UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

***CAMPUS* Erechim**

CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

KARINA PAULA PRECZESKI

CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* POR PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES ORGÂNICOS E POSTERIOR APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

ERECHIM

2017

KARINA PAULA PRECZESKI

CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* POR PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES ORGÂNICOS E POSTERIOR APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* de Erechim, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Profª Drª Helen Treichel

Co-orientadora: Drª Simone Maria Golunski

Erechim - RS

2017

KARINA PAULA PRECZESKI

CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* POR PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES ORGÂNICOS E POSTERIOR APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* de Erechim, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitária.

Aprovada em ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Profª Drª Helen Treichel (Orientadora)
UFFS – Erechim

_____
Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann
UFFS – Erechim

_____
DrªSimone Maria Golunski (Co-orientadora)
UFFS – Erechim

_____
Mestrando PPGCTA Bruno Venturin
UFFS - Erechim

Erechim, RS, julho, 2017

Dedico este trabalho a todos nós que às vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que iluminou o caminho e permitiu que este momento pudesse se tornar realidade e ser imensamente vivido por mim, trazendo alegria aos meus familiares e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente aos meus pais (Celoni e Geraldo) por sempre terem me incentivado a estudar e por sempre acreditarem em minha capacidade, não medindo as palavras para me encorajar a ir atrás de meus sonhos, desculpando-me pelas ausências nos momentos em família enquanto eu tinha inúmeras tarefas da faculdade para fazer. Agradeço também à presença e ajuda da minha irmã, Karla Maria, que por mais que contestava, sempre me ajudou nas tarefas que eu precisava de apoio enquanto o semestre me impossibilitava de executar algumas atividades em casa. Peço desculpas à ela também pelos filmes que combinávamos de assistir e eu dormia ainda antes de chegar na metade. Algumas coisas não foram realmente fáceis, mas tudo valeu a pena.

Agradeço também à oportunidade que a Universidade Federal da Fronteira Sul me proporcionou, de poder cursar uma graduação de qualidade e próxima do aconchego de casa, por ter uma brilhante equipe de profissionais sempre dispostos a auxiliar e a compartilhar magníficas experiências com todos nós.

Agradeço às minhas excelentíssimas professoras-orientadoras, Helen Treichel e Simone Maria Golunski, por toda a orientação que me repassaram, não só ensinando, mas me fazendo realmente aprender. Por terem se dedicado juntamente na elaboração desse trabalho que se concretiza agora, depois de tantos esforços. Obrigada também por todos os conselhos, brincadeiras e risadas dentro do nosso maravilhoso lab.

Agradeço também à minha amigona, Renata, por todo o apoio durante a nossa graduação, por todos os conselhos, por me acolher inúmeras vezes em sua casa para estudarmos para as provas ‘dificílimas’, e por todo o aconchego da sua família. Pelas risadas, por me ensinar a jogar LOL, por me ouvir, pelos nossos momentos filosóficos, pelas deliciosas sopas, e pela companhia do nosso Mooffy.

Agradeço às meninas do laboratório, Thamarys, Tati, Frumi, Vanusa, Duda e Angela, por todos os momentos bons passados dentro desse espaço, e por me esperarem (99% das vezes) a acabar meu almoço antes de voltar ao laboratório, além de me ajudarem nos testes do TCC. Agradeço também ao Bruno, pela ajuda na execução do meu Projeto de Conclusão de Curso, pela pia sempre cheia de ‘vidrinhos’ para lavar e pelos conhecimentos compartilhados quando eu parecia uma juíza realizando um interrogatório.

O meu muito obrigada à todos meus queridos colegas, pela cumplicidade em todo esse tempo de graduação, e por sempre se mostrarem prestativos e imensamente amigáveis. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e me auxiliaram na concretização desse sonho. A todos vocês, o meu muito obrigado!

“Chame o sucesso para fazer parte de sua vida. Acredite no seu potencial criador, seja inovador, treine sua mente para vencer, estipule metas e, principalmente, lute por seus ideais”.

Flávio Souza

RESUMO

O presente estudo buscou realizar a concentração das enzimas lipases através da mudança de força iônica do meio seguida por precipitação com solventes orgânicos. As lipases foram produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* via fermentação em estado sólido (FES) utilizando torta de canola como substrato. Foi empregada a técnica de planejamento experimental a fim de avaliar a medida de atividade específica das enzimas, bem como o fator de purificação (FP) e o rendimento (R). Após a precipitação, a melhor condição para cada um dos dois solventes foi utilizada para realizar a hidrólise do óleo residual de fritura, empregando as enzimas em fase livre e imobilizada. A hidrólise foi testada em sistema de agitação orbital e em ultrassom. Ainda, a estabilidade das enzimas precipitadas foram avaliada em duas faixas de temperatura. Os resultados do planejamento mostraram que o melhor FP para a precipitação com o solvente acetona foi em uma vazão de 19,24 mL/min, em uma concentração de solvente de 50% e em 0,5 mol/L de NaCl. Já para o solvente álcool etílico, o melhor FP foi obtido em 0,76 mL/min de vazão, em 50% de solvente e com 0,5 mol/L de concentração salina. Os melhores rendimentos obtidos foram de 263,78% para a acetona e de 157,31% para o etanol. Quanto à estabilidade, as enzimas foram mantidas em temperaturas entre 5 a 8ºC e -10 a -5ºC e apresentou uma queda gradual da sua atividade específica do início até o final do período de análise, apresentando além disso, alguns picos de atividade no decorrer dos 90 dias após a precipitação com ambos os solventes. A hidrólise do óleo residual de fritura com o uso das enzimas imobilizadas não apresentou resultados significativos quando comparado com os valores obtidos para a hidrólise empregando as enzimas purificadas em fase livre, obtendo uma liberação de ácidos graxos livres de 421,60 µmol/mL para a acetona e de 753,07 µmol/mL para o álcool etílico. Desse modo, a utilização de lipases pré-purificadas se mostrou como uma possível técnica de pré-tratamento do óleo residual de fritura, a fim de acelerar sua degradação.

Palavras-chave: Lipases. Precipitação. Solventes orgânicos. Hidrólise. Óleo residual de fritura.

ABSTRACT

In the present study we aimed at performing lipases concentration through the ionic strength change of the medium followed by precipitation using organic solvents (acetone and ethyl alcohol). The enzymes lipases were produced from *Aspergillus niger* by solid state fermentation (SSF) using canola cake as substrate. The experimental planning technique was used to evaluate the specific activities of the enzymes, as well as the purification factor (PF) and the yield (R). After precipitation, the best condition for each of the two solvents was used to perform the hydrolysis of the used cooking oil, using free and immobilized enzymes phase. The hydrolysis was carried out in simple stirring rate and ultrasound system. Furthermore, stability of the precipitated enzymes were evaluated in two temperature ranges. The planning results are best for the acetone solvent precipitation solution at a flow rate of 19.24 ml/min, at a solvent concentration of 50% and at 0.5 mol/L NaCl. For the solvent ethyl alcohol, the best PF was obtained using 0.76 mL/min of flow, in 50% of solvent and 0.5 mol/L of saline concentration. The best yields were 263.78% for acetone and 157.31% for ethanol. For the stability evaluation, the enzymes were maintained at temperatures between 5 to 8°C and -10 to -5°C and showed a gradual decrease in its specific activity from the beginning to the end of the analysis period, also showing some activity increases during the 90 evaluated days after precipitation with both solvents. The hydrolysis of the used cooking oil with the immobilized enzymes did not present significant results when compared to the values obtained for the hydrolysis using a purified enzyme in free phase, generating 421,60 μmol/mL of free fatty acids for acetone and 753,07 μmol/mL for ethyl alcohol. Thus, the use of pre-purified lipases can be a possible pre-treatment technique for the used cooking oil in order to accelerate its degradation.

Keywords: Lipases. Precipitation. Organic solventes. Hydrolysis. Used Cooking Oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 MATERIAL E MÉTODOS 13

2.1 MICRORGANISMO 13

2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO 13

2.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA 14

2.4 MEDIDA DE ATIVIDADE HIDROLÍTICA 14

2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL 15

2.6 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES 15

2.7 PRECIPITAÇÃO COM SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS 15

2.8 AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS 16

2.8.1 Fator de Purificação (FP) 16

2.8.2 Recuperação ou rendimento da enzima (R) 17

2.9 IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES PURIFICADAS EM GLUTARALDEÍDO E CARVÃO ATIVADO 17

2.10 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM 17

2.11 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA 18

2.12 TRATAMENTO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA ATRAVÉS DAS ENZIMAS LIPASES CONCENTRADAS 18

2.12.1 Hidrólise do óleo residual de fritura em agitador orbital (shaker) 18

2.12.2 Hidrólise do óleo residual de fritura em ultrassom 19

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 20

3.1 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES 20

3.2 TESTES PRELIMINARES DE PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES 20

3.3 TESTES PRELIMINARES DE PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES 22

3.4 OTIMIZAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES POR SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS 23

3.5 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA 34

3.6 REAÇÃO HIDROLÍTICA DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA 36

3.6.1 Caracterização do óleo residual de fritura 36

3.6.2 Hidrólise do óleo residual de fritura em agitador orbital (shaker) 36

3.6.3 Hidrólise do óleo residual de fritura em ultrassom 37

4 CONCLUSÕES 39

REFERÊNCIAS 41

1 INTRODUÇÃO

Diversos processos vêm explorando o uso das enzimas para a obtenção de um produto final mais sustentável, sendo que as enzimas já são utilizadas há centenas de anos. Vários motivos fazem com que isso ocorra, sendo que o principal deles é a alta especificidade que elas possuem com seus substratos, agindo diretamente no ponto requerido. Esse e outros motivos as tornam bons substituintes aos produtos químicos na catálise de reações (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Enzimas que possam ser facilmente adquiridas são alvo forte das indústrias, sendo que estudos nessa área são extremamente relevantes. Dessa forma, encontrar enzimas que possam ser extraídas de substratos de baixo custo é um fator primordial, como por exemplo, enzimas produzidas através do uso de resíduos agroindustriais (GOMBERT et al., 1999). Juntamente a isto, o fungo *Aspergillus niger* torna-se um ótimo produtor de enzimas, principalmente de lipases, como pode ser observado em diversos trabalhos encontrados na literatura (KAMINI, MALA e PUVANAKRISHNAN, 1998; MAHADIK et al., 2002; SALIHU, MUNTARI e ALAM, 2016).

As lipases são enzimas que catalisam as reações de hidrólise de triglicerídeos, transformando-os em moléculas menores, como ácidos graxos e glicerol (LEAL, et al., 2002). Sendo assim, as lipases possuem importantes papéis dentro das indústrias, como nas áreas de alimentos, farmacêuticas, papel e celulose, biocombustíveis, tratamento de águas residuárias, entre outras (BON et al., 2008).

Elas também apresentam papel importante no que diz respeito ao tratamento de resíduos/efluentes que possuem óleo em sua composição, quebrando as moléculas de gordura e facilitando o tratamento do efluente (OMIL et al., 2003 apud MENDES et al., 2005). Essa função é ainda melhor desempenhada quando a enzima se apresenta em forma mais concentrada, diminuindo a quantidade de enzima utilizada em cada etapa, facilitando o tratamento.

A enzima, quando concentrada ou purificada, apresenta uma melhor atividade catalítica, pois a concentração ou purificação de enzimas é um método utilizado para retirar as impurezas presentes na solução, permitindo que a enzima fique mais pura. Esse processo pode ser realizado com o uso de solventes precipitantes, podendo ainda ser adicionado sais que realizam a mudança de força iônica, auxiliando na precipitação (LIMA et al., 2001). Ainda, o grau de purificação da enzima dependerá da sua aplicação ao final do processo (LIMA et al.,

2001), sendo que neste ponto é indispensável o estudo do uso de solventes e sais com custo reduzido, como por exemplo o etanol e a acetona.

Além disso, possibilitar a recuperação e reciclo da enzima no processo é fundamental para diminuir os custos da operação, além de poder melhorar a estabilidade e a atividade da lipase (SHARMA et al., 2001). Assim, a imobilização de enzimas acaba despertando significativa atenção para uso em aplicações comerciais como biocatalisadores, elevando o tempo de uso das enzimas nos processos, bem como reduzindo as despesas operacionais (FORTES et al., 2017).

Dessa forma, o uso das lipases se torna atrativa, pois geram rendimentos elevados sem produzirem compostos tóxicos, além de também reduzirem o tempo e a energia necessários para o processo, reduzindo custos e trabalhando em condições amenas de pH e temperatura, tornando-se foco nas questões ambientais (MASSE, KENNEDY, CHOU, 2001 apud MENDES et al., 2005).

O óleo residual de fritura se tornou um crescente problema ambiental, pois é gerado em inúmeros lugares e na grande maioria das vezes é descartado incorretamente no meio ambiente (KUMAR et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013). Dessa maneira, os impactos negativos dos óleos residuais podem ser minimizados pela utilização de enzimas microbianas hidrolíticas, como a lipase. A pré-hidrólise dos resíduos de óleos pela lipase melhora a eficiência de remoção e acelera o processo de degradação das moléculas gordurosas, sendo que os produtos da hidrólise são rapidamente absorvidos pela membrana plasmática semipermeável dos microrganismos, podendo criar um ambiente livre de lipídios (KUMAR et al., 2012).

Dessa forma, a otimização da produção de lipases utilizando microrganismos e subprodutos agroindustriais como substrato é de grande importância para o barateamento dos custos do processo, sendo que um problema típico de qualquer indústria de transformação está na recuperação e purificação dos produtos envolvidos. Neste contexto, processos que permitam a recuperação e purificação de enzimas de forma eficiente e com baixos custos são extremamente desejáveis e representam uma área de pesquisa de grande interesse (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Assim, os processos de precipitação que fazem o uso de sais e solventes são altamente empregados quando se pretende realizar a concentração e a pré-purificação de proteínas, bem como o uso destes compostos associados (ZHANG et al., 2004; CORTEZ E PESSOA JR et al., 1999).

Portanto, buscando uma forma de pré-tratamento barata e eficiente do óleo residual de fritura, este trabalho tem por objetivo concentrar as enzimas lipases de *Aspergillus niger* através

da mudança de força iônica do meio, aliada à precipitação com solventes orgânicos, com posterior aplicação no pré-tratamento de óleo residual de fritura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

O microrganismo produtor de lipases utilizado neste estudo foi o fungo *Aspergillus niger*, isolado por Rigo (2009) e identificado como um bom produtor de lipases microbianas extracelulares. O meio de cultura utilizado para a produção do inóculo foi constituído por (m/v): amido solúvel 2%, óleo de oliva 1%, extrato de levedura 0,1%, $MgSO_4$ 0,025%, KH_2PO_4 0,05%, $CaCO_3$ 0,5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5% e ágar 2%. Para preparação do meio de cultura, os componentes acima citados foram solubilizados, excetos o amido, o óleo de oliva e o ágar. O amido foi solubilizado separadamente e adicionado aos demais componentes para então, ajustar-se o pH em 5,5 com solução de HCl ou NaOH conforme o pH inicial do meio (VARGAS, 2004). Feito isso, o óleo de oliva e o ágar foram adicionados à solução e a mistura foi mantida em banho-maria até completa solubilização. O meio foi então autoclavado a 120°C, durante 30 minutos a 1 atm. Após a autoclavagem, 0,5 mL de suspensão de esporos de *Aspergillus niger* foram inoculados a 100 mL do meio de cultura e incubados por sete dias a 30°C.

Para a preparação do inóculo, foram adicionados ao meio já fermentado, 20 mL de solução Tween 80 0,1% (v/v) e pérolas de vidro estéreis para a coleta de esporos. Desta suspensão, 1 mL foi adicionado a 100 mL de solução Tween 80 0,1% (v/v) para realização da contagem dos esporos presentes no meio. A contagem de esporos foi realizada em microscópio óptico e câmara de Neubauer.

2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido foi realizada em béqueres de polipropileno (600 mL) contendo meio composto por 10g de torta de canola. A suplementação do meio foi otimizada por Treichel et al. (2016) em termos de teor de nitrogênio (2%) e umidade (60%). Salienta-se que a fonte de nitrogênio utilizada foi a ureia. A suplementação foi então diluída em água conforme teor de umidade de 60%. Após a diluição, a solução de suplementação foi adicionada ao meio por gotejamento de forma a cobrir toda a superfície da torta. Os béqueres foram cobertos com manta acrílica e papel alumínio e autoclavados a 120°C, por 30 min. a 1 atm. Após a esterilização, os meios foram inoculados com suspensão de $2x10^8$ esporos/g de torta seca e levados para a incubadora a uma temperatura fixa de 27°C (TREICHEL et al., 2016). As

amostras foram retiradas após 48h de fermentação para obtenção do extrato enzimático.

2.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Após a fermentação, as amostras foram maceradas em câmera de fluxo laminar, retirando-se de cada frasco alíquotas de 0,5 g do meio para posterior determinação da umidade através de análise gravimétrica. Os cadinhos foram mantidos por 12h em estufa a 105ºC. O restante do meio foi pesado e adicionado a erlenmeyers de 250 mL juntamente com 45 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8. Essa solução foi mantida sob agitação durante 30 min, 50ºC e 165 rpm conforme estabelecido em trabalhos da literatura (SILVA et al., 2011). A separação da fase líquida foi realizada através de prensagem manual e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade hidrolítica (TREICHEL et al., 2016).

2.4 MEDIDA DE ATIVIDADE HIDROLÍTICA

Para determinação da atividade hidrolítica das lipases foi utilizada uma emulsão de óleo de oliva 10% (v/v) e goma arábica 5% (v/v), diluídos em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6. Para o processo de reação de hidrólise foram utilizados 9 mL de emulsão e 1 mL do extrato enzimático, cuja solução foi incubada por 32 min, a 35°C com agitação de 165 rpm (DALL AGNOL et al., 2013). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados até pH 11 com solução de hidróxido de sódio de aproximadamente 0,05 M. Para fins de comparação entre a quantidade inicial de ácidos graxos livres com a quantidade após a reação, uma amostra de controle (branco reacional) foi utilizada, adicionado-se a solução de acetona:etanol antes da adição das enzimas à emulsão.

Sendo que uma unidade de atividade hidrolítica (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto nas condições de reação (CAVALCANTI et al., 2005). Desse modo, a atividade hidrolítica foi obtida através da Equação 1.

$$\boldsymbol{At = \left(\frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_c}\right) * FM} \qquad (1)$$

onde:

At é a atividade hidrolítica da lipase (U/g);

Va é o volume médio de NaOH utilizado na titulação das amostras (mL);

Vb é o volume de NaOH utilizado na titulação do branco reacional (mL);

M é a molaridade do NaOH;

t é o tempo de reação (min.);

Vc é o volume de extrato enzimático bruto utilizado na reação (mL);

FM é o fator massa obtido através da divisão da quantidade de solução extratora (mL) pela média da massa de torta seca (g) adicionada a cada erlenmeyer.

2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (ASB) como padrão (Sigma A3294).

2.6 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES

Para os testes iniciais de precipitação das enzimas lipases com solventes, tanto o precipitado como também o sobrenadante foram utilizados para avaliação da atividade enzimática.

Inicialmente determinou-se a atividade enzimática das enzimas brutas para ser utilizada como comparativo em testes posteriores. Em seguida, o solvente refrigerado (acetona P.A., álcool etílico P.A., álcool isopropílico P.A. ou álcool n-propílico P.A.) foi adicionado, gota a gota, em uma alíquota do extrato bruto (10 mL) a uma taxa de alimentação determinada (10 mL/min – de acordo com Golunski et al., 2011), utilizando uma bomba peristáltica (MsTecnopon). A solução do extrato enzimático foi mantida a 5 ºC (em banho de gelo) sob agitação constante durante todo o processo. Após a adição do solvente (10%, 50% e 70% - de acordo com Golunski et al., 2011), o precipitado resultante foi levado à geladeira por um período de 1h e, em seguida, centrifugado a 9500 rpm por 15 min a 4ºC. O que precipitou no tudo de centrífuga foi coletado e dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8 (RISSO et al., 2009, GOLUNSKI et al, 2011). A atividade enzimática foi determinada em todas as frações (sobrenadante e precipitado), conforme procedimento descrito nos itens 2.4 e 2.5 deste documento.

2.7 PRECIPITAÇÃO COM SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS

Após os testes de precipitação com os solventes foram realizados testes com a adição de sal. Para os ensaios de mudança da força iônica do meio, foi utilizado o sal NaCl na concentração de 0,5 mol/L, para testes iniciais. Para o NaCl, a força iônica é igual à concentração do sal. Após a adição da solução salina ao extrato enzimático bruto, a solução

resultante foi submetida à precipitação com os solventes orgânicos (acetona e álcool etílico), nas condições otimizadas de Golunski et. al. (2011) (solvente 50% e vazão de 10 mL/min). Após a adição dos solventes orgânicos, o precipitado resultante permaneceu em geladeira por 1h e, após, foi centrifugado a 9500 rpm durante 15 min a 4 °C. O precipitado obtido foi separado do sobrenadante e dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0. A atividade das enzimas e proteína total foram determinadas em todas as frações.

Após os resultados obtidos nos testes preliminares dos itens 2.6 e 2.7, para dar seguimento ao estudo da precipitação das enzimas utilizando sal e solventes, foi desenvolvido um planejamento de experimentos, utilizando a técnica de delineamento composto central rotacional 2^3 (DCCR), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Níveis e variáveis utilizadas para avaliar a precipitação das lipases obtidas a partir do fungo *Aspergillus niger*.

	NÍVEIS				
VARIÁVEIS	-1,68	-1	0	1	1,68
Vazão (ml/L)	0,76	4,5	10	15,5	19,24
NaCl (mol/L)	0	0,2	0,5	0,8	1
Conc. Solv. (%)	10	26	50	74	90

2.8 AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

2.8.1 Fator de Purificação (FP)

O fator de purificação (FP) é uma medida empregada para acompanhar as operações de purificação. Ele foi calculado pela Equação 2 (PORTO et al., 2008):

$$FP = \frac{A_{esp\ purificada}}{A_{esp\ bruta}} \qquad (2)$$

sendo:

$A_{esp\ purificada}$: atividade específica da enzima purificada ou no precipitado ressuspendido (U/mg);

$A_{esp\ bruta}$: atividade específica da enzima lipase bruta (U/mg) (extrato bruto antes da precipitação).

2.8.2 Recuperação ou rendimento da enzima (R)

A recuperação da enzima foi calculada pela Equação 3 (PORTO et al., 2008).

$$RP = \frac{[A_{enzima\ purificada} * V_{purificado}]}{[A_{extrato\ bruto} * V_{inicial}]} \quad (3)$$

sendo:

$A_{enzima\ purrificada}$: atividade enzimática na fração considerada (U/mL);

$A_{extrato\ bruto}$: atividade enzimática na alimentação (U/mL);

$V_{inicial}$: volume inicial do extrato adicionado em mL.

2.9 IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES PURIFICADAS EM GLUTARALDEÍDO E CARVÃO ATIVADO

Para avaliação da hidrólise do óleo de fritura através da atuação das lipases purificadas foi realizada também a imobilização do extrato precipitado com os dois solventes que apresentaram os melhores resultados no desenvolvimento do planejamento (acetona e álcool etílico).

A imobilização consistiu na preparação de uma solução gel contendo água destilada (12g) e alginato de sódio (0,24g) previamente aquecida em micro-ondas para total diluição e posteriormente resfriada, adicionando-se em seguida carvão ativado (0,36g) e o extrato enzimático pré-purificado (1 mL).

A solução gel obtida foi gotejada por uma bomba peristáltica em uma solução contendo 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6, 50 mL de cloreto de cálcio 0,2 M e 15 mL de glutaraldeído 2%, preparada em banho de gelo e agitação constante. As lipases imobilizadas foram mantidas em refrigeração por 24h. Após, foram lavadas com água destilada e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6, sendo armazenadas em solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M e cloreto de cálcio 0,05 M 1:1 (v/v). As condições de imobilização foram realizadas conforme otimização realizada por Mulinari (2016).

2.10 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

A estabilidade de estocagem das enzimas precipitadas com os solventes acetona e álcool etílico foi avaliada em sua fase livre sob refrigeração, abrangendo duas faixas de temperatura: 5 a 8ºC e -10 a -5 ºC. A atividade específica foi avaliada a cada 30 dias, até que as

enzimas perdessem seu poder catalítico. Os resultados foram apresentados em percentagem da atividade residual, calculados pela Equação 4.

$$\boldsymbol{AR}(\%) = \frac{\boldsymbol{AE^i}}{\boldsymbol{AE^0}} \boldsymbol{x\ 100} \qquad (4)$$

Onde:

AE^i: Atividade específica no tempo "i" (U/mg);

AE^0: Atividade específica no tempo inicial (U/mg).

2.11 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

O óleo residual de fritura foi obtido junto à cantina localizada no Bloco A da Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Erechim e foi acondicionado em garrafa pet a 10ºC até a utilização. O óleo foi caracterizado em termos de porcentagem de ácidos graxos livres através de cromatografia gasosa realizada em parceria com o Laboratório de Óleos e Graxas da Universidade da República (UdelaR) de Montevidéu, Uruguai.

2.12 TRATAMENTO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA ATRAVÉS DAS ENZIMAS LIPASES CONCENTRADAS

A hidrólise do óleo residual de fritura foi avaliada em termos de liberação de ácidos graxos livres em reação catalisada por lipases concentradas na forma livre e imobilizada. A reação se deu em dois sistemas reacionais diferentes: agitador orbital e ultrassom. As condições de tempo, temperatura, agitação (agitador orbital) e frequência ultrassônica foram as determinadas por Mulinari et al. (2017). Além disso, nas reações em sistema ultrassônico, um agitador mecânico foi utilizado para promover a mistura da solução (170 rpm), além de ter sido adicionada água destilada para diluição do meio reacional, já que o ultrassom juntamente com o agitador mecânico, promovem uma maior homogeneização do meio. Diferentemente ocorreu para o sistema em agitador orbital, em que foi adicionado etanol como solvente para melhor homegeneizar a solução, já que este sistema não promoveria uma mistura satisfatória do óleo com adição de água. A quantidade de enzima, a relação volumétrica solvente:óleo, o tempo e as condições reacionais foram pré avaliadas por Mulinari et al. (2017).

2.12.1 Hidrólise do óleo residual de fritura em agitador orbital (shaker)

Para a reação do teste de hidrólise do óleo em shaker, foram consideradas as proporções de óleo, solvente e enzima com relação ao volume total do meio (óleo 1:3 solvente

mais 15% de enzima) (MULINARI et al., 2017). Para as enzimas livres a medição foi realizada por volume de líquido e para as imobilizadas por deslocamento do líquido em coluna. Preparou-se o meio com o óleo e o solvente e imediatamente à adição das enzimas retirou-se uma alíquota de 10 ml da mistura e adicionou-se 10 ml de solução acetona:etanol (1:1) para cessar a reação e realização do branco reacional, o qual foi titulado com NaOH 0,02 M até alcançar pH 11. O branco reacional foi realizado com a finalidade de determinar apenas a quantidade de ácidos graxos livres liberados durante a reação, excluindo os que já haviam no óleo. O restante da mistura seguiu então para o agitador orbital a 35ºC e 165 rpm por um período de 12h (MULINARI et al., 2017). Após decorrido esse tempo, foi realizada a determinação de ácidos graxos livres, em triplicata, de cada um dos sistemas reacionais (livre e imobilizada). Para isso, retirou-se 10 ml do meio e adicionou-se 10 ml de acetona:etanol e realizou-se a titulação das amostras com NaOH 0,02 M até pH 11 (FREIRE et al., 1997). A partir disso, a liberação de ácidos graxos livres (AGL) foi contabilizada através da Equação 5, sendo esta expressa em µmol/mL.

$$\boldsymbol{AGL = \left(\frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{V_c}\right)} \qquad (5)$$

onde:

Va é o volume de NaOH gasto nas amostras (mL);

Vb é o volume de NaOH gasto no branco reacional (mL);

M é a molaridade do NaOH utilizado;

Vc é o volume de amostra utilizada na reação (mL).

2.12.2 Hidrólise do óleo residual de fritura em ultrassom

Para a reação do teste de hidrólise do óleo em sistema ultrassônico, foram consideradas as mesmas proporções de óleo, solvente e enzima que para o sistema em agitador orbital. Foi realizado um branco reacional com o mesmo objetivo anterior, e o restante da mistura seguiu para o ultrassom a uma temperatura de 45ºC e uma potência de 50% total do equipamento por um período de 12h. (MULINARI et al., 2017). O equipamento utilizado para a realização deste experimento foi a Lavadora Ultra-Sonica UNIQUE, modelo USC-1800 A, frequência US 40 KHz e potência máxima de 137 W (0,42 W/cm²).

Depois de decorrido esse tempo, foi realizada uma leitura em triplicata de cada um dos sistemas reacionais (livre e imobilizada) retirando-se 10 ml do meio e adicionando-se 10 ml de acetona:etanol e seguindo para a titulação das amostras com NaOH 0,02 M até pH 11 (FREIRE

et al., 1997). A partir disso, a liberação de ácidos graxos livres (AGL) foi determinada através da Equação 5, previamente descrita no item 2.12.1, expressa em μmol/mL.

2.13 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados obtidos neste estudo foi realizada através do software Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, USA, version 7.0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES

As enzimas lipases foram produzidas nas condições otimizadas por Treichel et al. (2016). Após a produção das enzimas, o caldo fermentado foi homogeneizado e posteriormente foi determinada a atividade enzimática. A atividade determinada foi de 20 U/g e com este extrato foram realizados os testes preliminares da precipitação das lipases em diferentes solventes orgânicos e concentração salina, almejando a concentração destas enzimas.

3.2 TESTES PRELIMINARES DE PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES

Inicialmente foram realizados testes preliminares de precipitação das enzimas lipases com diferentes tipos de solventes para verificar quais possuíam maior poder de concentração enzimática. Os solventes utilizados foram acetona P.A., álcool etílico absoluto P.A., álcool isopropílico P.A. e álcool n-propílico P.A. Os ensaios também foram realizados em diferentes concentrações de solventes (10%, 50% e 70%), com base em testes de precipitação realizados por Golunski et al. (2017). Em todos os testes foi determinada a atividade enzimática para o sobrenadante e para o precipitado. Os valores obtidos para esses ensaios estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da atividade hidrolítica das enzimas lipases para diferentes concentrações de solventes.

		Atividade (U/ml)	
	Extrato Bruto	7,5	
	CONC. SOLV.	SOBRENADANTE	PRECIPITADO
AC	10%	2,36	0,00
	50%	9,06	2,14
	70%	1,15	2,18
AE	10%	1,98	0,21
	50%	6,81	1,08
	70%	1,04	2,02
AI	10%	1,20	0,00
	50%	4,20	2,51
	70%	0,16	3,28
AN-P	10%	1,02	0,00
	50%	3,00	0,21
	70%	0,00	0,78

*AC: Acetona P.A.; AE: Álcool Etílico P.A.; AI: Álcool Isopropílico P.A.; AN-P: Álcool N-Propílico.

Os valores de atividade hidrolítica encontrados na precipitação com diferentes solventes apresentaram valores que se destacam, tanto para o sobrenadante como para o precipitado das enzimas lipases. Dessa forma, os solventes que apresentaram melhores valores de atividade são a acetona e o álcool etílico, na concentração de 50% para o sobrenadante e 70% de solvente para o precipitado, respectivamente.

Os ensaios que apresentaram baixa atividade hidrolítica podem ser explicados pelo uso de pequenas concentrações de solvente (10%) não ocorrendo assim precipitação e, em concentrações elevadas (70%), pode ter ocorrido a desnaturação das enzimas (GOLUNSKI et al., 2017). O que não ocorreu, excepcionalmente, para a acetona e álcool etílico, possívelmente devido à composição desses dois solventes, que, quando em contato com o extrato enzimático, apresentaram grande afinidade com os interferentes enzimáticos, acarretando em bons resultados para diferentes concentrações.

3.3 TESTES PRELIMINARES DE PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES

Analisando os resultados obtidos no item acima, observa-se uma maior atividade hidrolítica quando utilizados os solventes acetona e álcool etílico. Dessa forma, somente estes dois solventes foram utilizados juntamente com o sal (NaCl – 0,5 mol/L) para estudos posteriores. A escolha desse sal se deu devido a este já ter sido estudado anteriormente para promover a mudança de força iônica do meio e promover a precipitação (GOLUNSKI et al 2017).

Com a realização dos procedimentos, foram calculados a atividade hidrolítica da enzima, a atividade específica, o fator de purificação e o rendimento enzimático para cada teste, de acordo com as equações apresentadas nos itens 2.4, 2.5 e 2.8.

As respostas para esses parâmetros estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos para as lipases quando feito o uso de NaCl juntamente com os solventes acetona e álcool etílico.

	Conc. Solv. (%)	**Atividade (U/ml)**	**Ativ. Espec. (U/mg)**	**Fator de Purificação**	**Rendimento (%)**
	Extrato Bruto	2,4	2,73	1	100
AE - P	10%	12,6	9,67	3,33	146,86
	50%	4,7	4,16	1,53	97,96
	70%	18,65	16,81	3,16	118,78
AE - S	10%	3,15	5,18	1,79	61,71
	50%	6,56	19,21	7,05	136,73
	70%	0	0	0	0
AC - P	10%	16,4	11,45	3,95	321,31
	50%	7,74	7,19	2,64	161,22
	70%	10,82	11,54	4,23	225,51
AC - S	10%	2,9	4,13	1,42	56,82
	50%	5,92	21,45	7,87	123,47
	70%	0	0	0	0

* AE-P: Álcool etílico - precipitado; AE-S: Álcool etílico - sobrenadante; AC-P: Acetona - precipitado; AC-S: Acetona – sobrenadante.

Observa-se que os maiores valores de purificação enzimática foram obtidos para as concentrações de 50% de solvente, tanto para a acetona como também para o álcool etílico. Fato que ocorreu com significância na fase sobrenadante da solução. Também para a mesma fase, uma concentração moderada de solvente (50%) gerou um aumento de 7 vezes no fator de purificação das lipases. Para Maldonado (2015), utilizando precipitação com álcool etílico 70% da enzima lipase de *Geotrichum candidum*, obteve um fator de purificação de 15,33 vezes, e, quando precipitou a mesma enzima com sulfato de amônio seguida de liofilização, obteve um fator de purificação de 50,60 vezes, demonstrando a eficiência no uso de sais e solventes para a concentração de enzimas.

Os valores de atividade enzimática obtidos foram maiores que para as enzimas brutas (com excessão da concentração de 70% para o sobrenadante com os dois solventes), o que mostra que o uso conjunto de sal e solvente no processo de precipitação resultou em uma maior ativação das enzimas, devido, possivelmente, à remoção de inibidores (GOLUNSKI, 2011). O mesmo é observado para o fator de purificação enzimática.

A não ocorrência de atividade hidrolítica para as concentrações de 70% de álcool etílico e 70% de acetona, ambas para a fase sobrenadante, se dá possivelmente à desnaturação enzimática devido à elevada concentração de solventes (GOLUNSKI et al., 2017).

3.4 OTIMIZAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES POR SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS

A partir dos resultados obtidos em testes prelimiares de precipitação enzimática com o uso de sal e solventes, empregou-se o planejamento experimental com o objetivo de investigar as melhores condições de precipitação para as lipases. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento experimental e os resultados obtidos para a atividade hidrolítica, atividade específica, fator de purificação (FP) e o rendimento (R) para cada um dos ensaios, utilizando acetona e álcool etílico. É importante salientar que foi realizado a determinação da atividade hidrolítica e proteína total, tanto para o precipitado como também para a fase sobrenadante, constantando-se através dos testes, que as enzimas encontravam-se presentes na fase sobrenadante da solução. Este fato mostra que possivelmente houve uma maior afinidade entre sal e solvente com os interferentes enzimáticos do que afinidade com as próprias enzimas. Caso como esse também já foi relatado por Barbosa et al. (2011), estudando a purificação de enzimas lipases, provenientes de uma nova fonte de *Bacillus*, através do uso de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), detectando que a fração enzimática permaneceu no caldo fermentativo

(sobrenadante) enquanto que os interferentes precipitaram durante a realização dos procedimentos de purificação.

Como visto, a concentração enzimática pode ocorrer tanto na fase sobrenadante como na fase precipitada do processo, isso varia de acordo com a enzima analisada e também com relação às técnicas utilizadas. Uma das vantagens de a enzima permanecer no sobrenadante está na eliminação da etapa de ressuspensão do precipitado, além de que, o volume presente na fase sobrenadante é bem mais significativa do que na outra fase.

Tabela 4: Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados obtidos para a atividade hidrolítica, atividade específica, fator de purificação (FP) e rendimento (R) para a fase sobrenadante.

Ensaio	**VARIÁVEIS**			**ACETONA**				**ÁLCOOL ETÍLICO**			
	Vazão (ml/min)	Conc. Solv. (%)	NaCl (mol/L)	Atividade (U/ml)	Ativ. Espec. (U/mg)	FP	R	Atividade (U/ml)	Ativ. Espec. (U/mg)	FP	R
Bruta	-	-	-	2,55	2,90	1,00	100,00	2,55	2,90	1,00	100,00
1	-1 (4,5)	-1 (26)	-1 (0,2)	5,87	12,21	4,21	115,10	8,03	15,27	5,26	157,31
2	1 (15,5)	-1 (26)	-1 (0,2)	13,46	28,31	9,76	263,78	6,71	13,95	4,81	131,41
3	-1 (4,5)	1 (74)	-1 (0,2)	3,23	9,06	3,12	63,31	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1 (15,5)	1 (74)	-1 (0,2)	6,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	-1(4,5)	-1 (26)	1 (0,8)	7,78	14,80	5,10	152,51	3,38	6,73	2,32	66,18
6	1 (15,5)	-1 (26)	1 (0,8)	9,80	18,69	6,44	192,00	5,04	10,21	3,52	98,80
7	-1 (4,5)	1 (74)	1 (0,8)	0,60	5,36	1,85	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00
8	1 (15,5)	1 (74)	1 (0,8)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	-1,68 (0,76)	0 (50)	0 (0,5)	8,55	21,02	7,25	167,51	8,00	28,50	9,82	156,73
10	1,68 (19,24)	0 (50)	0 (0,5)	11,30	33,63	11,60	221,39	2,05	7,03	2,42	40,16
11	0 (10)	-1,68 (10)	0 (0,5)	2,90	4,13	1,43	56,82	3,15	5,18	1,79	61,71
12	0 (10)	1,68 (90)	0 (0,5)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	0 (10)	0 (50)	-1,68 (0)	2,05	5,75	1,98	40,16	5,15	14,35	4,95	100,96
14	0 (10)	0 (50)	1,68 (1)	7,33	19,23	6,63	143,63	5,15	14,13	4,87	100,96
15	0 (10)	0 (50)	0 (0,5)	8,85	30,70	10,58	173,39	6,56	19,21	6,62	128,53
16	0 (10)	0 (50)	0 (0,5)	8,40	30,46	10,50	164,57	4,55	16,42	5,66	89,20
17	0 (10)	0 (50)	0 (0,5)	8,40	28,64	9,87	164,57	5,34	19,57	6,75	104,55

* FP: Fator de Purificação; R: Rendimento.

Considerando os resultados obtidos na Tabela 4, observa-se que a realização da concentração enzimática das lipases foi obtida com êxito quando utilizado sal simultaneamente com os solventes acetona e álcool etílico. A atividade hidrolítica, bem como a atividade específica da enzima apresentaram um aumento em relação às enzimas brutas, resultando em valores satisfatórios de purificação e rendimento enzimático.

Empregando o solvente acetona juntamente com o NaCl obteve-se o maior fator de purificação (11,60-vezes) quando utilizada uma maior vazão (19,24 ml/min) e valores intermediários de solvente (50%) e concentração salina (0,5 mol/L). Valores inferiores a estes foram obtidos no ponto central e no ensaio 2. A média de FP para o ponto central ficou em 10,32-vezes nas condições de 10 ml/min de vazão, 50% de concentração de solvente e 0,5 mol/L de NaCl. Já, para o resultado obtido no ensaio 2 (FP 9,76-vezes), as condições utilizadas foram 15,5 ml/min de vazão, 26% de concentração de acetona e 0,2 mol/L de NaCl.

Os maiores rendimentos enzimáticos para a solvente acetona foram encontrados nos ensaios 2 (263,78%) e 10 (221,39%) do planejamento, coincidindo com os dois maiores valores de FP para as enzimas lipases, quando empregadas as condições intermediárias das variáveis analisadas, em ambos os ensaios, exceto a vazão. Valores de rendimento ligeiramente próximos a esses foram obtidos nos ensaios em que obteve-se valores médios de purificação, como por exemplo nos três pontos centrais do planejamento (173,39%; 164,57% e 164,57%). Substancialmente, houve um aumento do rendimento enzimático na maioria dos ensaios realizados, demonstrando uma eficácia do solvente e do sal na remoção de inibidores, como por exemplo metais pesados, que são ligeiramente encontrados em meios fermentativos (PORTO et al., 2008). Como o rendimento está relacionado com a atividade enzimática, os ensaios em que se obteve a menor atividade hidrolítica também foram os que apresentaram os menores rendimentos. Já, aplicando o álcool etílico como solvente precipitante, obteve-se o maior valor de purificação (9,82-vezes) em condições similares às ocorridas para a precipitação com acetona, excetuando-se uma vazão de 0,76 ml/min, a menor vazão utilizada. A diferença encontrada no valor das vazões utilizadas para os dois solventes pode ser atribuída ao fato de que a álcool etílico requer um maior tempo para precipitar os inibidores, e, consequentemente, uma menor vazão de bomba, o que não ocorre para a solvente acetona, em que com uma maior vazão e menor tempo consegue atingir resultados similares.

Valores de purificação ligeiramente menores que 9,82-vezes (ensaio 9) foram obtidos no ponto central do experimento, numa média de purificação de 6,34-vezes e também no ensaio 1 (FP 5,26-vezes), para o mesmo valor codificado (-1) em todas as três variáveis analisadas (4,5 ml/min de vazão da bomba, 26% de álcool etílico e 0,2 mol/L de NaCl).

Observou-se também que não foram obtidos fatores de purificação nos ensaios em que as enzimas foram expostas a concentrações elevadas de solvente (74% e 90%), fato que ocorreu tanto para a acetona como também para o álcool etílico.

No caso da precipitação com álcool etílico, semelhanças em relação ao rendimento enzimático quando comparado com o uso da acetona podem ser percebidos. Os maiores rendimentos ocorreram no ensaio 9 (156,73%) e seguiram para alguns dos demais ensaios, além do ponto central (média de 107,43%), ressaltando que no ensaio 9 ocorreu também o maior FP para as enzimas lipases quando utilizado álcool etílico como solvente precipitante. A grande maioria dos testes apresentaram um rendimento igual ou superior ao das enzimas brutas, demonstrando também a efetividade desse método na concentração das lipases.

É possível ressaltar ainda, que os menores rendimentos foram obtidos nos ensaios que apresentaram as maiores concentrações de solventes (74% e 90%), indicando uma possível desnaturação enzimática devido à elevada concentração dos agentes precipitantes. Sem deixar de considerar casos em que há um possível arraste de inibidores juntamente com as enzimas nos ensaios em que a vazão utilizada foi demasiadamente elevada, apresentando baixos valores de purificação e rendimentos enzimáticos (GOLUNSKI et al., 2011).

Estudo realizado por Carvalho et. al. (2017) para purificar a lipase de *Yarrowia lipolytica* tinha o intuito de comparar três diferentes métodos: ultrafiltração, adição de acetona e caolin e, por último, sistema aquoso bifásico. Ele constatou que a técnica que apresentou o maior FP foi o sistema aquoso bifásico, com um FP de 41,55-vezes. Em segundo lugar ficou o método de ultrafiltração com um FP de 6,55-vezes e, em terceiro lugar o método de adição de acetona e caolin, com um FP de 0,54-vezes, sendo que estes últimos apresentaram fatores de purificação menores do que os encontrados neste estudo utilizando acetona e/ou álcool etílico com NaCl.

Golaki et al. (2015) purificaram a lipase 3646 de *Cohnella sp*. A01 através de cromatografia de permuta iônica utilizando resina DE52, e somente variou o pH de 5,5 para 4,3. Para o primeiro valor de pH obteve um FP de 6,2-vezes, e, após, dialisou parte dessa solução obtida, centrifugou e aplicou na resina a pH 4,3 obtendo um FP mais elevado, no valor de 13,35-vezes. Obteve também um R de 69,52% para pH de 5,2 e de 38% para pH 4,3. Os valores encontrados para este autor mostram que os FP encontrados no estudo em questão são semelhantes, sendo os R relativamente maiores que para Golaki et al., relatando novamente a eficiência do uso de agentes precipitantes orgânicos associados ao uso de sais.

Outro estudo com o objetivo de purificar a enzima lipase de *Acinetobacter sp*. AU07 foi realizado por Gururaj et al. (2016) através do uso de precipitação com sulfato de amônio e

cromatografia de troca iônica. O autor obteve para a precipitação com sal um FP de 1,4 vezes com rendimento de 70,10% e para a cromatografia um rendimento global de 36,04% seguido de um FP de 2,2 vezes. É possível observar que já foram testados outros métodos menos complexos que obtiveram um rendimento relativamente maior que o encontrado por este autor.

Sendo assim, as condições do ensaio que apresentou o melhor resultado de FP tanto para a acetona quanto para o álcool etílico foram utilizadas nos testes posteriores aplicando as enzimas na degradação do óleo residual de fritura.

Devido aos bons resultados encontrados, foi empregado o tratamento estatístico aos dados, tanto para a solvente acetona como também para o solvente álcool etílico. A análise estatística permitiu a geração dos modelos empíricos para o fator de purificação em função da vazão e da concentração de sal e solvente utilizados. A Tabela 5 abaixo apresenta os modelos codificados para o FP estudado.

Tabela 5: Modelos propostos para o FP em função da vazão da bomba e da concentração de sal e dos solventes orgânicos acetona e álcool etílico.

Solventes Orgânicos	**Y*cal* (FP)**
Acetona	$10,36 + 0,67.V - 0,46.V^2 - 1,68.C - 3,55.C^2 + 0,30.S - 2,28.S^2 - 1,48.V.C - 0,37.V.S + 0,14.C.S$
Álcool etílico	$6,46 – 0,86.V - 0,49.V^2 - 1,39.C - 2,34.C^2 - 0,32.S - 0,92.S^2 - 0,09.V.C + 0,21.V.S + 0,53.C.S$

Sendo Y*cal* o fator de purificação, *V* a vazão da bomba, *C* a concentração de solvente e *S* a concentração salina.

Analisando-se a Tabela 5 acima percebe-se que o fator de purificação está intimamente relacionado com a vazão da bomba e com as concentrações salinas e de solventes. Nota-se uma influência negativa do solvente na obtenção de um elevado FP, pois com o aumento das concentrações de solvente, houve um decréscimo no fator de purificação, sendo que os melhores valores de purificação foram obtidos em concentrações intermediárias de acetona e álcool etílico. Convém salientar ainda, que a combinação de sal com concentrações elevadas de solventes acarretou na desnaturação das enzimas, favorecendo sua inativação.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os dois solventes utilizados (acetona e álcool etílico) com o intuito de validar os modelos matemáticos para o fator de purificação e também para o rendimento. Dessa forma, somente o modelo matemático

utilizando a acetona como solvente foi validado, apresentando um F calculado (5,14) maior que o F tabelado (3,67), com um coeficiente de determinação (R^2) de 86% com 95% de confiança, como apresentado na Tabela 6.

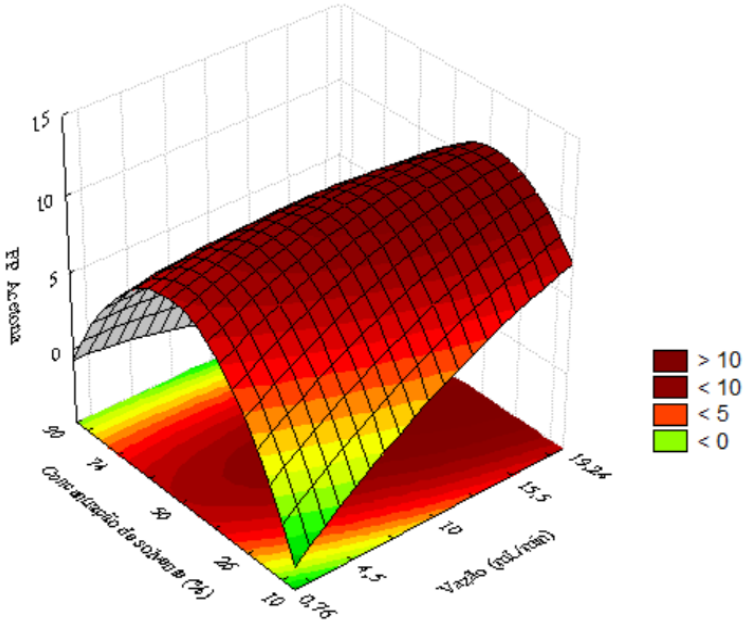
Tabela 6: Análise de variância dos dados obtidos para validação da significância estatística dos modelos propostos para a precipitação das enzimas lipases empregando solventes orgânicos.

Solvente orgânico	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Acetona - FP	Regressão	234,81	9	26,09	5,14
	Resíduo	35,53	7	5,08	
	Total	270,34	16		
Álcool etílico - FP	Regressão	103,31	9	11,48	2,17
	Resíduo	37,09	7	5,29	
	Total	140,4	16		

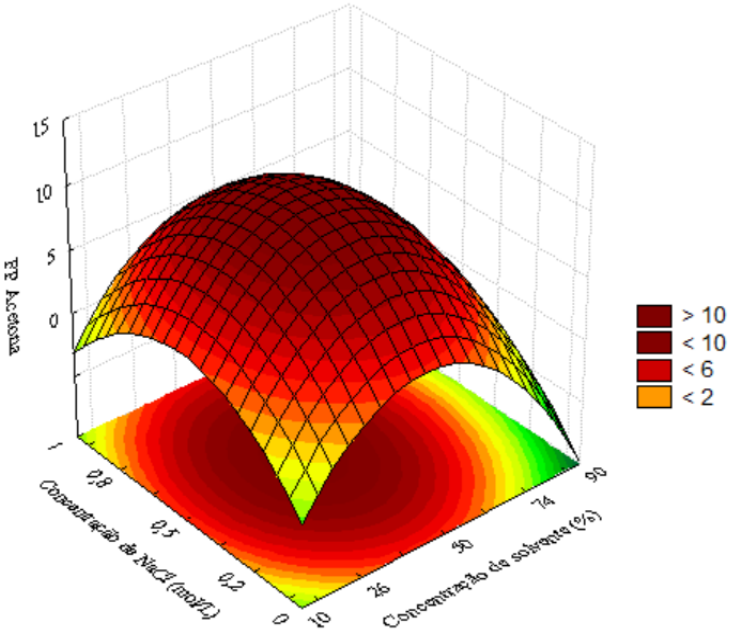
*F tabelado $_{95\%;\ 9;\ 7}$ = 3,67

Na Figura 1 são apresentadas as superfícies de reposta obtidas para a precipitação das lipases com acetona e NaCl após a validação do modelo matemático. Estudando as três superfícies geradas, observa-se que o melhor fator de purificação obtido para a precipitação com acetona se encontra em valores intermediários de concentração de solvente (50%) e concentração salina (0,5 mol/L) e no máximo valor de vazão da bomba (19,24 ml/min). O efeito de interação entre as três variáveis independentes avaliadas sugere que esse é um processo complexo, uma vez que a taxa de adição do solvente orgânico no sistema pode elevar ou reduzir o fator de purificação, requerendo cuidados específicos.

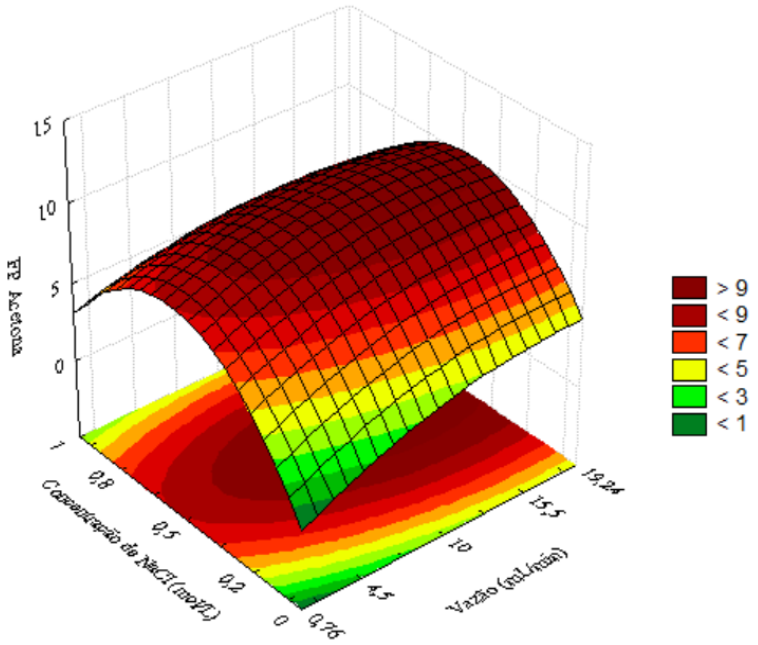
Figura 1: Superfícies de resposta para avaliação do comportamento da precipitação das enzimas lipases em acetona, sendo (a) superfície de resposta para o FP em função da concentração do solvente e da vazão, (b) superfície de resposta para o FP em função da concentração do solvente e da concentração salina e (c) superfície de resposta do FP em função da vazão e da concentração salina.



(a)



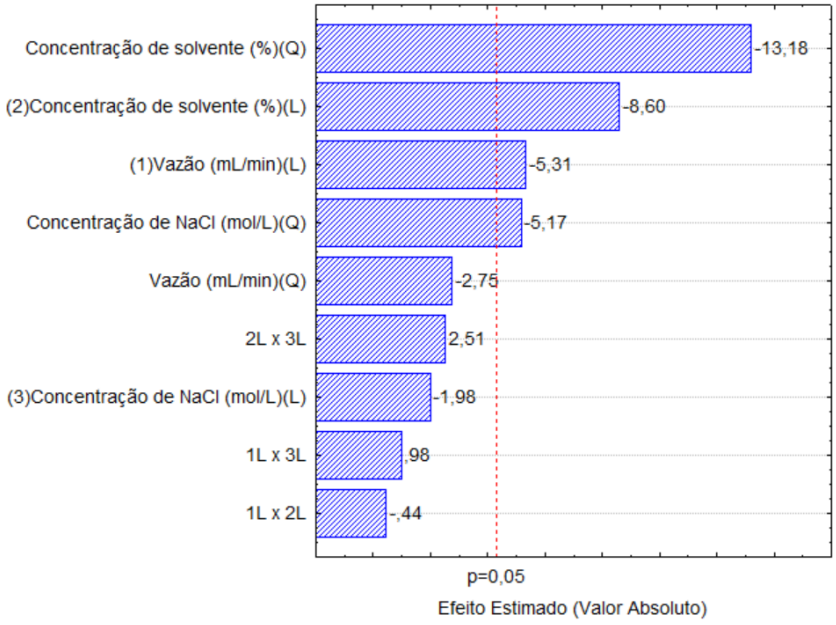
(b)



(c)

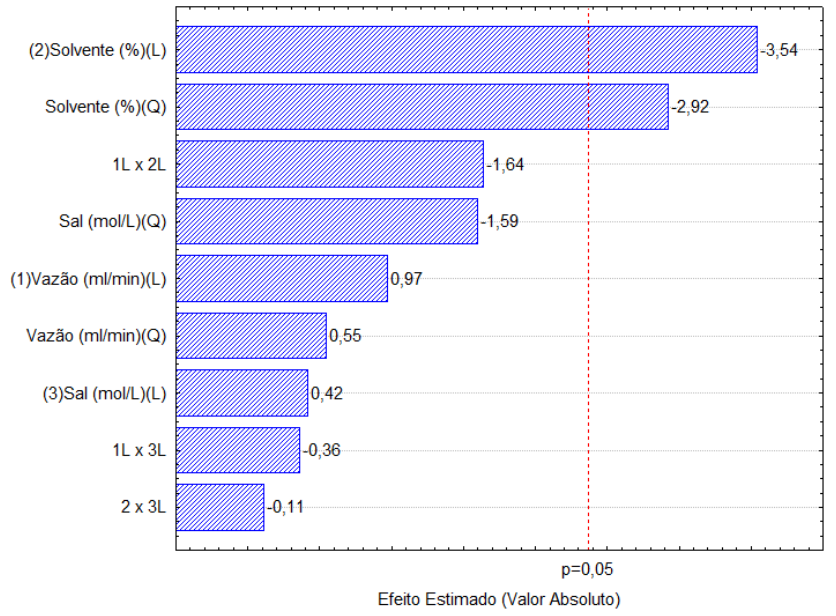
A Figura 2 apresenta o gráfico de Pareto para a precipitação com álcool etílico. É possível observar que as três variáveis independentes (vazão, concentração de solvente e concentração salina) apresentam um efeito significativo negativo no FP, demonstrando que concentrações elevadas de álcool e sal acarretam na diminuição da purificação enzimática, sendo que o mesmo ocorre para a vazão da bomba. Esse fato sugere que elevadas taxas de solvente podem arrastar inibidores juntamente com as enzimas, diminuindo o FP. Somado a isso, elevadas concentrações de álcool etílico podem causar conjuntamente a desnaturação enzimática, acarretando também em perdas de purificação, como já mencionado.

Figura 2: Gráfico de Pareto indicando os efeitos das variáveis independentes sobre o fator de purificação das enzimas lipases na presença de álcool etílico.

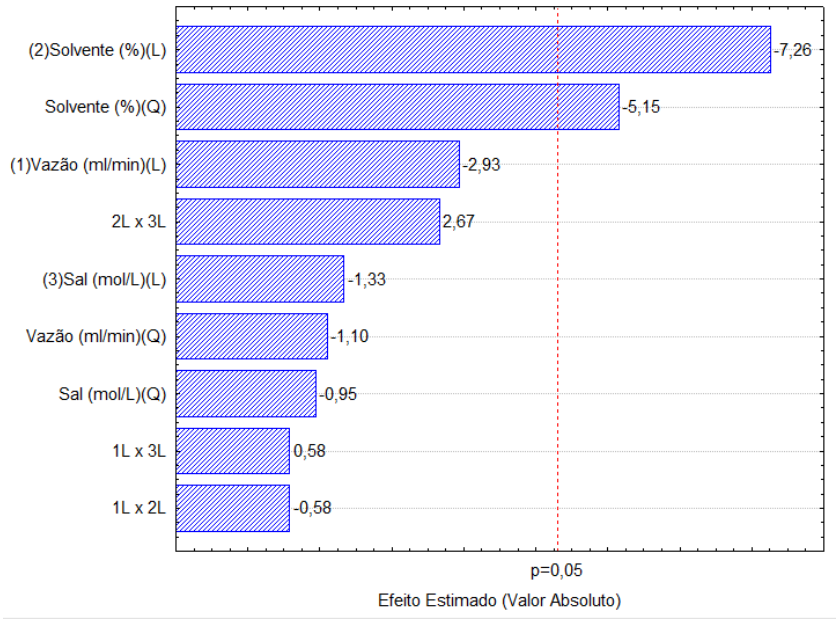


A Figura 3 apresenta os efeitos estimados das variáveis independentes que foram avaliadas na resposta do rendimento da atividade para ambos os solventes.

Figura 3: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis sobre o R das enzimas na presença de (a) acetona e (b) álcool etílico.



(a)



(b)

Com a análise dos gráficos (a) e (b) da Figura 3, observa-se que para ambos os solventes utilizados na precipitação das lipases, a variável que interferiu significativamente no rendimento foi a concentração de solvente, indicando que o ajuste dessa variável é determinante no processo de precipitação das enzimas, demonstrando que a vazão e as concentrações salinas possuem menor influência na atividade e rendimento. Ainda, para ambos os gráficos (a) e (b) da Figura 3, as concentrações de solventes que geraram os maiores valores de rendimento das enzimas são 26% e 50% de acetona/álcool etílico. Após a análise estatística dos dados pode-se observar que as enzimas lipases de *Aspergillus niger* apresentou fatores de purificações relevantes utilizando a mudança de força iônica do meio pela adição de sal (NaCl) e precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol) demonstrando que as condições utilizadas removem os inibidores presentes no extrato enzimático.

Patel et al. (2014) realizou um estudo de precipitação com a enzima lipase, obtida de *Pseudomonas sp*. DMVR46. Testou a precipitação com acetona seguida de cromatografia. Utilizando somente a acetona obteve um FP de 11.08-vezes com 70,37% de rendimento enzimático; já, com a cromatografia obteve um rendimento de 29,74% com 28,95 de FP, mostrando que neste caso a cromatografia foi mais eficiente no quesito concentração de enzimas.

Outro estudo realizado para precipitação da enzima lipase tem autoria de Maldonado et al. (2015), utilizando o microrganismo *Geotrichum candidum*. Testou métodos de precipitação com sulfato de amônio e outro com etanol. A precipitação com sulfato de amônio

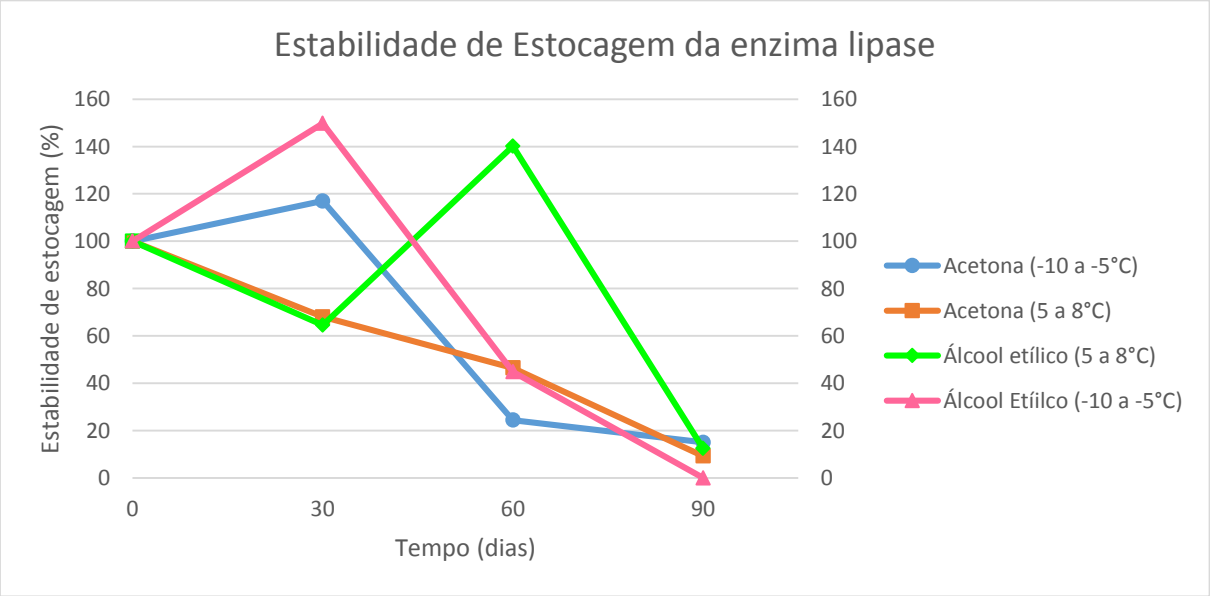
e liofilização resultou em um FP de 50,60-vezes; quando testada a precipitação com 70% de etanol e liofilização obteve um FP de 64,60-vezes; e, testando precipitação somente com 70% de etanol encontrou um FP de 15,33-vezes. O maior R encontrado (139%) foi utilizando concentração salina e liofilização, e, o segundo maior foi para a enzima bruta liofilizada (94%), sendo que para a precipitação com etanol 70% gerou 36,86% de rendimento. Destacando que para Maldonado et al., a liofilização da lipase bruta gerou um FP de 37,2-vezes, mostrando que lipases de diferentes microrganismos requerem diferentes processos de purificação, empregando um número maior ou menor de etapas.

Cabe ressaltar que, neste trabalho, o emprego da mudança de força iônica do meio seguida de precipitação com solventes orgânicos, resultou em fatores de purificação relevantes, viabilizando a proposta apresentada.

3.5 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

Após os processos de precipitação empregados para as enzimas lipases de *Aspergillus niger*, foi analisada a estabilidade enzimática das enzimas. Esta foi analisada com as enzimas precipitadas com acetona e etanol, armazenando uma alíquota de cada em duas faixas de temperatura: de 5 a 8ºC e de -10 a -5ºC. A medida da atividade específica foi avaliada a cada 30 dias, até o momento em que observou-se a perda da atividade das lipases, como representado na Figura 4 a seguir.

Figura 4: Estabilidade de estocagem das enzimas lipases de *Aspergillus niger* quando submetida à precipitação seguida de armagenagem à frio.



Após realizada a precipitação das enzimas com os dois solventes foi realizada a determinação da atividade específica e esta foi monitorada até que as enzimas perdessem seu poder catalítico. Com o monitoramento observou-se que a atividade específica teve um decaimento gradativo no período analisado (90 dias), tanto armazenada na faixa de 5 a 8ºC como entre -10 a -5ºC, quando comparadas suas atividades iniciais e finais.

Observou-se também que após 30 dias de armazenamento, as enzimas acondicionadas em temperaturas negativas apresentou uma elevação na sua atividade, tanto para a precipitada com acetona (117%) quanto para o etanol (149,81%), e, após, teve seu poder catalítico reduzido gradativamente a quase zero em 90 dias de armazenamento.

As enzimas precipitadas com álcool etílico e armazenada em temperaturas entre 5 a 8ºC apresentou um declínio da sua atividade em 30 dias, e, em 60 dias teve um aumento em seu poder catalítico (140,18%). Já, para as lipases precipitadas com acetona e armazenada nessa mesma faixa de temperatura, a atividade específica se comportou diferente de todas as outras condições, pois teve um declinio gradativo da sua atividade em todo o período analisado.

Estes resultados encontrados condizem com os obtidos por Menoncin et al. (2008), que armazenou o extrato enzimático concentrado de lipase de *Penicillium verrucosum* em baixas temperaturas, observando que durante o período de análise de 91 dias, as enzimas apresentaram momentos de diminuição e outros de aumento da atividade quando comparado com sua atividade inicial. Resultados semelhantes foram também obtidos por Rigo et al. (2012) e Smaniotto et al. (2014).

3.6 REAÇÃO HIDROLÍTICA DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

3.6.1 Caracterização do óleo residual de fritura

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os ácidos graxos presentes no óleo residual de fritura, dados em porcentagem.

Tabela 7: Caracterização do óleo residual de fritura em termos de ácidos graxos presentes (CG – Cromatografia Gasosa).

Ácido graxo	(%)
Mirístico (C14:0)	0,10
Palmítico (C16:0)	11,55
Palmitoleico (C16:1)	0,08
Margárico (C17:0)	0,09
Esteárico (C18:0)	5,88
Eládico (C18:1 trans)	20,72
Oleico (C18:1 cis)	46,69
Linoleico conjugado (C18:2 trans)	3,77
Linoleico (C18:2 cis)	8,29
Eicosanoico (C20:0)	0,48
Linolênico (C18:3)	0,13
Gadoleico (C20:1)	0,39
Eicodadienoico (C20:2)	0,22
Behênico (C22:0)	0,59
Lignocérico (C24:0)	0,23

É possível observar que grande parte do óleo residual é composto por ácido oleico (46,69%), ácido eládico (20,72%) e ácido palmítico (11,55%). Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa observou-se que as lipases obtidas do fungo *Aspergillus niger* possui maior afinidade para degradar moléculas oleosas que são constituídas majoritariamente por C18:1 e C16:0. Dessa forma, a presença desses ácidos graxos torna esse óleo um ótimo substrato para a atuação das enzimas lipases.

3.6.2 Hidrólise do óleo residual de fritura em agitador orbital (shaker)

Para este experimento foram empregadas as enzimas purificadas livres e imobilizadas para verificar a degradação do óleo em termos de liberação de ácidos graxos. Após a realização dos testes observou-se que não houve nenhuma liberação de ácido graxo através da reação hidrolítica. Isso ocorreu possivelemente pelo fato de o agitador orbital não conseguir disponibilizar às enzimas os compostos que ela mais possui afinidade para que então sejam degradados, ou seja, o agitador orbital não conseguiu fazer com que o sítio ativo das enzimas entrassem em contato com o óleo para que pudesse ocorrer a degradação. Caso que ocorre

diferentemente no ultrassom, em que as ondas ultrassônicas possivelmente auxiliam o óleo a encontrar os sítios ativos das enzimas e promover assim a degradação da substância oleosa. Outra questão poderia ser a adição extra de solvente (etanol) na solução para promover a homegeinização do meio, acarretando numa possível desnaturação enzimática. Todavia, o uso da água como diluente não foi empregada, pois ela não se homogeiniza com o óleo, não proporcionando um ambiente propício para atuação das enzimas.

3.6.3 Hidrólise do óleo residual de fritura em ultrassom

Neste experimentos foram utilizadas as mesmas condições que para o item 3.6.2, diferenciando-se pelo uso de ultrassom e agitador mecânico. Os resultados aqui encontrados foram satisfatórios, demosntrando que a atuação das ondas ultrassônicas é diferencial na reação hidrolítica das lipases.

Tabela 8: Avaliação da hidrólise enzimática das lipases na degradação do óleo residual de fritura em sistema ultrassônico com seus respectivos resultados de AGL.

Ensaios		**Ácidos Graxos Livres (AGL)**
Enzimas Livres	Acetona	421,60
	Álcool etílico	753,07
Enzimas Imobilizadas	Acetona	27,67
	Álcool etílico	27,80

*AGL: µmol/mL.

Através da Tabela 8 observou-se que a liberação de ácidos graxos livres foi mais expressiva quando utilizadas as enzimas livres do que quando esta apresentava-se imobilizada. Isso pode ocorrer devido à imobilização criar uma barreira entre a enzima e seu substrato, dificultando a atuação das lipases na degradação do óleo por não haver uma interação direta entre ambos. Há também a possibilidade de a imobilização acarretar em uma diminuição da atividade enzimática devido à desnaturação ou inativação por reagentes ou produtos envolvidos na formação da matriz encapsulante (THUDI et al., 2012.)

Além da enorme diferença obervada na liberação de AGLs entre as diferentes condições enzimáticas, observou-se também uma pequena diferença entre os próprios solventes quando utilizadas as enzimas purificadas em sua fase livre, havendo uma liberação de 421,6 µmol/ml de AGL quando precipitada com acetona e uma liberação de 753,07 µmol/ml de AGL quando precipitada com álcool etílico. Resultados estes encontrados quando utilizadas as condições de 1:3 de óleo:solvente e 15% de enzima (v/v), submetido em sistema ultrassônico a

45ºC e uma potência de 50% total do equipamento por um período de 12h.

Estudo realizado por Waghmare e Rathod (2016) mostrou que a aplicação de ultrassom a um sistema líquido resulta no efeito de cavitação e aquecimento. Para o caso de reações enzimáticas, o fenômeno de cavitação exerce uma função importante, compreendendo a geração sequencial, o crescimento e o colapso implosivo de bolhas microscópicas no meio. Essa sequência de acontecimentos produz aquecimento local e também elevada turbulência no sistema. Comumente é observada a explosão de microbolhas de energia elevada e presença de ondas de choque que podem danificar ou inativar a estrutura sensível das enzimas, porém, observou-se que a maioria das enzimas e microrganismos podem tolerar estas condições severas até determinados níveis (YACHMENEV et al., 2009).

A resistência das enzimas à essas circunstâncias pode ser relacionada à presença de pequena quantidade de enzima quando comparado com a circunstância global do sistema. Devido a esse fato, há uma menor probabilidade de as enzimas interagirem com o colapso implosivo de bolhas de cavitação (WAGHMARE E RATHOD, 2016).

Além disso, é conhecido que o processo de cavitação resulta em contato direto do substrato com a superfície da enzima, ativando os sítios catalíticos e aumentando o desempenho das enzimas. Além disso, há relatos de que a agitação simples (agitação orbital) também eleva a difusividade, mas como as reações enzimáticas ocorrem na interface, a agitação mecânica simples não é muito eficiente (WAGHMARE E RATHOD, 2016).

Trabalho realizado por Mulinari (2016) utilizou a enzima lipase bruta nas condições livre e imobilizada, de *Aspergillus niger* para degradação do óleo residual de cozinha através do uso de agitador orbital e ultrassom. Após testes premilinares, observou que o sistema que gerava melhores resultados era em ultrassom. Dessa forma aplicou o planejamento experimental somente nesse sistema. Assim, observou que a lipase imobilizada gerou apenas 11% (6,93 µmol/mL) da quantidade de ácidos graxos liberados pela lipase em extrato livre. Esses resultados mostram que a mesma enzima consegue uma atuação melhor na degradação do óleo residual de fritura quando submetida ao processo de concentração enzimática.

Todavia, como o resultado de liberação de AGL para as enzimas imobilizadas foi significativamente menor que para as enzimas livres, acaba surgindo um empecilho quanto à reutilização enzimática no modo imobilizado. Em contrapartida, como a obtenção das lipases através do fungo *Aspergillus niger* é suficientemente simples e barata, os custos para uso das enzimas em sua forma aquosa também pode ser considerada.

4 CONCLUSÕES

O uso de precipitação com solventes orgânicos (acetona e/ou álcool etílico) associada à adição de sal para realizar a mudança de força iônica do meio proporcionou a ativação das enzimas, supostamente devido à remoção de inibidores.

Os resultados mostraram que a mudança da força iônica seguida por precipitação com solvente acetona propiciou um aumento no fator de purificação em 11,60-vezes, com um rendimento enzimático de 221,39%. Da mesma forma, para o solvente álcool etílico, o FP teve um aumento de 9,8-vezes, seguido de 156,73% de rendimento das enzimas. Os resultados obtidos são considerados promissores quando comparados com dados da literatura, demonstrando que uma técnica de purificação simples e de baixo custo pode possuir a mesma eficácia que algumas técnicas cromatográficas, ou em alguns casos, ser ainda mais eficiente que elas.

O acompanhamento da estabilidade das enzimas lipases apontou determinados picos de atividade específica durante o período de análise, bem como algumas quedas de atividade, mas que, em um contexto global, a atividade diminuiu gradativamente no decorrer de 90 dias.

Com relação à hidrólise do óleo residual de fritura com as enzimas livres, verificou-se que a relação otimizada óleo:solvente de 1:3 com 15% de enzim (v/v) gerou uma enorme liberação de ácidos graxos livres quando utilizadas as enzimas precipitadas com acetona (421,60 μmol/mL) e quando precipitadas com álcool etílico (753,07 μmol/mL). Já, utilizando as lipases imobilizadas no teste de degradação do óleo residual, houve liberação de 27,67 μmol/mL de ácidos graxos livres para as enzimas precipitadas com acetona e liberação de 27,80 μmol/mL quando precpitadas com álcool etílico.

O método de ultrassom gera cavitação e aquecimento do sistema, proporcionando contato direto do substrato com a interface da enzima. Esse contato direto aumenta a eficiência da reação, elevando por consequência os níveis de conversão de substrato em produto (conversão de triglicerídeos em ácidos graxos livres).

Os resultados de liberação de ácidos graxos livres pela hidrólise do óleo mostram que o uso das enzimas livres purificada se torna viável para essa finalidade. Assim, a hidrólise do óleo residual de fritura em meio ultrassônico, catalisada pelas enzimas lipases extraídas do fungo *Aspergillus niger* pode ser considerada uma promissora estratégia de pré-tratamento do óleo por realizar significativa conversão das moléculas de óleo bruto em ácidos graxos livres.

Além disso, a proposta desse trabalho resulta em uma promissora alternativa para uso de lipases microbianas purificadas no pré-tratamento de óleo residual de fritura, minimizando

possíveis danos causados ao meio ambiente pelo despejo indevido de óleos residuais.

REFERÊNCIAS

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z. NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by Aspergillus niger; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 9, p. 148-154, 2016.

ARAÚJO, C. D. M.; ANDRADE, C. C.; SOUZA E SILVA, E.; DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 27, p. 445-452, 2013.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R.L.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. C.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of Bacillus in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography** B. v. 879, p.3853-3858, 2011.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. C. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

CARVALHO, T.; FONITELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F. F. Evaluating aqueous two-phase systems for Yarrowia lipolytica extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**. v. 53, p. 259-266, 2017.

CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Braz Arch Biol Techn.**, v. 48, p. 79-84, 2005.

CORTEZ E. V., PESSOA JR A. Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**. v.35, p.277-283, 1999.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolate ed Streptomyces hygroscopucus. **Food Chemistry**. v. 105, p. 612-618, 2007.

DALL AGNOL, A.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; TREICHEL, H.; BIBLIO, D.; VARGAS, G. D. L. P. Produção de lipase por *Aspergillus* sp. utilizando torta de canola como substrato. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 19., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: ABEQ, 2013.

FORTES, C. C. S.; DANIEL-DA-SILVA, A. L.; XAVIER, A. M. R. B.; TAVARES, A. P. M. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering & Processing**: Process Intensification. p. 1-8, 2017.

FREIRE, D. M.; TELES, E. M.; BOM, E. P.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by *Peniillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** California, v. 63, n. 4, p. 63-65, 1997.

GOLAKI, B. P.; AMINZADEH, S. KARKHANE, A. A.; YAKHCHALI, B.; FARROKH, P.; KHALEGHINEJAD, S. H.; TEHRANI, A. A.; MEHRPOOYAN, S. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous Cohnella sp. A01. **Protein Expression and Purification**. v. 109, p. 120-126, 2015.

GOLUNSKI, S. M. **Purificação de Inulinase de *Kluyveromyces Marxianus* Nrrl Y-7571 Produzida por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Precipitação e Ultrafiltração**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, 2011.

GOLUNSKI, S.; SILVA, M. F.; MARQUES, C. T.; ROSSETO, V.; KAISER, R. R.; MOSSI, A. J.; RIGO, D.; DALLAGO, R. M.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Purification of inulinases by changing the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 57-63, 2017.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. MG. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochemistry: Elsevier. v.35, p. 85-90, 1999.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S.; DEVI, G. N.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter sp.* AU07. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 647-657. 2016.

KAMINI N.R., MALA J.G.S., PUVANAKRISHNAN R.; Lipase production from *aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process biochemistry**, v. 33, p. 505-511, 1998.

KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 in solid medium containing waste grease. **Biosource Technology**, v. 120, p. 300-304, 2012.

LEAL, M. C. M. R., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G., SANT`ANNA JR., G. L. Hydrolytic enzymes as coajuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p.175-180, 2002.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.3, 2001. 293 p.

MALDONADO, R. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FOGAÇA, F. M.; RAMOS, G. G.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Evaluationofpartialpurification andimmobilizationoflipasefrom Geotrichumcandidum. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 4, p. 321-326, 2015.

MAHADIK, N.D., PUNTAMBEKAR, U.S., BASTAWDE, K.B., KHIRE, J.M., GOKHALE D.V.; Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B., FURIGO JR, A. Aplicação de Lipases do Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. **Química Nova.** v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MENONCIN S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the Extraction, Concentration, and Partial Characterization of Lipases Obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. **Food Bioprocess Technol**. v.3, **p.**537-544, 2010.

MONTEIRO V. N., SILVA R. N. Aplicações Industriais da Tecnologia Enzimática. **Processos Químicos**. Goiânia: SENAI/DR, v.3, n.5, ano 3, p.10-23, jan/jun 2009.

MULINARI, J. **PRÉ-TRATAMENTO DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA UTILIZANDO LIPASE DE *Aspergillus niger* EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, 2016.

MULINARI, J.; VENTURIN, B.; SBARDELOTTO, M.; DALL AGNOL, A.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; BALDISSARELLI, D. P.; MODKOVSKI, T. A.; ROSSETTO V.; DALLA ROSA, C.; REICHERT JR, F. W.; GOLUNSKI, S. M.; VIEITEZ, I.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry.** v. 35, p. 313-318, 2017.

PATEL, V.; NAMBIAR, S.; MADAMWAR, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from Pseudomonas sp. DMVR46: Partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. **Process Biochimistry**. v. 49, p. 1673-1681, 2014.

PORTO, T.S.; MEDEIROS e SILVA, G.M.; PORTO,C.S.; CAVALCANTI, M.T.H; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA-JR, A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Instensification**, v. 7, p.716-721, 2008.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007.

RIGO, E.; NINOW, J. R.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; RENOMATTO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Preliminary Characterization of Novel Extra-cellular Lipase from *Penicillium crustosum* Under Solid-State Fermentation and its Potential Application for Triglycerides Hydrolysis. **Food Bioprocess Technol**. v.5, p.1592-1600, 2012.

RISSO F. V. A.; MAZUTTI M. A.; TREICHEL H.; COSTA F.; MAUGERI F.; RODRIGUES M. I., Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571. **Food Bioprocess Technol**, 2009, online first, DOI: 10.1007/s11947-009-0272-1.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous twophase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1-13, 2012.

SALIHU, A. A.; BALA, M.; ALAM, MD. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**. v.10, p.850-859, 2016.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Concentration, partial characterization,

and immobilization of lipase extract from P. brevicompactum by solid-state fermentation of babassu cake and castor bean cake. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, p. 755-766, 2011.

SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; PAROUL, N.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.45, p.294-302, 2014.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; DALL AGNOL, A.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S.; BALDONI, D. B. ; BEVILACQUA, C. B. ; JACQUES, R. J. S.; VARGAS, G. D. L. P. ; MOSSI, A. J. Lipase Production from a newly Isolated Aspergillus Niger by Solid State Fermentation using Canola Cake as Substrate. **Current Biotechnology**, v.5, p.1-7, 2016.

THUDI, L.; JASTI, L. S.; SWARNALATHAA, Y.; FADNAVIS, N. W.; MULANI, K.; DEOKAR, S.; PONRATHNAM, S. Enzyme immobilization on epoxy supports in reverse micellar media: Prevention of enzyme denaturation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.74, p. 54-62, 2012.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato.** 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai, Erechim, 2004.

WAGHMARE, G. V.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 32, p. 60-67, 2016.

ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHU, D.; OHTA,Y.; AND WANGA, Y., Purification and characterization of inulinase from Aspergillus niger AF10 expressed in Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 35, p. 272–275, 2004.

CONCENTRAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus niger* POR PRECIPITAÇÃO COM SAL E SOLVENTES ORGÂNICOS E POSTERIOR APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária

Karina Paula Preczeski - Orientanda

Profª Drª Helen Treichel – Orientadora

Drª Simone Maria Golunski – Co-orientadora

Erechim/RS, Julho de 2017