3000 ENMAT Y3000P
Mirel	Metabolix	Estados Unidos	Mirel P4001 Mirel P4010 Mirel P5001 Mirel P5004 Mirel M2100 Mirel M2200 Mirel M4100
Nodax	P&G Chemicals	Estados Unidos/Japão	Nodax™
Metabolix	Telles LLC	Estados Unidos	Mvera™ B5011 Mvera™ B5010)
Jiangsu Nantian	Jiangsu Nantian Group	China	P(3HB)
Goodfellow	Goodfellow Cambridge Ltd.	Reino Unido	Polyhydroxyalkanoate – Biopolymer (PHA) Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxyvalerate 12% – Biopolymer (PHB88/PHV12)
Tepha [86]	Tepha Inc	Estados Unidos	P(4HB)

Fonte: (BUGNICOURT et al., 2014)

Figura 9 – Propriedades térmicas e mecânicas dos polihidroxicanoatos comerciais

Produtos	Propriedades Térmicas		Propriedades Mecânicas	
	Tm (°C)	Tg (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistência à Tração (MPa)
Biomer P209	–	–	0.84–1.20	15–20
Biomer P226	–	–	1.14–1.90	24–27
Biomer P240	–	–	~1.85	28
BIOCYCLE 1000	170–175	117	2.2 (Flex)	32
BIOCYCLE 18BC-1	165–170	117	2.4 (Flex)	25
BIOCYCLE 189C-1	165–170	121	2.6 (Flex)	30
BIOCYCLE 189D-1	165–170	125	3.8 (Flex)	36
ENMAT Y1000	170-176	–	2.8–3.5	39
Mirel P4001	–	110	1.90 (Flex)	20
Mirel P4010	–	–	1.45 (Flex)	10
Mirel P5001	–	–	0.30–0.32	20
Mirel P5004	170 170	–	0.3–0.4	25–30
Mirel M2100	165–170	–	–	–
Mirel M2200	160–170	–	–	–
Mirel M4100	164–166	–	–	–

Fonte: (BUGNICOURT et al., 2014)

As pesquisas relacionadas a produção do polihidroxicanoato no Brasil tiveram início na década de 90 e em 1996 o PHB começou a ser produzido em uma planta piloto na usina da Pedra, no município de Serrana – SP. A Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Copersucar) iniciou a produção de

PHB após uma importante parceria com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e com o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (DA SILVEIRA, 2017).

A empresa, chamada Biocycle®, é a responsável pela produção de PHB no Brasil, onde o biopolímero é produzido pela bactéria *Cupriavidus necator*, geneticamente modificada para o consumo de sacarose, uma vez que a linhagem desse microorganismo é incapaz de utilizar a sacarose como matéria fonte de carbono na produção de PHA (VELHO; VELHO, 2006).

A obtenção do PHB realizada em Serrana envolve duas fases, primeiro as bactérias são cultivadas em meio de cultura sem limitação de nutrientes necessários ao crescimento do microorganismo até que seja atingida a concentração celular desejada. Em seguida, ocorre a limitação de nutrientes essenciais para a bactéria, momento em que ocorre a síntese do PHB. Após esse processo, o PHB é extraído e purificado, utilizando-se um solvente orgânico (VELHO; VELHO, 2006).

2.3 Óleos Vegetais

A ANVISA caracteriza os Óleos e Gorduras Vegetais como produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécies vegetais. Podem conter pequenas quantidades de outros lipídeos como fosfolipídeos, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura (BRASIL, 2005).

Os óleos vegetais são compostos triglicerídeos que são líquidos à temperatura ambiente e insolúveis em água. Um triglicerídeo é um produto éster obtido a partir de uma molécula de glicerol e moléculas de ácidos graxos. Os ácidos graxos contribuem com 94-96 % do peso total dos triglicerídeos e os mais encontrados são os ácidos mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, linolênico, oléico, linoléico, eleosteárico, ricinoléico, entre outros (McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., 2010).

As propriedades físico-químicas de cada ácido graxo podem variar de acordo com as estruturas desses ácidos. Os ácidos graxos saturados não têm ligações duplas, por outro lado, os ácidos graxos insaturados possuem uma ou mais duplas ligações (conjugadas ou não). Entre os óleos ricos em triglicerídeos destacam os óleos de linhaça, girassol, mamona, soja, palma, entre diversos outros (BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A.; 2017).

No Brasil a prática de utilizar o óleo vegetal para fritar alimentos é amplamente disseminada e aceita. A fritura é um processo em que a temperatura do óleo varia entre 180 °C e 200 °C e o cozimento do alimento ocorre por transferência de calor, concedendo ao alimento frito novas características de sabor, cor, textura e principalmente palatabilidade (CORSINI et al., 2008).

As alterações termoxidativas e hidrolíticas sofridas pelo óleo durante a fritura depende de diversos parâmetros, como o tipo de óleo, tempo de fritura, temperatura do óleo, relação superfície/volume do óleo, características do alimento a ser frito, entre outros. Durante o processo de fritura ocorre grande variação na temperatura dos óleos, principal reação responsável pelas modificações das características organolépticas, físicas e químicas do óleo, que se torna escuro e viscoso, podendo desenvolver odor desagradável, denominado de ranço (COSTA NETO et al., 2000). A degradação do óleo durante o processo de fritura aumenta quanto maior for seu grau de insaturação e conforme o período de utilização do óleo (OSAWA, C.C.; GONÇALVES, L.A.G.; MENDES, 2010).

O aumento de temperatura e a presença de água nos alimentos aceleram a hidrólise dos triglicerídeos presentes nos óleos, causando um aumento no teor de ácidos graxos livres, o que acarreta na formação de dímeros, ácidos graxos polimerizados e compostos oxidados. Além de ocorrer a diminuição da quantidade de ácidos graxos insaturados e o aumento de compostos poliméricos e de substâncias polares (GERTZ, 2000; FREIRE; MANCINI-FILHO; FERREIRA, 2013).

Outro produto encontrado após a degradação peroxidativa de ácidos graxos é o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um aldeído insaturado extremamente reativo, que pode reagir com vários componentes do sistema biológico como proteínas e membranas celulares, acarretando na perda significativa de função de transportadores, enzimas, componentes sinalizadores, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto entre diversas outras perdas funcionais, sendo um composto citotóxico, mutagênico e carcinogênico (SAHIN; BARUTCU, 2012).

CSALLANY e colaboradores (2015) encontraram três compostos tóxicos relacionados à HNE (conhecidos como HHE, HOE e HDE) em óleo de fritura de 6 restaurantes, utilizados para fritura de batata, além destes alimentos terem absorvido o HNE. Este composto é incorporado nos alimentos fritos na mesma concentração que se forma no óleo aquecido, sendo que o aquecimento repetido se torna um risco ainda maior, uma vez que o HNE acumula com cada ciclo de aquecimento.

O grande problema ambiental ligado ao óleo residual de fritura ocorre devido ao descarte incorreto desse resíduo, que acabam por atingir lagos, represas, rios e corpos d'água, formando uma barreira na superfície da água que dificulta a entrada de luz, impossibilitando a oxigenação da água e comprometendo a base da cadeia alimentar aquática, causando desequilíbrio ambiental e desaparecimento dos animais que vivem nesses locais (YAAKOB et al., 2013).

O óleo vegetal utilizado em frituras por imersão vem se destacando como fonte abundante de matéria prima para diversos produtos e como se caracteriza como um resíduo usualmente de descarte incorreto, a preocupação ambiental leva a população e o governo a tomar medidas quanto sua reciclagem e destino corretos. Assim diversos programas de coleta vêm sendo implantados em todo território nacional (CORRO et al., 2016).

Muitos desses projetos para a coleta e reciclagem do óleo de fritura estão em andamento no Brasil, como o Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura da Sabesp, Programa de Coleta de Óleo de Fritura de Embu das Artes, Recóleo, RECOL, BIOPLANET, PRO-CREP (Projeto Criar, Reciclar, Educar E Preservar), ECO100, entre diversos outros, em que o resíduo tem diferentes destinos, dependendo do projeto, como a produção de ração animal, sabão, tintas a óleo, massa de vidraceiro e em sua grande maioria a produção de biodiesel (ZUCATTO; WELLE; SILVA, 2013). A Organização Não Governamental ECÓLEO, através de seus associados, coletam e destinam aproximadamente 2,7 milhões de litros de óleo residual por mês, na grande São Paulo. Atualmente a demanda é significativamente maior do que a capacidade de coleta e a organização estima que apenas 15 % do total do óleo de fritura usado sejam coletados por seus colaboradores (MAPA, 2014).

Os óleos vegetais são considerados entre as mais promissoras matérias-primas renováveis para biopolímeros, por conta da disponibilidade e biodegradabilidade inerente. A investigação sobre o desenvolvimento de materiais poliméricos a partir de óleos vegetais comercialmente disponíveis vem aumentando, visando um esforço para reduzir a dependência de polímeros convencionais a base de petróleo (MIAO et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

De acordo com diversos estudos, existe a possibilidade de uso de bactérias para converter biologicamente óleos de frituras usados em novos materiais bioplásticos. A fim de utilizar óleos residuais de fritura, as bactérias segregam lipases que catalisam a liberação de ácidos graxos, que são transportados para dentro das células e

catabolizados via o ciclo de β -oxidação, dando origem ao biopolímero (HASSAN et al., 2013; CIESIELSKI; MOŽEJKO; PISUTPAISAL, 2015).

Embora existam vários relatos na literatura de produção de PHAs utilizando óleos vegetais, deve-se atentar ao fato de que muitos desses óleos são comestíveis, portanto deveriam ter foco na alimentação humana e não na produção de novos materiais. Assim, os óleos residuais de fritura são matérias primas muito interessante para serem empregadas nesse processo, já que são descartados e não utilizados novamente na alimentação humana (CIESIELSKI; MOŽEJKO; PISUTPAISAL, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

As linhagens bacterianas *Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus megaterium* foram obtidas da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello em Campinas-SP, com o número de CCT7576 e CCT2478, respectivamente. Os experimentos de cultivo destes microrganismos utilizando óleos de fritura para a produção de PHA foram realizados no Laboratório de Bioprodutos do departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

As bactérias *P. oleovorans* e *B. megaterium* foram, primeiramente, cultivadas em meio nutriente ágar (NA), contendo peptona (5 g.L⁻¹), extrato de carne (3 g.L⁻¹) e ágar (20 g.L⁻¹) e acondicionadas em estufa a 30 °C.

3.1.1 Determinação das colônias bacterianas produtoras de PHA

Para determinar as colônias potencialmente produtoras de PHA foi realizado o teste com o corante Sudan Black B (SBB). As bactérias *P. oleovorans* e *B. megaterium* foram inoculadas, separadamente, em placas de petri contendo meio nutriente ágar, acondicionadas a 30 °C por 120 horas. Após este período, o corante foi transferido para as placas, agindo por 15 minutos, sendo, posteriormente, removido com etanol 96 %. A colônia que acumulou grânulos de PHA em suas células permaneceu com a coloração azul escuro, enquanto a colônia que não sintetizou o polímero foi descorada pela solução de etanol, voltando à cor clara (SCHLEGEL et al., 1970).

3.1.2 Preservação das linhagens bacterianas

As linhagens foram preservadas pelo método de liofilização seguido por congelamento em freezer a -80 °C (SILVA et al. 1992).

3.2 Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados no presente estudo estão descritos a seguir.

3.2.1 Meio nutriente ágar (NA)

Tabela 3 – Composição do meio de cultura Nutriente Ágar (NA)

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona	5
Extrato de carne	3
Ágar	20

Fonte: (MERCK, 1990)

3.2.2 Meio Mineral com limitação em nitrogênio (MM)

Tabela 4 – Composição do Meio Mineral limitante em nitrogênio (MM)

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Na ₂ HPO ₄	3,5
KH ₂ PO ₄	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Citrato férrico amoniacal 6% (m/v)	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O sol 20% (m/v)	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O sol 1% (m/v)	1,0
Solução de elementos traços*	1,0
Ágar (apenas para meio sólido)	20

*Solução de elementos traços:

H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,03
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,01

Fonte: (RAMSAY et al., 1990)

3.2.3 Meio Luria Bertani (LB)

Tabela 5 – Composição do meio de cultura Luria Bertani (LB)

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Triptona	10,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0

Fonte: Adaptado de (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)

3.2.4 Esterilização dos meios

Todos os meios de cultura utilizados no presente trabalho foram esterilizados por meio de autoclave, por 15 minutos a 121 °C.

3.3 Óleo vegetal como fonte de carbono

Um total de oito amostras de óleo de soja puro (OS), óleo residual de fritura de pastel (ORP), óleo residual de fritura de frango (ORF) e óleo residual de fritura de batata (ORB), todos nas concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹, foram testadas como principais fontes de carbono nos ensaios de acúmulo de PHA. Todas as amostras foram previamente esterilizadas em forno a 180 °C.

Para caracterizar as amostras de óleo vegetal utilizadas, diversas análises foram realizadas com o intuito de observar o estado de degradação após o processo de fritura. Com exceção do teor de compostos polares presentes nos óleos, os outros parâmetros foram medidos conforme as metodologias analíticas oficiais da American Oil Chemist's Society (AOCS).

3.3.1 Índice de peróxidos

Para a determinação do índice de peróxidos nos óleos vegetais utilizou-se o método AOCS cd 8-53, 1993, recomendada pelo Ministério Brasileiro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para cada amostra, 5 g de óleo foram diluídos em solução de ácido acético (3:2) e adicionada solução de iodeto de potássio saturada, seguida de titulação utilizando-se solução de tiosulfato de sódio 0,01 N.

O índice de peróxido foi determinado utilizando a fórmula descrita a seguir:

$$IP = \frac{[N \times (\text{mL de tiosulfato amostra} - \text{mL de tiosulfato branco}) \times 1000]}{P}$$

Onde: N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

P = peso da amostra

3.3.2 Teor de compostos polares totais (CPT)

Para a determinação dos CPT, utilizou-se o teste comercial OleoTest®.

Após adicionar o óleo quente (entre 60 °C e 80 °C) até o traço inferior indicado no rótulo do tubo, agitou-se o mesmo durante 60 segundos. Após dois minutos de descanso, o tubo de mistura foi comparado à tabela de cores, demonstrando o nível de compostos polares totais presentes na amostra.

3.3.3 Teor de ácidos graxos livres

A quantidade de ácidos graxos livres, expressa em % de ácido oléico, foi determinada utilizando-se o método AOCS Ca 5a-40, 2004, recomendada pelo MAPA. Alíquotas entre 1,0 e 2,0 g de óleo foram transferidas para erlenmeyer, adicionou-se entre 50 e 100 mL de álcool etílico 96 % e 2 mL de fenolftaleína 1 %. Titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 N até o aparecimento da cor rosa claro.

Para os cálculos do índice de acidez, expresso em % de ácidos graxos livres, aplicou-se a fórmula descrita a seguir:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{\text{volume gasto de NaOH} \times 0,1 \text{ N} \times 28,2}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Onde: 28,2 é um índice oriundo de amostra padrão de ácido oléico.

3.3.4 Composição dos ácidos graxos

O método AOCS Ce 2-66 foi utilizado para análise da composição dos ácidos graxos presentes em todas as amostras de óleos. As condições cromatográficas estão listadas a seguir:

- Cromatógrafo a gás GC 2010 plus Shimadzu/software GC solution.
- Coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropilpolisiloxana) de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno.
- Programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140 oC por 5 min. e então aquecimento a 4 °C/min até 240 oC, permanecendo nesta temperatura por 30 min.
- Temperatura do vaporizador: 250 oC.
- Temperatura de detector: 260 oC.
- Gás de arraste: Hélio (1 ml/min.).
- Razão de divisão da amostra: 1/200.

3.3.5 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV) se caracteriza por incidir um feixe monocromático coerente e colimado de radiação eletromagnética na amostra a ser analisada. Esta análise foi realizada no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), situado na Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP - Botucatu/SP, utilizando-se aproximadamente 1 gota de cada amostra de óleo vegetal em um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer modelo FTIR Frontier Single & Dual Range. O intervalo de medida foi entre 4000 e 450 cm⁻¹, resolução de 2 cm⁻¹, 100 varreduras. Para as medidas foi utilizado a técnica ATR (Attenuated Total Reflectance) em uma célula para fluidos.

3.4 Ensaios de produção de PHA em frascos agitados

Os microrganismos foram inoculados, separadamente, em frascos erlenmeyers (125 mL) contendo meio LB estéril, permanecendo em agitador rotativo, a 30 °C e 150 rpm, por 24 horas, produzindo o pré-inóculo.

Após esse período, 2,5 mL do pré-inóculo foram transferidos para 25 mL de MM limitante em nitrogênio e a fonte de carbono transferida assepticamente para o meio contendo MM e pré-inóculo. Novamente, os erlenmeyers foram incubados em agitador rotativo a 30 °C por mais 72 horas, a fim de promover síntese e acúmulo de PHA. Após as 72 horas, determinou-se o pH, massa seca celular (MSC), teor e composição do PHA acumulado.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinação do pH

Após centrifugação da cultura, o pH do sobrenadante foi determinado, em potenciômetro (Tecnal TEC-2) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0 (Synth). A análise do pH é realizada a fim de controlar os ensaios de produção de polihidroxialcanoatos, que devem permanecer com os valores de pH entre 6 e 8.

3.5.2 Determinação da massa seca celular (MSC)

Exatamente 10 mL da suspensão celular foram centrifugados (8000 rpm/10 minutos, 3 °C), suspendidos em solução de tween 0,1 % (m/v), novamente centrifugadas (10000 rpm/xg, 10 minutos, 10 °C) e filtrados através de membranas Millipore (0,45 µm). As membranas foram secas em estufa por 4 horas a 100 °C. Após secagem, permaneceram por 20 minutos no dessecador e então foi determinada a massa seca celular através da fórmula:

$$MS = (MMC - MM + UM) \times 1000 \text{ VOL}$$

Onde:

MMC = massa da membrana após a secagem (g)

MM = massa da membrana (g)

UM = umidade média do lote de membrana (g)

VOL = volume de suspensão centrifugada (mL)

3.5.3 Composição monomérica e quantificação do PHA

A quantidade expressa em porcentagem de massa seca celular (% MSC) e composição química do PHA foram determinadas por cromatografia gasosa de propil-ésteres (RISS; MAI, 1988). Aproximadamente 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos com 2 mL de solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de solução de ácido benzóico (40 g.L⁻¹) em propanol. Os tubos, hermeticamente fechados, foram submetidos à propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação em vórtex após os primeiros 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 4 mL de água destilada, agitando-os em vórtex por 30 segundos. Após esse período de repouso, a fase aquosa foi descartada e 1 µL do restante foi transferido para tubo vial e encaminhado para análise em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System, coluna HP-5 (5 % fenil-metil-siloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

- Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min);
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Temperatura do detector: 300 °C;
- Sistema de detecção: ionização de chama (FID)
- Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 200 °C a 8 °C/min e 185 °C por 15 minutos.
- Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno.

Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3-Hidroxibutirato (3HB), 3- Hidroxivalerato (3HV), 3-Hidroxihexanoato (3HHx), 3-Hidroxieptanoato (3HHp), 3- Hidroxioctanoato (3HO), 3-Hidroxinonanoato (3HN), 3-Hidroxidecanoato (3HD) e 3- Hidroxidodecanoato (3HDd).

3.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2x2. Sendo quatro tipos de óleo (óleo de soja puro; óleo de soja residual de fritura de pastel; óleo de soja residual de fritura de batata e óleo de soja residual de fritura de frango), 2 bactérias (*Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus megaterium*) e 2 concentrações dos óleos (10 g/l e 20 g/L).

Os dados de massa seca celular (MSC) e porcentagem de PHA foram submetidos a análise de variância, sendo complementados com teste de Tukey. Considerou-se significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um obstáculo encontrado durante o cultivo de bactérias foi a contaminação do meio de cultura nutritivo, que é suscetível ao ataque de outros microrganismos, principalmente fungos. Portanto, é fundamental que os ensaios de produção de PHA sejam realizados em ambiente asséptico e controlado. Apesar do cuidado, os ensaios foram repetidos três vezes, até o meio de cultura inoculado estar totalmente livre de microrganismos contaminantes.

Os experimentos de acúmulo de PHA utilizando o óleo residual de fritura de frango não obtiveram resultados positivos, sendo então retirado da análise estatística proposta inicialmente.

4.1 Determinação das colônias bacterianas produtoras de PHA

O corante Sudan Black B (SBB) é utilizado para detectar a presença de lipídios estruturais ou de reserva em diversos organismos, incluindo bactérias (HOROBIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2015). Os microrganismos produtores de PHA armazenam o polímero na forma de grânulos de lipídios intracelulares (GALIÀ, 2010). Sendo assim, as colônias bacterianas tingidas de azul escuro pelo corante SBB foram selecionadas como potenciais produtoras de polihidroxialcanoatos, enquanto as colônias não tingidas ou com coloração clara foram desconsideradas.

Ambas as linhagens, *P. oleovorans* e *B. megaterium*, apresentaram colônias tingidas de azul escuro, permitindo a utilização dessas bactérias nos ensaios de produção de PHA utilizando o óleo de soja como fonte de carbono.

4.2 Caracterização dos óleos vegetais

As amostras de óleos foram submetidas à análises de teor de compostos polares totais (CPT), teor de ácidos graxos livres e índice de peróxido, com o intuito de determinar o estado de degradação de cada óleo, que após ser utilizado diversas vezes no processo de fritura dos alimentos sofre mudanças físico-químicas e se torna inadequado para o consumo. Os resultados estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação da qualidade dos óleos vegetais como parâmetros limites para descarte

Amostras	Índice de peróxido (meq/kg)	Teor de compostos polares (%)	Teor de ácidos graxos livres (%)
OS	4,02	6-12	0,11
ORP	7,56	6-12	0,19
ORF	10,33	>24	2,12
ORB	11,78	17-23	0,89
Valores limites utilizados como referência	<10	<25	<0,9

OS: óleo de soja puro; ORP: óleo residual de fritura de pastel; ORF: óleo residual de fritura de frango; ORB: óleo residual de fritura de batata.

Na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 270, de 22 de setembro de 2005, a ANVISA determinou parâmetros quanto à qualidade dos óleos refinados, sendo que o índice de peróxidos deve apresentar valores de até 10 meq/kg (BRASIL, 2005).

Apesar de não existir uma lei no Brasil que determina todos os parâmetros da qualidade de óleos utilizados no processo de fritura, alguns países, como Alemanha, Bélgica, Holanda, Estados Unidos, Espanha, Suíça, França, Japão e Chile utilizam o teor de CPT para indicar a degradação do óleo de fritura, estabelecendo um teor máximo entre 24 e 27 %. No presente trabalho, o valor máximo de 24 % foi utilizado para determinar o estado de deterioração das amostras (FREIRE; MANCINI-FILHO; FERREIRA, 2013).

Os compostos polares dos óleos de fritura foram determinados pelo teste rápido comercial OleoTest®. BERTANHA e colaboradores (2009) determinaram que o teste rápido é uma ferramenta eficaz no monitoramento de óleos e gorduras, uma vez que os resultados apresentam alta confiabilidade e são métodos que permitem obter conclusões rápidas em relação ao momento necessário de descarte do óleo. Além disso, mais uma vantagem apresentada pelos testes rápidos é a pouca quantidade de amostra necessária para cada análise, que varia de 50 a 150 µL de óleo.

Outro parâmetro importante para caracterização dos óleos residuais é a quantidade de ácidos graxos livres presente nas amostras. Os valores limites para

esse parâmetro podem variar de 0,9 % a 2,5 %, dependendo da legislação de cada país. Neste trabalho considerou-se deterioradas as amostras que continham mais de 0,9 % de ácidos graxos livres. Na tabela 7 encontram-se os resultados da composição dos ácidos graxos em cada amostra de óleo após a análise por cromatografia gasosa.

Tabela 7 – Determinação dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleos

Ácidos graxos		OS	ORP	ORF	ORB
		(%)	(%)	(%)	(%)
C16:0	Palmítico	10,81 ± 0,10	10,87 ± 0,02	11,75 ± 0,03	11,69 ± 0,05
C16:1	Palmitoléico	—	—	—	0,35 ± 0,01
C18:0	Estearico	3,21 ± 0,08	3,20 ± 0,02	3,56 ± 0,01	3,37 ± 0,03
C18:1 (n-9)	Oléico	23,60 ± 0,27	23,92 ± 0,04	26,23 ± 0,08	24,69 ± 0,08
C18:1 (n-7)	Vacênico	2,10 ± 0,12	1,93 ± 0,01	2,11 ± 0,04	1,98 ± 0,04
C18:2 (n-6)	Linoleico	53,33 ± 0,47	53,19 ± 0,07	50,88 ± 0,15	51,35 ± 0,06
C20:0	Eicosanóico	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,31 ± 0,00
C20:1	Eicosenóico	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,42 ± 0,06	0,40 ± 0,01
C18:3 (n-3)	Linolênico	5,68 ± 0,45	5,57 ± 0,04	4,21 ± 0,07	5,22 ± 0,10
C22:0	Docosanóico	0,45 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,47 ± 0,03
C22:1	Erúcico	—	—	—	—
C24:0	Lignocérico	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,00	—	0,17 ± 0,01
C24:1	Nervônico	—	—	—	—
	Saturados	14,95 ± 0,18	15,05 ± 0,05	16,16 ± 0,05	16,01 ± 0,05
Totais	Monoinsaturados	26,04 ± 0,16	26,20 ± 0,05	28,75 ± 0,04	27,42 ± 0,10
	Polinsaturados	59,01 ± 0,02	58,75 ± 0,06	55,09 ± 0,08	56,57 ± 0,10

OS: óleo de soja puro; ORP: óleo residual de fritura de pastel; ORF: óleo residual de fritura de frango; ORB: óleo residual de fritura de batata.

Assim como esperado, após o processo de fritura, as amostras dos óleos residuais sofreram mudanças químicas e físicas que levaram a deterioração desse produto.

Além disso, quando comparado aos valores que foram encontrados no óleo de soja puro, o processo de fritura levou a uma diminuição na concentração dos ácidos graxos polinsaturados e por consequência um aumento proporcional dos ácidos graxos saturados (SANIBAL; MANCINI FILHO, 2004).

Segundo VERLINDEN et al. (2011), os ácidos graxos saturados aparentemente levam a um maior acúmulo de PHA quando comparados aos ácidos graxos insaturados. Dessa forma, os óleos vegetais, após o processo de fritura, podem se tornar uma potencial fonte de carbono para produção dos PHAs.

4.2.1 Óleo de soja puro

O OS apresentou todos os valores dentro dos parâmetros utilizados nesse trabalho para determinar a degradação dos óleos, demonstrando que está próprio para o consumo humano.

4.2.2 Óleo residual de fritura

A composição de ácidos graxos do óleo residual de fritura de pastel manteve-se semelhante ao óleo de soja puro (Tabela 4). Além disso, os outros parâmetros considerados estão dentro dos limites, demonstrando que essa amostra não se encontra em estado de degradação. Os demais óleos residuais de fritura, quando comparados com o óleo de soja puro, apresentaram valores mais elevados de ácidos graxos saturados, enquanto os valores de ácidos graxos polinsaturados foram reduzidos.

O óleo residual de fritura de frango, quando comparado ao OS apresentou uma redução de 4,59 % no valor encontrado de ácido linoléico (polinsaturado), um aumento de 11,19 % de ácido oléico (monoinsaturado), aumento de 8,69 % de ácido palmítico (saturado) e queda de 25,88 % de ácido linolênico (saturado), podendo ser observado uma mudança significativa nesta amostra de óleo. Além disso, em comparação aos parâmetros utilizados, os resultados estão muito acima dos valores utilizados mundialmente para determinar o estado de degradação do óleo, demonstrando que foi utilizado diversas vezes no processo de fritura e sua degradação.

O óleo residual de fritura de batata, comparado ao OS, apresentou redução de 3,71 % no valor de ácido linoléico (polinsaturado) e aumento de 4,66 % de ácido oleico (monoinsaturado), além do aumento de 8,14 % do ácido palmítico (saturado) e diminuição de 8,09 % de ácido linolênico (saturado). Assim, como no óleo residual de fritura de frango, foi observado o aumento do total de ácidos graxos saturados e a diminuição dos ácidos graxos polinsaturados, o que condiz com o processo de fritura pelo qual esse óleo foi submetido. Apesar do índice de peróxidos estar acima dos valores estabelecidos como parâmetro, o teor de ácidos graxos livres e dos compostos polares estão dentro dos parâmetros considerados, demonstrando que mesmo não estando completamente degradado, porém está próximo ao ponto de descarte.

4.3 Ensaio de produção de PHA em frascos agitados

Um aumento na quantidade de PHA produzido em meio contendo óleo de fritura era esperado devido ao aumento dos teores de ácidos graxos livres disponíveis nos óleos residuais.

Comparando todos os resultados da Tabela 5, nota-se que as amostras de óleo residual de fritura de batata, utilizadas como fonte de carbono para *B. megaterium*, atingiram os maiores valores de produção de PHA e MSC. Estes valores estão acima dos encontrados por GÓMEZ CARDOZO et al. (2016), que ao cultivar *B. megaterium*, em meio contendo óleo residual de fritura, encontraram 0,35 g.L⁻¹ de PHA.

Nos ensaios utilizando-se óleo residual de frango, nenhum microorganismo foi capaz de acumular PHA intracelularmente, mesmo essa amostra apresentando um teor de ácidos graxos disponíveis (2,12 %). Esse resultado negativo demonstra que, devido ao estágio avançado de degradação desse óleo, é possível que tenha ocorrido um grande acúmulo de HNE (4-hidroxi-2-nonenal), sendo possível que essa substância, amplamente conhecida pela característica mutagênica e citotóxica, tenha inibido o crescimento das bactérias e impossibilitado o acúmulo intracelular do biopolímero.

Apesar de ser um resultado negativo, é importante investigar o percentual de HNE que está presente nas amostras, afim de padronizar a quantidade limite em que os microorganismos conseguem se desenvolver na presença desta substância, uma vez que o ORB também deve apresentar certa quantidade de HNE, já que essa substância é produzida em todos os processos envolvendo fritura de alimentos com óleo vegetal.

Tabela 8 – Valores de massa seca celular (MSC) e teor de PHA (% MSC) atingidos utilizando-se 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ das amostras de óleos

	Amostras	MSC (g.L ⁻¹)	Média	Desvio padrão	PHA (% MSC)	Média	Desvio padrão
<i>B. megaterium</i> 10 g.L ⁻¹ óleo <u>Puro</u>	1a	2,50			0,16		
	1b	1,81	2,34	0,47	1,38	0,86	0,51
	1c	2,70			1,03		
<i>B. megaterium</i> 20 g.L ⁻¹ óleo <u>Puro</u>	2a	2,93			1,74		
	2b	2,66	2,65	0,34	1,22	1,09	0,66
	2c	2,35			0,3		
<i>P. oleovorans</i> 10 g.L ⁻¹ óleo <u>Puro</u>	3a	3,38			1,01		
	3b	1,81	2,5	0,75	0	0,77	0,61
	3b	2,30			1,29		
<i>P. oleovorans</i> 20 g.L ⁻¹ óleo <u>Puro</u>	4a	3,74			1,16		
	4b	2,46	2,71	0,84	0,79	0,71	0,45
	4c	1,94			0,17		
<i>B. megaterium</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Pastel</u>	5a	2,49			2,42		
	5b	3,88	2,95	0,8	1,38	1,63	0,63
	5c	2,48			1,1		
<i>B. megaterium</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Pastel</u>	6a	4,22			2,94		
	6b	1,39	2,87	1,29	1,36	2,45	0,88
	6c	3,00			3,06		
<i>P. oleovorans</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Pastel</u>	7a	2,79			1,12		
	7b	2,62	2,65	0,16	0,27	0,81	0,44
	7c	2,54			1,06		
<i>P. oleovorans</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Pastel</u>	8a	1,59			0,43		
	8b	2,75	2,37	0,65	1,13	0,52	0,53
	8c	2,77			0		
<i>B. megaterium</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Franço</u>	9a	1,82			0		
	9b	2,92	2,38	0,61	0	0	0
	9c	2,58			0		
<i>B. megaterium</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Franço</u>	10a	2,21			0		
	10b	2,81	2,35	0,38	0	0	0
	10c	2,02			0		
<i>P. oleovorans</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Franço</u>	11a	1,50			0		
	11b	1,62	1,84	0,45	0	0	0
	11c	2,38			0		
<i>P. oleovorans</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Franço</u>	12a	3,17			0		
	12b	2,57	3,05	0,44	0	0	0
	12c	3,42			0		
<i>B. megaterium</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Batata</u>	13a	1,06			2,15		
	13b	2,35	2,56	1,45	1,38	3,21	2,27
	13c	4,26			6,1		
<i>B. megaterium</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Batata</u>	14a	3,55			4,95		
	14b	3,93	4,03	0,71	13,03	7,49	4,34
	14c	4,61			4,5		
<i>P. oleovorans</i> 10 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Batata</u>	15a	2,38			1,32		
	15b	1,81	2	0,35	1,3	1,29	0,24
	15c	1,8			1,25		
<i>P. oleovorans</i> 20 g.L ⁻¹ óleosid. - <u>Batata</u>	16a	2,1			1,14		
	16b	3,74	3,16	0,85	1,85	1,06	0,75
	16c	3,65			0,19		

MSC: massa seca celular; PHA: polihidroxicanoatos. Números iguais representam as amostras realizadas em triplicatas. As letras diferentes representam a média da duplicata.

4.3.1 *Bacillus megaterium*

O microorganismo *B. megaterium* foi o primeiro microrganismo estudado quanto à produção de polihidroxialcanoatos (LEMOIGNE, 1926), e desde então diversas fontes de carbono já foram testadas na produção deste biopolímero, como sacarose, melado de cana-de-açúcar, algas vermelhas, entre diversos outros, atingindo diferentes rendimentos de PHA, podendo chegar até valores acima de 70 % (GOUDA et al., 2001; ASLIM et al., 2002; ALKOTAINI et al., 2016).

A utilização do óleo de soja puro e óleo residual de fritura de pastel tiveram valores aproximados de acúmulo de PHA, condizendo com o teor dos ácidos graxos livres disponíveis no óleo residual de pastel. É importante que os ácidos graxos estejam livres para as bactérias, como ocorreu nos ensaios utilizando o óleo residual de batata, em que se obteve um aumento na produção de PHA (0,89 %).

Porém, os resultados demonstram que os teores máximos de PHA alcançados, utilizando-se *B. megaterium* em óleo de soja puro e de fritura, estão abaixo da capacidade de produção desse microrganismo. No entanto, apesar da baixa concentração de PHA, os resultados demonstram que *B. megaterium* tem a capacidade de acumular esse biopolímero quando utilizado óleo vegetal como única fonte de carbono, confirmando a presença de lipases, enzimas responsáveis pela quebra dos triglicerídeos presentes nos óleos vegetais em ácidos graxos e glicerol, substâncias que serão utilizadas como precursores de PHA

O resultado positivo, embora baixo, e requer outras condições (temperaturas, concentrações de óleo, tempo de reação, etc) para melhorar o rendimento de acúmulo do biopolímero. Além disso, os óleos vegetais de fritura, que são considerados um problema ambiental grave, poderão ter um fim mais nobre, além da vantagem em utilizar esse óleo residual de fritura sem que tenha passado por qualquer tratamento prévio.

4.3.2 *Pseudomonas oleovorans*

Esse microorganismo é amplamente utilizado em trabalhos de acúmulo de PHA e alguns deles já utilizaram óleos vegetais como fonte de carbono, como SILVA et al. (2014), que encontraram 9 % de PHA e 2 g.L⁻¹ de biomassa seca utilizando uma linhagem de *P. oleovorans* e óleo de andiroba.

Em outro estudo, realizado por MATSURA et al. (2007), uma linhagem da bactéria *P. oleovorans* não foi capaz de produzir PHA utilizando óleo de soja, mesmo após apresentar resultado positivo para produção de lipases no teste de rodamina B, diferente dos resultados encontrados nesse trabalho, que conseguiu produzir PHA por *P. oleovorans* utilizando óleo vegetal como fonte de carbono.

Apesar das concentrações atingidas no presente trabalho não terem sido significativas, quando comparadas ao potencial desse microorganismos em acumular PHA intracelular, pode-se considerar o resultado como positivo, permitindo a investigação das condições ideais de acúmulo do polímero quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono na produção de PHA, uma vez que a *P. oleovorans* demonstrou ser capaz de utilizar esse substrato de baixo custo como fonte de carbono.

4.3.3 Composição monomérica dos PHAs produzidos

Os monômeros produzidos pela *P. oleovorans* estão de acordo os estudos já citados nesse trabalho, ou seja, a característica de produzir diferentes PHAmcl foi confirmada em todos os ensaios realizados (PARK et al., 2012).

Já o microorganismo *B. megaterium* tem a característica de produzir PHAscl (3HB), como encontrados no ensaio utilizando-se 10g/L de óleo residual de pastel como fonte de carbono. Porém, a produção de PHAmcl (3HHx, 3HO, 3HD e 3HDd) pelo gênero *Bacillus* é raramente relatado, não sendo comum a produção desses monômeros, mas que ocorreu em diversos ensaios, como descritos na Tabela 9 (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; PARK et al. 2012).

O resultado encontrado utilizando-se *B. megaterium* foi muito interessante, uma vez que permite observar a possibilidade de utilizar este microorganismo para produção tanto de PHA de cadeia curta como cadeia média, expandindo o leque de aplicação desta bactéria na produção dos PHAs.

Tabela 9 – Composição monomérica dos PHAs encontrados em ensaios contendo amostras de óleo como fonte de carbono

		3HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd
	1a	0,00	3,53	26,23	46,07	24,17
<i>B. megaterium</i>	1b	0,00	100	0,00	0,00	0,00
10 g.L⁻¹ óleo Puro	1c	0,00	7,82	24,87	44,02	23,30
	2a	0,00	4,50	27,96	47,42	20,12
<i>B. megaterium</i>	2b	97,80	2,21	0,00	0,00	0,00
20 g.L⁻¹ óleo Puro	2c	0,00	100	0,00	0,00	0,00
	3a	0,00	7,50	23,57	51,22	17,71
<i>P. oleovorans</i>	3b	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10 g.L⁻¹ óleo Puro						
	3c	0,00	8,29	20,57	71,15	0,00
	4a	0,00	8,12	25,08	66,80	0,00
<i>P. oleovorans</i>	4b	0,00	6,58	27,82	65,61	0,00
0 g.L⁻¹ óleo Puro						
	4c	0,00	9,24	31,11	59,66	0,00
	5a	97,00	2,97	0,00	0,00	0,00
<i>B. megaterium</i>	5b	97,75	2,21	0,00	0,00	0,00
10 g.L⁻¹ óleo resid. – Pastel						
	5c	0,00	100	0,00	0,00	0,00
	6a	0,00	5,49	26,94	45,88	21,71
<i>B. megaterium</i>	6b	0,00	100	0,00	0,00	0,00
20 g.L⁻¹ óleo resid. –Pastel	6c	0,00	100	0,00	0,00	0,00
	7a	0,00	10,86	20,43	50,72	17,96
<i>P. oleovorans</i>	7b	0,00	7,22	27,45	49,65	15,69
10 g.L⁻¹ óleo resid. – Pastel						
	7c	0,00	11,54	21,31	49,74	17,42
	8a	0,00	9,65	21,04	49,88	19,44
<i>P. oleovorans</i>	8b	0,00	9,38	20,42	49,67	20,51
20 g.L⁻¹ óleo resid. – Pastel						
	8c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	9a	91,88	7,97	0,00	0,00	0,00
<i>B. megaterium</i>	9b	0,00	5,83	22,37	48,45	23,36
10 g.L⁻¹ óleo resid. – Batata	9c	0,00	3,33	22,37	48,02	23,36
	10a	93,25	6,75	0,00	0,00	0,00
<i>B. megaterium</i>	10b	0,00	4,50	27,96	47,42	20,12
20 g.L⁻¹ óleo resid. – Batata	10c	0,00	6,92	27,40	46,30	19,40
	11a	0,00	8,12	25,09	66,80	0,00
<i>P. oleovorans</i>	11b	0,00	6,58	27,82	65,61	0,00
10 g.L⁻¹ óleo resid. – Batata	11c	0,00	9,24	31,11	59,66	0,00
	12a	0,00	6,38	26,49	67,13	0,00
<i>P. oleovorans</i>	12b	0,00	0,00	32,00	58,86	9,16
20 g.L⁻¹ óleo resid. – Batata	12c	0,00	7,37	24,67	67,97	0,00

3HB: 3-Hidroxibutirato; 3HHx: 3-Hidroxihexanoato; 3HO: 3-Hidroxioctanoato; 3HD: 3-Hidroxidecanoato; 3HDd: 3-Hidroxidodecanoato.

Números iguais representam as amostras em triplicatas realizadas. As letras diferentes representam a média da duplicata.

4.4 Extração dos biopolímeros

A reação de propanólise, utilizada para extrair o PHA produzido e possibilitar sua caracterização, pode estar relacionada com a baixa quantidade de PHA encontrada pela análise de cromatografia gasosa, já que o processo de extração utilizando solventes, como o 1,2-dicloreto, não produzem alta taxa de recuperação do PHA, uma vez que o uso de elevadas quantidades de solvente e altas temperaturas podem diminuir a massa molar do biopolímero, alterando suas propriedades. Assim, o resultado encontrado pode estar abaixo do que a bactéria realmente produziu (BERGER, et al. 1989).

Em razão disso, outros estudos estão sendo realizados a fim de melhorar a exposição do biopolímero, propondo diferentes métodos de separação do PHA e componentes da biomassa, como fracionamento centrífugo e seleção de enzimas para a lise celular.

Apesar disto, o uso de solventes (potencialmente capazes de destruir a morfologia natural dos grânulos de PHA) apresenta a grande vantagem de extrair biopolímeros com alto grau de pureza (>99 %), não degradando a cadeia polimérica e permitindo a caracterização fiel dos monômeros produzidos. Além de ser um método útil quando o biopolímero produzido tiver aplicações médicas, uma vez que elimina endotoxinas encontradas em algumas bactérias Gram negativas (ASENJO e SUK, 1986).

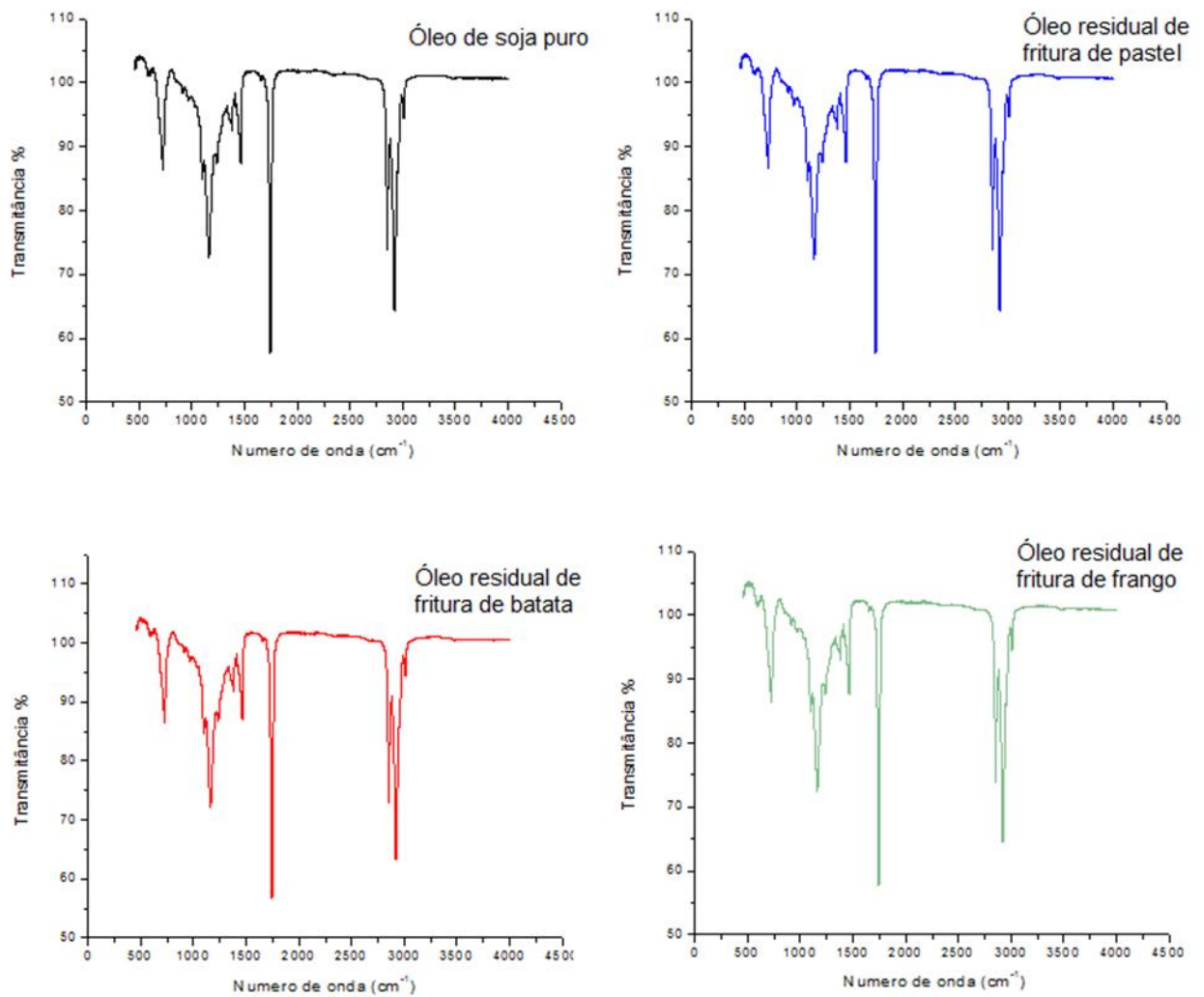
4.5 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho

A banda de absorção intensa que ocorre na região de 1740 cm^{-1} é própria de ésteres alifáticos saturados, características de triglicerídeos, e é decorrente das vibrações de deformação axial da ligação C=O (grupo carbonila) (GUZZATTO, 2014). A presença de outras bandas de absorção acentuadas, como nas regiões de 1099, 1156 e 1236 cm^{-1} , são atribuídas às vibrações de deformação axial da ligação C–O (SILVERSTEIN, et al., 1994).

Após determinar o alto de compostos polares existentes nos óleos residuais de fritura (substâncias relacionadas ao alto teor de degradação dos óleos), discutiu-se a possibilidade desses compostos, ao invés de serem substâncias potencialmente tóxicas, serem moléculas de água presente nas amostras. A análise do infravermelho permitiu descartar essa possibilidade, uma vez que em nenhuma das

amostras o pico de hidroxila (em torno de 3600 cm^{-1}) está presente (SILVA et al., 1999).

Figura 10 – Espectro do Infravermelho para amostras de óleo de soja puro, óleo residual de fritura de pastel, batata e frango.



4.6 Análise estatística

Após a análise estatística, foi possível observar que os valores de massa seca celular não apresentaram diferença significativa quando as variáveis utilizadas foram

comparadas entre si (Tabela 10), ou seja, nenhum dos ensaios apresentou resultados superiores.

Tabela 10 – Análise de Variância para Massa Seca Celular

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	F	P
Tipo de óleo	2	1.4842	0.7421	1.05	0.367
Bactéria	1	0.0005	0.0005	0.00	0.980
Porcentagem de óleo	1	0.0812	0.0812	0.11	0.738
Tipo de óleo*Bactéria	2	0.8554	0.4277	0.60	0.555
Tipo de óleo*Porcentagem de óleo	2	0.4591	0.2296	0.32	0.727
Bactéria*Porcentagem de óleo	1	0.4247	0.4247	0.60	0.447
Tipo de óleo*Bactéria*	2	0.7653	0.3827	0.54	0.590
Porcentagem de óleo					
Error	24	17.0151	0.7090		
Total	35				

GL: grau de liberdade; SQ (Aj.): Soma quadrada ajustada; QM (Aj.): quadrado médio ajustado; F: estatística F; P: valor.

Em relação a porcentagem de PHA, houve diferença significativa apenas entre os tipos de óleo, como pode ser observado na Tabela 11, sendo que óleo residual de fritura de pastel e óleo de soja puro não demonstraram diferença significativa (Tabela 12) e o óleo residual de fritura de batata, independentemente do tipo de bactéria ou concentração de óleo, demonstrou aumento significativo nos valores de PHA, como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 11 – Análise de Variância para Porcentagem de PHA

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	F	P
Tipo de óleo	2	97.004	48.502	11.20	0.0001
Bactéria	1	1.651	1.651	0.38	0.543
Porcentagem de óleo	1	10.769	10.769	2.49	0.128
Tipo de óleo*Bactéria	2	3.628	1.814	0.42	0.663
Tipo de óleo*Porcentagem de óleo	2	10.848	5.424	1.25	0.304
Bactéria*Porcentagem de óleo	1	4.995	4.995	1.15	0.294
Tipo de óleo*Bactéria*	2	4.712	2.356	0.54	0.587
Porcentagem de óleo					
Error	24	103.979	4.332		
Total	35				

GL: grau de liberdade; SQ (Aj.): Soma quadrada ajustada; QM (Aj.): quadrado médio ajustado; F: estatística F; P: valor.

Tabela 12 – Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 95%

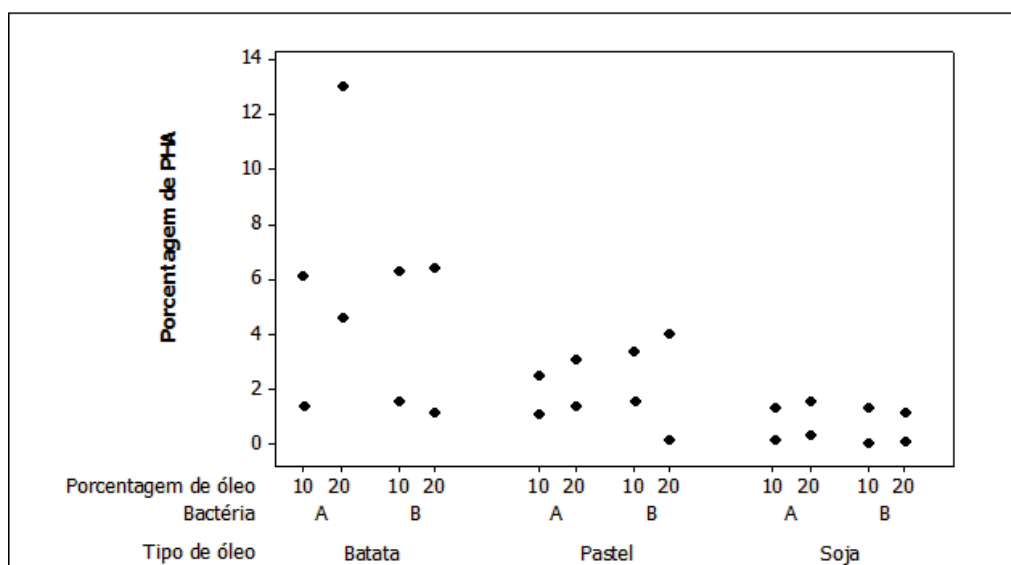
Tipo de óleo	N	Média	Agrupamento
Batata	12	4.8	A
Pastel	12	2.2	B
Soja	12	0.9	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

No gráfico 3, representando a porcentagem de PHA, é possível observar que o óleo de soja puro, mesmo tendo valores muito pequenos de acúmulo de PHA, apresentou uma dispersão uniforme dos resultados, diferente dos alcançados utilizando-se óleo residual de batata, que apesar de serem os valores mais altos encontrados, tiveram uma grande variação desses resultados quando a concentração do óleo utilizada foi de 20 g.L⁻¹.

Porém, neste trabalho, alcançar os valores mais elevados de acúmulo de PHA é mais relevante quando comparado a uniformidade dos resultados, uma vez que o objetivo foi avaliar a capacidade dos microorganismos em utilizar óleo de fritura para produzir o biopolímero, sendo um próximo passo analisar como manter a constância dos resultados. Portanto o óleo residual de fritura de batata se mostrou superior aos demais.

Figura 11 – Porcentagem de PHA alcançada utilizando-se óleo residual de fritura de batata, pastel e óleo de soja puro.



5 CONCLUSÃO

- Óleos residuais de fritura podem ser empregados como fonte de carbono para a produção de PHA quando os microorganismos *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas oleovorans* são utilizados.
- O microorganismo *B. megaterium* se mostrou promissor para futuros estudos utilizando óleos residuais de fritura de batata como fonte de carbono na produção de PHA pois obteve maior rendimento (13,03%).
- *P. oleovorans* alcançou valores baixos utilizando os óleos no processo de acúmulo do biopolímero.
- As amostras de óleos de fritura de frango se mostraram inviáveis para serem utilizadas como fonte de carbono na produção de PHA, possivelmente se tornando tóxicas para os microorganismos em função da possível presença de HNE e outros compostos polares potencialmente tóxicos para as bactérias.
- Quanto maior o grau de degradação dos óleos residuais, mais ácidos graxos livres (AGL) estão presentes nas amostras e maior é o acúmulo de PHA, uma vez que os microorganismos utilizam os AGL para produção do biopolímero. Porém é necessário avaliar qual o limite de degradação desses óleos antes de se tornarem tóxicos para os microorganismos.
- *B. megaterium* produziu PHA de cadeia média, contrário aos estudos anteriores, aumentando a possibilidade de utilização desse microorganismo na substituição de plásticos petroquímicos com diferentes características, instigando assim novos estudos para obtenção de PHA de cadeia média a partir de *B. megaterium*.

REFERÊNCIAS

ABIOVE - Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais. **Estatística Mensal do Complexo Soja**. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>> Acesso em: 20 fev. 2017.

AESCHELMANN, F.; CARUS, M. Biobased Building Blocks and Polymers in the World: Capacities, Production, and Applications—Status Quo and Trends Towards 2020. **Industrial Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 154–159, 2015.

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of Polyhydroxyalkanoates: The Future Green Materials of Choice. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732–743, 23 abr. 2010.

ALKOTAINI, B.; KOO, H.; KIM, B. S. Production Of Polyhydroxyalkanoates By Batch And Fed-Batch Cultivations of *Bacillus Megaterium* from Acid-Treated Red Algae. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 5, p. 1669–1673, 4 maio 2016.

AMARA, A. A. A. F. Polyhydroxyalkanoates: from Basic Research and Molecular Biology to Application. **IUM Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 37–73, 2008.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450–472, 1990.

ANJUM, A. et al. Microbial Production Of Polyhydroxyalkanoates (Phas) and Its Copolymers: A Review of Recent Advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 5. ed. Champaign, v. 1-2, 1998.

ASENJO, J. A.; SUK, J. S. Microbial Conversion os Methane into Poly-b-hydroxybutirate (PHB): Growth and Intracellular Product Accumulation in Type Methanoph. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, p. 271-278, 1986.

ASHTER, S. A. Overview of Biodegradable Polymers. In: **Introduction to Bioplastics Engineering**. [s.l.] Elsevier, p. 19–30, 2016..

ASTM D883-00, Standard Terminology Relating to Plastics, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000, www.astm.org

ASLIM, B.; YÜKSEKDAĞ, Z. N.; BEYATLI, Y. Determination of PHB Growth Quantities of Certain *Bacillus* Species Isolated from Soil. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, n. 6, p. 24–30, 2002.

BAPTIST, J. N.; ZIEGLER, J. B. **Method of Making Absorbable Surgical Sutures from Poly Beta Hydroxy Acids**. Google Patents, 28 dez. 1965. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US3225766>>

BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.

BASKARAN, M. et al. Influence of Steam Treatment on the Properties of Particleboard Made from Oil Palm Trunk with Addition of Polyhydroxyalkanoates. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 334–341, 2013.

BERGER, E.; RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. PHB Recovery by Hypochlorite Digestion of Non-PHB Biomass. **Biotechnology Techniques**, v. 3, p. 227-232, 1989.

BERTANHA, B. J., SANTOS, A. B., LUIZA, D. M. M., JORGE, N. Avaliação da Qualidade de Óleos e Gorduras de Fritura por Meio de Testes Rápidos. **Higiene Alimentar**, v. 23, p.177-82, 2009.

BOTHAM, K. B.; MAYES, P. A. Lipídeos de Importância Fisiológica. In: RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WELL, P. A. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 2017, cap. 21. p.211-222.

BRANDL, H.; PÜCHNER, P. The Degradation of Shampoo Bottles in a Lake. In: DAWES, E. A. (Ed.). **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 421–422, 1990.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “**Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**” Órgão emissor: ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao-por-categoria-de-produto> >. Acesso em: 10 jan. 2017.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 127–139, 2011.

BUGNICOURT, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of Synthesis, Characteristics, Processing and Potential Applications in Packaging. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.

CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M.; LEO, A. L. . Compósitos Biodegradáveis de Polihidroxibutirato (PHB) Reforçado com Farinha de Madeira: Propriedades e Degradação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n.6, p. 1609-1614, 2002.

CÉSAR, A. DA S. et al. The Potential of Waste Cooking Oil as Supply for the Brazilian Biodiesel Chain. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 246–253, 2017.

CHANPRATEEP, S. Current Trends in Biodegradable Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010.

CHEN, G. Q. A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434, 2009.

CHEN, G. Q. et al. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 565–574, 2015.

COELHO, N. S.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M. A Biodegradabilidade da Blenda de Poli(β -Hidroxibutirato-co-Valerato)/amido Anfótero na Presença de Microrganismos. **Polímeros**, v. 18, n. 3, set. 2008.

CORRO, G. et al. Biodiesel Production from Waste Frying Oil Using Waste Animal Bone and Solar Heat. **Waste Management**, v. 47, p. 105–113, jan. 2016.

CORSINI, M. D. S. et al. Perfil de Ácidos Graxos e Avaliação da Alteração em Óleos de Fritura. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 956–961, 2008.

COSTA NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.

CSALLANY, A. S.; HAN, I.; SHOEMAN, D. W.; CHEN, C.; YUAN, J. 4hydroxynonanal (HNE), a Toxic Aldehyde in French Fries from Fast Food Restaurants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 10, p. 1413-1419, 2015.

DA SILVEIRA, E. Útil, sem poluir: Plástico de Cana-de-açúcar Degrada-se no Meio Ambiente em Um Ano, Graças à Ação das Bactérias Usadas em Sua Produção. **Revista FAPESP**, n. 252, 2017.

DIAZ SILVARREY, L. S.; PHAN, A. N. Kinetic Study of Municipal Plastic Waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 37, p. 16352–16364, 2016.

DOI, Y. et al. No Title. **Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications**, v. 8, n. 12, p. 631–635, dez. 1987.

FECHINE, G. J. M. Polímeros Biodegradáveis. In: **Polímeros biodegradáveis: Tipos, Mecanismos, Normas e Mercado Mundial**. São Paulo, 2013. Cap.1, p.13-38.

FINDLAY, R. H.; WHITE, D. C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 71–78, 1983.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros Biodegradáveis - Uma Solução Parcial para Diminuir a Quantidade dos Resíduos Plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, jul. 2006.

FREIRE, P. C. M.; MANCINI-FILHO, J.; FERREIRA, T. A. P. DE C. Principais Alterações Físico-Químicas em Óleos e Gorduras Submetidos ao Processo de Fritura por Imersão: Regulamentação e Efeitos na Saúde. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 3, p. 353–358, 2013.

GALIÀ, M. B. Isolation and Analysis of Storage Compounds. In: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**; Timmis, K.N., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; p. 3725–3741.

GAO, X. et al. Polyhydroxyalkanoates as a Source of Chemicals, Polymers, and Biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 768–774, 2011.

GHOLAMI, A. et al. Industrial Production of Polyhydroxyalkanoates by Bacteria: Opportunities and Challenges. **Minerva Biotecnologia**, v. 28, p. 59–74, 2016.

GÓMEZ CARDOZO, J. R. et al. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias, **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v.17, p. 24-29, 1997

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de Poliésteres Bacterianos. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**, São Paulo, v. 3, p. 219-248, 2001.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* Strain Using Sugarcane Molasses and Corn Steep Liquor as Sole Carbon and Nitrogen Sources. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 201–207, 2001.

HAMMOND, T.; LIGGAT, J. J. Properties and Applications of Bacterially Derived Polyhydroxyalkanoates. In: **Degradable Polymers**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 88–111, 1995.

HASSAN, M. A. et al. Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Oil-Palm Biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 50, p. 1–9, 2013.

JIANG, L.; ZHANG, J. Biodegradable and Biobased Polymers. In: **Applied Plastics Engineering Handbook**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 127–143.

KAWAGUCHI, H. et al. Bioprocessing of Bio-Based Chemicals Produced from Lignocellulosic Feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 30–39, 2016.

KAZMER, D. Design of Plastic Parts. In: **Applied Plastics Engineering Handbook**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 593–615.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Industrial Production of Polyhydroxyalkanoates by Bacteria: Opportunities and Challenges. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KHARDENAVIS, A. A. et al. Biotechnological Conversion of Agro-Industrial Wastewaters into Biodegradable Plastic, Poly β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, V. 98, N. 18, P. 3579–3584, 2007.

KIM, B. S. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) from Inexpensive Substrates. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 2, p. 125–130, 2013.

KUMAR, M.; GUPTA, A.; THAKUR, I. S. Carbon Dioxide Sequestration by Chemolithotrophic Oleaginous Bacteria for Production and Optimization of Polyhydroxyalkanoate. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 249–256, 2016.

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and Recovery of Microbial Polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.

LEAO, A. L. et al. Agro-Based Biocomposites for Industrial Applications. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 522, n. 1, p. 318-327, 2010.

LEE, S. Y. Bacterial Poly β -hydroxybutyrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, p. 1–14, 1996.

LEMOIGNE, M. Produit de Déshydratation et de Polymérisation de l'acid β -oxybutyrique. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**, v.8, p.770-782, 1926.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2005.

LEONG, Y. K. et al. Preliminary Integrated Economic and Environmental Analysis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Biosynthesis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 41, 2016.

LUENGO, J. M. et al. Bioplastics from Microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251–260, 2003.

MACHADO, M. L. C. et al. Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/pó de Madeira. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 65–71, 2010.

MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. **Journal of General Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 210–222, 1958.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 2010. Cap.3, p. 131-178.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to Plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Benefícios ambientais da produção e do uso do biodiesel. Brasília. 2014. 36p.

MENG, D. C. et al. Engineering the Diversity of Polyesters. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p. 24–33, 2014.

MIAO, S. et al. Vegetable-oil-based Polymers as future Polymeric Biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1692–1704, 2014.

MORGAN-MARTINS, M. I. et al. Reciclo-oil: the Cooking Oil in Soap Ecological, an Environmental Education Project. **Cinergis**, v. 17, n. 4, p. 301–306, 2016.

MOŽEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016.

OJUMU, T.; YU, J.; SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a Bacterial Biodegradable Polymers. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 18–24, 2004.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; MENDES, F. M. Avaliação dos Óleos e Gorduras de Fritura de Estabelecimentos Comerciais da Cidade de Campinas/SP. As Boas Práticas de Fritura Estão Sendo Atendidas? **Alimentos e Nutrição**, v. 21, p. 47–55, 2010.

PANADARE, D. C.; RATHOD, V. K. Applications of Waste Cooking Oil Other Than Biodiesel: A Review. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 12, n. 3, p. 55–76, 2015.

PARK, S. J. et al. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates Containing 2-hydroxybutyrate from Unrelated Carbon Source by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 273–283, 14 jan. 2012.

PODZOROVA, M. V. et al. Thermal Oxidation and Structure of Polylactide – Polyethylene Blends. **Russian Journal of Physical Chemistry B**, v. 10, n. 5, p. 825–829, 2016.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. São Paulo: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006. Relatório Técnico nº 84 396-205.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of Poly(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7 p. 2093-2098, 1990.

RAO, M. N.; SULTANA, R.; KOTA, S. H. Plastic Waste. In: **Solid and Hazardous Waste Management**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 121–126.

REHM, B. H. A. Polyester Synthases: Natural Catalysts for Plastics. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, p. 15–33, 2003.

REHM, B. H. A. Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 28 ago. 2010.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and Genetic Analysis of PHA Synthases and Other Proteins Required for PHA Synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1, p. 3–19, 1999.

ROCHA, D. B.; ROSA, D. S. Biodegradable composites: Properties and uses. In: Polímeros biodegradáveis. In: **Handbook of composites from renewable materials, biodegradable materials**. 2017. Cap.8, p. 215-250.

RODRIGUES, J. A. F. R.; PARRA, D. F.; LUGÃO, A. B. Crystallization on Films of PHB/PEG blends. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 2, p. 379–381, jan. 2005.

SABESP. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. **Notícias**. Disponível em: < <http://site.sabesp.com.br/site/imprensa/noticias-detalle.aspx?secaold=65&id=5228>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

SAHİN, S.; BARUTCU, I. Frying of Foods. In: **Handbook of Food Safety Engineering**. 2011. Cap. 17, p. 412-443

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Perfil de Ácidos Graxos Trans de Óleo e Gordura Hidrogenada de Soja no Processo de Fritura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 27–31, 2004.

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of Mutants not Accumulating poly- β -hydroxybutyric Acid. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 71, n. 3, p. 283–294, 1970.

SHRIVASTAV, A.; KIM, H. Y.; KIM, Y. R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

SILVA, D. A. DA et al. Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate by *Pseudomonas oleovorans* Grown in Sugary Cassava Extract Supplemented with Andiroba Oil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 4, p. 738–745, 2014.

SILVA, L. F.; GOMES, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. Freeze-drying of Industrial Yeast Strains: Influence of Growth Conditions Cooling Rates and Suspending Media on the Viability of Recovered Cells. **Revista de microbiologia**, v. 23, p. 117-122, 1992.

STEINBÜCHEL, A. PHB and Other Polyhydroxyalkanoic Acids. **Biotechnology Set**. p. 403–464, 1996

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other Biological Systems for Polyester Production. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 10, p. 419–427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 3, p. 219–228, 1995

STUBBE, J. et al. Nontemplate Dependent Polymerization Processes: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a. v. 3, 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.

SURIYAMONGKOL, P. et al. Biotechnological Approaches for the Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms and Plants — A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148–175, 2007.

TAN, D.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Production of Polyhydroxyalkanoates. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 655–692.

TSUGE, T. Metabolic Improvements and Use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 579–584, 2002.

VALAPPIL, S. P. et al. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive Bacteria: Insights from the Genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 1–17, 2007.

VELHO, L.; VELHO, P. The Development of a Sugar-Based Plastic in Brazil: The Role of Government Schemes in Fostering Public Sector Research-Industry Relations. In: **Technology Transfer Society Conference**, 2006, Atlanta: Georgia, USA, 2006.

VERLINDEN, R. A. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates from Waste Frying Oil by *Cupriavidus necator*. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 11, 2011.

WU, Q.; WANG, Y.; CHEN, G. Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1–12, 11 jan. 2009.

YAAKOB, Z. et al. Overview of the Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 184–193, 2013.

ZHANG, C. et al. Recent Advances in Vegetable Oil-Based Polymers and their Composites. **Progress in Polymer Science**, 2017.

ZUCATTO, L. C.; WELLE, I.; SILVA, T. N. DA. Cadeia Reversa do Óleo de Cozinha: coordenação, Estrutura e Aspectos Relacionais. **Revista de Administração de Empresas**, v. 53, n. 5, p. 442–453, 2013.

