



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pré-tratamento de Óleo Residual de Fritura Utilizando Lipase de *Aspergillus niger* em meio ultrassônico

Jéssica Mulinari¹, Thamarys Scapini¹, Daiane P. Baldissarelli¹, Camila Dalla Rosa¹,
Tatiani A. Modkovski¹, Aline F. Camargo¹, Bruno Venturin¹, Camila T. Marques¹,
Simone M. Golunski¹, Gean D. L. P.Vargas¹, Helen Treichel¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul
Caixa Postal 764 – 54-3321-7050 Erechim – RS - E-mail: helentreichel@gmail.com

RESUMO

*Buscar técnicas de pré-tratamento do óleo residual de fritura é muito importante, pois grande parte dele acaba contaminando corpos hídricos e solo. O objetivo deste estudo foi avaliar a hidrólise em ultrassom do óleo usado na cantina da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim, utilizando lipase de *Aspergillus niger*. Para isso, determinou-se a melhor condição de temperatura e frequência ultrassônica através de planejamento experimental e realizou-se uma cinética para estabelecer o melhor tempo reacional. Posteriormente, avaliou-se a hidrólise do óleo, variando a relação óleo:água e a quantidade de enzima. A lipase foi então imobilizada em alginato de cálcio e carvão ativado, sendo a enzima imobilizada testada na reação de hidrólise. O melhor tempo reacional foi 12 horas, utilizando 15% de lipase, relação óleo:água de 1:3, 45°C e frequência ultrassônica de 50%, obtendo-se 62,7 µmol/mL de ácidos graxos livres. Utilizando a lipase imobilizada houve uma conversão de apenas 6,93 µmol/mL.*

Palavras-chave: Óleo residual, Hidrólise, Lipase, *Aspergillus niger*.

INTRODUÇÃO

O óleo residual de fritura quando não pode mais ser utilizado, acaba, na maioria das vezes, sendo descartado de forma inadequada. Quando descartado junto aos resíduos domésticos, vai para aterros sanitários, onde o excesso de óleo faz com que ocorra um atraso considerável na decomposição dos resíduos. Isso porque o óleo exige enzimas especiais para a sua decomposição completa, as lipases, que, muitas vezes, não são sintetizadas pelos microrganismos decompositores na quantidade necessária para degradar todo o óleo presente nos resíduos (PINTO-COELHO, 2009).

Assim, os impactos negativos dos óleos residuais podem ser minimizados pela utilização de enzimas microbianas hidrolíticas como a lipase. A pré-hidrólise do óleo pela lipase melhora a eficiência de remoção e acelera o processo de degradação (KUMAR et al., 2012). Desse modo, este estudo teve como objetivo a realização de testes preliminares utilizando lipase de *Aspergillus niger* na catálise da reação de hidrólise do óleo em meio ultrassônico. A enzima utilizada foi produzida através de fermentação em estado sólido utilizando como substrato torta de canola, e foi testada em extrato livre e imobilizada. O óleo foi obtido junto à cantina da Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Erechim - RS.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

A lipase utilizada foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e torta de canola como substrato, em condições controladas de temperatura (27°C), umidade (60% m/m) e nitrogênio (2% m/m) em 48 horas de fermentação (SBARDELOTTO et al., 2014).

A hidrólise do óleo foi avaliada em termos de liberação de ácidos graxos livres. Os testes foram feitos em meio ultrassônico a 45°C e 50% de potência ultrassônica (GOLUNSKI, 2015) com o auxílio de um agitador mecânico para promover a mistura da solução. Foram avaliadas a concentração de lipase (2,93 - 17,07%) e a relação óleo:água (1:2,17 - 1:7,83) através de um planejamento experimental. Preliminarmente à realização do planejamento foi efetuada uma cinética em condições fixas (relação óleo:água de 1:5 e 10% (v/v) de lipase) para determinar o tempo de reação a fim de promover uma maior liberação de ácidos graxos livres, sendo os tempos testados de 4, 8 e 12 horas.

Para determinar a quantidade de ácidos graxos livres produzidos em cada reação foram retirados 10 mL do meio reacional, aos quais foram adicionados 10 mL de solução acetona:etanol (1:1) para cessar a reação. Os ácidos graxos livres foram titulados com NaOH 0,02M até pH 11 (FREIRE et al., 1997).

Além da lipase em extrato bruto, testou-se a lipase imobilizada em alginato de sódio e carvão ativado na melhor condição estabelecida pelo planejamento experimental para a hidrólise do óleo. A imobilização da enzima lipase foi realizada conforme o trabalho de Munaretto, 2011.

Testes preliminares a fim de determinar o melhor tempo reacional foram realizados em condições fixas através de uma cinética nos tempos de 20, 30, 40, 50 e 60 min. Os resultados foram expressos em termos de unidade de atividade hidrolítica (U), definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto nas condições da reação. Após a definição do tempo de reação através da cinética, as concentrações de alginato de sódio (2 - 8%), carvão ativado (3 - 7%) e glutaraldeído (5 - 15%), foram avaliadas através de um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tempo que promoveu uma maior hidrólise do óleo residual foi o de 12 horas, sendo então utilizado para os demais testes. A Tabela 1 expressa os resultados obtidos em termos de quantidade de ácidos graxos livres gerados após a hidrólise para o planejamento experimental.

Verifica-se que a maior quantidade de ácidos graxos livres (62,67 $\mu\text{mol/mL}$) foi gerada no ensaio 3 com as condições de 1:3 (óleo:água) e 15% de enzima. A relação óleo:água de 1:3 condiz com os resultados do estudo de Merçon et al. (1996), que obtiveram uma proporção óleo:água ótima de 1:3 a 1:1,6 para a hidrólise de óleo de babaçu utilizando lipase de *Mucor miehei* e *Candida cylindracea*. No entanto, na maioria dos estudos envolvendo hidrólise enzimática de óleos, foram obtidos valores maiores para o teor de água, como o de Cavalheiro (2013) que obteve uma relação óleo:água de 1:21 para a hidrólise de óleo de canola utilizando lipases combinadas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*. Esses valores maiores para a quantidade de água devem-se ao fato de as reações não serem realizadas em meio ultrassônico. Segundo Gonçalves et al. (2012), o uso de ultrassom



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

faz com que a área da interface óleo-água aumente, o que resulta em altas taxas de conversão de triglicerídeos a ácidos graxos livres mesmo em ambientes com menos água.

Tabela 1 - Resultados do planejamento experimental realizado a fim de avaliar a hidrólise do óleo residual de fritura utilizando lipase de *Aspergillus niger*.

Ensaio	Óleo : água	Concentração de lipase (%)	AGL (μmol/mL)
1	-1	-1	28,60
2	+1	-1	23,85
3	-1	+1	62,67
4	+1	+1	36,84
5	-1,41	0	43,20
6	+1,41	0	34,50
7	0	-1,41	24,70
8	0	+1,41	54,60
9	0	0	44,92
10	0	0	43,50
11	0	0	43,97

A fim de avaliar a imobilização da lipase de *Aspergillus niger*, determinou-se o tempo reacional ótimo através de uma cinética (20, 30, 40, 50, 60 min), onde o melhor tempo foi o de 30 minutos, sendo então utilizado nos demais testes.

Sabendo o tempo reacional, realizou-se o planejamento experimental a fim de otimizar a imobilização da enzima Lipase, onde os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental realizado a fim de otimizar a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em alginato de sódio e carvão ativado.

Ensaio	Alginato de sódio (%m/v)	Glutaraldeído (%v/v)	Carvão ativado (%m/v)	Atividade enzimática (U/g)
1	-1 (2)	-1 (5)	-1 (3)	5,54
2	+1 (8)	-1 (5)	-1 (3)	3,82
3	-1 (2)	+1 (15)	-1 (3)	0,00
4	+1 (8)	+1 (15)	-1 (3)	0,00
5	-1 (2)	-1 (5)	+1 (7)	1,23
6	+1 (8)	-1 (5)	+1 (7)	1,23
7	-1 (2)	+1 (15)	+1 (7)	0,00
8	+1 (8)	+1 (15)	+1 (7)	0,00
9	0 (5)	0 (10)	0 (5)	0,37
10	0 (5)	0 (10)	0 (5)	0,74
11	0 (5)	0 (10)	0 (5)	0,62
Extrato bruto				16,44

Com base nos resultados da Tabela 2, verifica-se que o maior valor de atividade da lipase imobilizada foi obtido nas menores concentrações de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado, sendo de 5,54 U/g. Entretanto, ao comparar a atividade da lipase imobilizada com a do extrato bruto, percebe-se uma redução significativa na mesma. Essa redução pode se dar por diversos fatores, entre eles o suporte estar limitando demasiadamente a difusão dos substratos e produtos através da membrana ou a alteração da conformação nativa da enzima devido à técnica de imobilização utilizada.

A enzima imobilizada na melhor condição foi testada como catalisadora da reação de hidrólise do óleo residual, utilizando relação óleo:água de 1:3 e 15% de lipase. A lipase



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

imobilizada liberou 6,93 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos graxos livres, sugerindo a realização de mais estudos nesta área.

CONCLUSÕES

A condição que gerou a maior quantidade de ácidos graxos livres (62,67 $\mu\text{mol/mL}$) após as 12 horas de reação, foi utilizando uma relação óleo:água de 1:3 e 15% (v/v) de solução enzimática. O uso do ultrassom permitiu que a hidrólise acontecesse mesmo com quantidades menores de água do que as utilizadas em outros estudos da área. Além disso, permitiu também que a reação de hidrólise ocorresse mesmo sem a adição de agentes emulsificantes, o que pode servir de atrativo para a indústria já que o número de procedimentos operacionais é menor. O uso da lipase imobilizada gerou apenas 11% da quantidade de ácidos graxos liberados pela lipase em extrato bruto, o que sugere que mais estudos devem ser realizados a fim de aumentar essa porcentagem e tornar viável o processo de reutilização da enzima. Desse modo, a hidrólise do óleo residual de fritura catalisada pela lipase de *Aspergillus niger* em meio ultrassônico pode ser considerada um pré-tratamento do óleo por converter uma significativa quantidade de triglicerídeos em ácidos graxos livres, que são mais rapidamente metabolizados pelos microrganismos decompositores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cavalheiro JC. 2013. Hidrólise de óleo de canola catalisada por mistura de lipases imobilizadas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- Freire DM, Teles EM, Bom EP, Sant’anna Jr. GL. 1997. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63:63-65.
- Golunski SM, Avaliação da atividade de peroxidases e lipases em diferentes sistemas reacionais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.
- Gonçalves KM, Sutili FK, Leite SGF, Souza ROMA, Leal ICR. 2012. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation: the use of experimental design as a tool for variables evaluation. *Ultrasonic Sonochemistry* 19:232-236.
- Kumar S, Mathur A, Singh V, Nandy S, Khare SK, Negi S. 2012. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 in solid medium containing waste grease. *Biosource Technology* 120:300-304.
- Merçon F, Erbes VL, Sant’anna Jr. GL, Nobrega R. 1996. Efeitos hidrodinâmicos no processo de hidrólise enzimática de óleos em reatores com membranas. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 4., Maringá. Anais... Maringá: UEM, 1996.
- Munaretto CB. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio. 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada, Erechim, 2011.
- Pinto-Coelho RM. 2009. Óleos vegetais. Belo Horizonte: Recóleo Coleta e Reciclagem de Óleos. Chapter in a Book: Pinto-Coelho, RM. 2009. Reciclagem e desenvolvimento sustentável no Brasil. Belo Horizonte: Recóleo Coleta e Reciclagem de Óleos, pp. 241-282.
- Sbardelotto M, Dall Agnol A, Venturin B, Mulinari J, Silva MF, Vargas GDLP, Treichel H. 2014. Estudo da produção, extração e caracterização de lipase microbiana utilizando torta de canola como substrato. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 11, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: UFRJ, 2014.