

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GRAZIELLE PEREIRA REIS DE SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO RESIDUAL
DE FRITURA CATALISADA POR COMBI-LIPASES**

**ALFENAS/MG
2022**

GRAZIELLE PEREIRA REIS DE SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO RESIDUAL DE
FRITURA CATALISADA POR COMBI-LIPASES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biomoléculas/ Tratamento de
Efluente

Orientador: Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Caroline Molgero Da
Rós

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Sousa, Grazielle Pereira Reis de.

Otimização da hidrólise enzimática do óleo residual de fritura catalisada por combi-lipases. / Grazielle Pereira Reis de Sousa. - Alfenas, MG, 2022.

41 f. -

Orientador(a): Ernandes Benedito Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Planejamento de misturas . 2. Hidrólise. 3. ; Ácidos graxos livres. I. Pereira, Ernandes Benedito, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GRAZIELLE PEREIRA REIS DE SOUSA

**OTIMIZAÇÃO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO RESIDUAL DE
FRITURA CATALISADA POR COMBI-LIPASES**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 04 de março de 2022

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP - Araraquara



Documento assinado eletronicamente por **Ernandes Benedito Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2022, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heitor Buzetti Simões Bento, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0686061** e o código CRC **1A21CEC7**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me dar saúde e disposição para correr atrás de meus objetivos.

À minha família, especialmente à minha mãe, Denise, por ter sido uma mãe incrível e um ser humano extraordinário na minha vida e na vida dos seus alunos, por sempre ter me dado forças, apoiado e acreditado no meu potencial, mesmo não estando mais presente fisicamente. Ao meu pai, Admarães e ao meu irmão, Luiz Felipe, por todo apoio e incentivo nos meus objetivos.

Ao orientador Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira, pela dedicação, apoio, ensinamentos e pelas palavras sábias nos momentos necessários e por me incentivar durante os experimentos permitindo um crescimento profissional e pessoal. Ter você como orientador fez toda diferença.

À coorientadora Profa. Dra. Patrícia Caroline Molgero Da Rós, pela dedicação, apoio, correções necessárias, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho. A sua coorientação também fez toda diferença.

Às parcerias de laboratório, principalmente a minha amiga Thais e ao Doutorando Willian, pela colaboração na realização desse trabalho e por sempre se mantiveram presente.

Aos amigos do Mestrado, pelo companheirismo nas horas felizes e nas horas difíceis, em especial a minha amiga Eduarda pelo o apoio e a amizade estabelecida durante todos esses anos desde a graduação, contribuindo externamente na realização desse estudo.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas por permitir a realização deste trabalho.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo apoio na realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 01.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

Os óleos e as gorduras são os chamados materiais graxos de origem vegetal e animal e pertencem ao grupo dos lipídios. Os óleos vegetais representam um dos principais produtos extraídos de plantas, sendo que aproximadamente 2/3 são usados em produtos alimentícios, fazendo assim parte integrante da dieta humana. O uso do óleo de soja em frituras para preparo de alimentos é frequentemente utilizado em restaurantes, padarias, domicílios e na indústria alimentícia. Durante o processo de fritura, o óleo quando submetido em temperatura elevadas por longos períodos, podem ocorrer diversas alterações degradantes: podendo hidrolisar ou/oxidar, resultando em formação de produtos indesejáveis. Consequentemente, resulta no acúmulo de óleos residuais e formação de efluente, o que leva o descarte forma inadequada desses resíduos, acarretando possíveis danos nocivos na fauna, flora e nos corpos hídricos. Entretanto, é crescente a preocupação em adotar ações para reduzir, reutilizar e reciclar os resíduos gerados pelo óleo resultante de frituras para preservação do meio ambiente e principalmente dos recursos hídricos. Portanto, a técnica de planejamento experimental de misturas utilizando diferentes fontes de lipases na hidrólise enzimática dos triglicerídeos, torna se uma alternativa biotecnológica no tratamento do óleo residual de fritura. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a reação de hidrólise do óleo residual de fritura catalisada por combilipases comerciais: pâncreas de porco (LPP), *Rhizopus oryzae* (LRO) e *Burkholderia cepacia* (LBC), empregando diferentes concentrações (g) e proporções de unidades de atividade (U/g), a fim de determinar as condições que favorecem a maior conversão em ácidos graxos. Inicialmente, foram realizadas a determinação de atividade enzimática das lipases LPP, LBC e LRO, cujo objetivo foi de quantificar a unidade de atividade (U/g) de cada enzima. Foram realizados 10 experimentos com diferentes concentrações (g) e proporção de unidades de atividade (U/g), sendo que nos experimentos 1 a 3, as lipases foram utilizadas de forma livre. Nos experimentos de 4 a 6 utilizaram-se duas lipases com a mesma quantidade de unidades de atividade (1000 U/g). O experimento 7 que representa o ponto central utilizou uma proporção 1/3 de 2000 U/g para cada enzima. Nos experimentos de 8 a 10, as três lipases foram utilizadas nas proporções 2/3, 1/3 e 1/3. Durante os ensaios realizados, pode observar que o experimento 10 apresentou resultados bastante promissor atingindo uma porcentagem de hidrólise de 96,22% e uma conversão em ácidos graxos livres (AGL) de 1730,12 mMol/L em 8 h de reação, cujos resultados foram superiores ao do ponto central (experimento 7) que utilizou 1/3 (2000 U/g) atingindo 42,8% de hidrólise e 759,411 mMol/L de AGL.

Palavras-chave: Planejamento de misturas; Hidrólise; Ácidos graxos livres.

ABSTRACT

Oils and fats are the so-called fatty materials of plant and animal origin and belong to the group of lipids. Vegetable oils represent one of the main products extracted from plants, with approximately 2/3 being used in food products, thus making an integral part of the human diet. The use of soybean oil in frying for food preparation is often used in restaurants, bakeries, households and in the food industry. During the frying process, when the oil is subjected to high temperatures for long periods, several degrading changes can occur: it can hydrolyze or/and oxidize, resulting in the formation of undesirable products. Consequently, it results in the accumulation of residual oils and effluent formation, which leads to the improper disposal of these residues, causing possible harmful damage to fauna, flora and water bodies. However, there is a growing concern about adopting actions to reduce, reuse and recycle waste generated by oil resulting from frying to preserve the environment and especially water resources. Therefore, the technique of experimental design of mixtures using different sources of lipases in the enzymatic hydrolysis of triglycerides, becomes a biotechnological alternative in the treatment of residual frying oil. Therefore, the present work aimed to optimize the hydrolysis reaction of residual frying oil catalyzed by commercial combi-lipases: Porcine Pancreas (LPP), *Rhizopus oryzae* (LRO) and *Burkholderia cepacia* (LBC), using different concentrations (g) and proportions of activity units (U/g), in order to determine the conditions that favor the highest conversion to fatty acids. Initially, the determination of the enzymatic activity of the lipases LPP, LBC and LRO was carried out, whose objective was to quantify the unit of activity (U/g) of each enzyme. Ten experiments were carried out with different concentrations (g) and proportion of activity units (U/g), and in experiments 1 to 3, lipases were used freely. In experiments 4 to 6, two lipases with the same amount of activity units (1000 U/g) were used. Experiment 7, which represents the central point, used a 1/3 ratio of 2000 U/g for each enzyme. In experiments 8 to 10, the three lipases were used in the proportions 2/3, 1/3 and 1/3. During the tests carried out, it can be observed that experiment 10 showed very promising results, reaching a percentage of hydrolysis of 96.22% and a conversion to free fatty acids (FFA) of 1730.12 mMol/L in 8 h of reaction, whose results were superior to the central point (experiment 7) which used 1/3 (2000 U/g) reaching 42.8% hydrolysis and 759.411 mMol/L of FFA.

Keywords: Mixture planning; Hydrolysis; Free fatty acid

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figure 1 – | Kinects results of the simplex mixture design..... | 29 |
| Figure 2 – | Normality test of model residuals..... | 31 |
| Figure 3 – | Response surface of the model predicted by the simplex. mixture design analysis..... | 31 |
| Figure 4 – | Contour plot of the model predicted by the simplex mixture design analysis..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 – | Composição de ácido graxo em óleo vegetal..... | 16 |
| Table 1 – | Experimental conditions to perform the simplex mixture design analysis. Input variables are presented in coded and real values (in grams) | 26 |
| Table 2 – | Results obtained for experimental conditions required for the simplex mixture analysis | 29 |
| Table 3 – | ANOVA of Hydrolysis % from the simplex mixture design analysis($\alpha=0.01$) | 30 |
| Table 4 – | Lipase compositions resulting in high Hydrolysis%..... | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---------------------------------------|
| AcGs | Ácidos Graxos |
| AGL | Ácidos Graxos Livres |
| LBC | Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> |
| LPP | Lipase Pâncreas de Porco |
| LRO | Lipase <i>Rizopus oryzae</i> |
| TAGs | Triacilgliceróis |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL..... | 13 |
| 2 | OBJETIVO..... | 15 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| | CAPÍTULO 1..... | 16 |
| 3 | REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO..... | 16 |
| 3.1 | CLASSIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS..... | 16 |
| 3.2 | MATÉRIA-PRIMA: ÓLEOS VEGETAIS..... | 17 |
| 3.3 | LIPASES..... | 17 |
| 3.4 | FATORES QUE INTERFEREM A VELOCIDADE E CINÉTICA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES..... | 19 |
| 3.5 | HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS..... | 19 |
| 3.6 | PLANEJAMENTO DE MISTURA..... | 20 |
| | CAPÍTULO 2 - ARTIGO SUBMETIDO..... | 20 |
| 4 | ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION..... | 22 |
| 1 | INTRODUCTION..... | 23 |
| 2 | MATERIALS AND METHODS..... | 25 |
| 2.1 | Biocatalysts..... | 25 |
| 2.2 | Waste cooking oil characterization..... | 25 |
| 2.3 | Determination of enzymatic activities..... | 25 |
| 2.4 | Enzymatic hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by lipase blends: Mixture design and data analysis..... | 25 |
| 3 | RESULTS AND DISCUSSION..... | 28 |
| 3.1 | Characterization of waste cooking oil..... | 28 |
| 3.2 | Optimizing the hydroesterification of waste cooking oil using the simplex centroid mixture design..... | 28 |
| 4. | CONCLUSION..... | 33 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES..... | 37 |
| | REFERÊNCIAS..... | 38 |
| | ANEXO 1 – CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO/ E-MAIL..... | 41 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Óleos e gorduras podem ser obtidos de plantas e em algumas espécies de animais. As características físicas de uma gordura ou óleo dependem do grau de insaturação, do comprimento das cadeias de carbono e variáveis de processamento. Além disso, são compostos majoritariamente formados por triacilgliceróis (TAGs) acompanhados de menores quantidades de outros lipídios importantes como monoglicerídeos e diglicerídeos (emulsificantes); ácidos graxos livres; tocoferóis (antioxidantes); proteínas, esteróis e vitaminas (ANVISA, 2018; ISEO, 2016).

Os triglicerídeos mais comuns presentes em óleos e gorduras são estruturalmente derivados de 6 a 24 ácidos graxos de cadeia de carbono. Os grupos acila são geralmente lineares e possuem um número par de carbonos. Eles podem ser saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. No último caso, as ligações duplas não são conjugadas (BRAUN *et al.*, 2020).

Óleos e gorduras possuem diversas aplicações, sendo que uma delas é no preparo de alimentos, que durante o processamento através do método de fritura, utilizado com frequência nos grandes centros urbanos como em restaurantes, domicílios, padarias e indústrias de processamento de alimentos, que ao serem submetidos em temperaturas elevadas por longos períodos, podem ocorrer diversas alterações, podendo hidrolisar ou/e oxidar, resultando em formação de produtos indesejáveis como, por exemplo, peróxidos, hidroperóxidos, dienos conjugados, hidróxidos e cetonas. Uma vez ocorrido essas transformações indesejáveis, fica inviável a sua reutilização, pois diminuem a qualidade nutricional e a segurança do óleo devido aos produtos de degradação (PCM FREIRE *et al.*, 2013; ZAMINDAR, N *et al.*, 2017).

Conseqüentemente, a falta de um gerenciamento adequado nesses estabelecimentos resulta no acúmulo de óleos residuais e formação de efluente, dificultando aos proprietários desses estabelecimentos encontrarem um destino adequado para esses resíduos que ao caírem na rede coletora interferem diretamente na eficiência das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Em temperaturas mais baixas a gordura presente no efluente tende a se solidificar, provocando entupimentos e extravasamentos na rede coletora (SOUZA; SOUZA, 2018).

É crescente a preocupação em adotar ações para reduzir, reutilizar e reciclar os resíduos gerados pelo óleo resultante de frituras para preservação do meio ambiente e principalmente dos recursos hídricos (SANTOS, MARTINAZZO & FREITAS, 2018).

Contudo, os impactos negativos dos óleos residuais podem ser minimizados pela utilização de enzimas hidrolíticas como as lipases, que em pressões e temperaturas moderadas,

os triacilgliceróis (TAGs) podem ser hidrolisados lentamente por reações consecutivas com água ou vapor para produzir AGs e glicerol. (LV *et al.*, 2018).

A hidrólise enzimática de óleos vegetais é uma alternativa ao processo químico que busca superar os inconvenientes da rota convencional (elevadas condições de temperatura 250 °C e pressão 4,83 mPa), visando fornecer produtos com baixo custo energético por meio da condução da reação em condições mais amenas de temperatura e pressão (MAROTTI *et al.*, 2017) onde a lipase hidrolisa os triglicerídeos na interface óleo-água e exibem uma alta seletividade que leva a produtos de alta qualidade com menos compostos colaterais da reação. (KYRIACOS, 2020; ZENEVICZ *et al.*, 2015).

Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases – EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (óleos e gorduras) em meios aquosos. Em meios não-aquosos, estas enzimas catalisam a síntese de ésteres industriais, como biolubrificantes, por reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (ADLERCREUTZ, 2013; BASSO e SERBAN, 2019; KAPOOR, GUPTA, 2012;).

Com o aumento na velocidade na industrialização, o planejamento de experimentos tornou-se importante nos processos produtivos, pois gera economia e qualidade. Um desses tipos de planejamento é o experimental de mistura onde os experimentos de misturas são aqueles em que as propriedades estudadas, dependem basicamente das proporções relativas entre os constituintes e não das quantidades individuais (LEITE, 2018).

Neste contexto, a otimização na reação de hidrólise do óleo residual de fritura catalisada por um combi-lipases, torna-se uma alternativa inovadora para a obtenção de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, os quais são importantes precursores na indústria farmacêutica, cosmética, oleoquímica, na produção de biodiesel, entre outros de interesse comercial.

2 OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi avaliar por uma rota mais ecológica, as diferentes concentrações (g) e proporções de unidade de atividade (U/g) de combi-lipases comerciais de diferentes fontes: pâncreas de porco (LPP), *Rhizopus oryzae* (LRO), *Burkholderia cepacia* (LBC), na otimização da hidrólise do óleo residual de fritura.

O objetivo geral do projeto foi alcançado mediante à execução dos seguintes objetivos específicos:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinação de atividade enzimática do combi-lipase mais ativo (U/g);
- b) Determinação das condições ótimas que favorecem a maior conversão de ácidos graxos na otimização da reação de hidrólise;
- c) Realização da hidrólise enzimática a partir da condição ótima prevista no planejamento experimental de mistura para o pré-tratamento do óleo residual de fritura na obtenção de ácidos graxos livres.

A dissertação do mestrado está dividida em dois capítulos, além desta introdução (item 1) e dos objetivos propostos e alcançados (item 2).

O capítulo 1 traz uma revisão da literatura/ desenvolvimento (item 3) que aborda sobre os lipídeos e suas classes, os óleos vegetais, as lipases e suas características, aplicação destas lipases na hidrólise, a matéria prima principal utilizada no trabalho e o planejamento de misturas. Dessa forma esse capítulo embasa a pesquisa, as discussões e as considerações abordadas.

O capítulo 2 (item 4) contempla um artigo intitulado: “ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION” submetido no periódico indexado CATALYSIS LETTERS. Esse artigo aborda a otimização da hidrólise enzimática catalisada por combi-lipases.

CAPÍTULO 1

3 REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO

Este capítulo aborda sobre os lipídeos e suas classes, os óleos vegetais, as lipases e suas características, aplicação destas lipases na hidrólise, a matéria prima principal utilizada no trabalho e o planejamento de misturas.

3.1 CLASSIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os lipídios podem ser classificados em principalmente como simples, complexos, precursores e derivados. Os lipídeos classificados como simples: são ésteres de ácidos graxos com vários álcoois, pertence a esse grupo: gorduras e cera. Os lipídeos complexos são ésteres de ácidos contendo outros grupos além de um álcool e de um ácido graxo, pertencem a esse grupo os fosfolipídeos, glicolipídeos (glicoesfigolipídeos) e outros lipídeos complexo, tais como sulfolipídeos, aminolipídeos e lipoproteína. Os lipídios precursores e seus derivados, podem ser incluídos os ácidos graxos, glicerol e esteróis, aldeídos graxos e corpos cetônicos, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e hormônios (MCA SANTANA *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta a composição de ácidos graxos em diferentes tipos de óleos comestíveis.

Tabela 1 : Composição de ácido graxo em óleo vegetal.

| Ácido graxo (% em massa) | Óleo Vegetal | | | | |
|--------------------------|--------------|------|---------|-------|------|
| | Canola | Coco | Macaúba | Palma | Soja |
| Láurico C12:0 | - | 47,1 | - | - | - |
| Mirístico C14:0 | - | 18,8 | - | 1,2 | - |
| Palmítico C16:0 | - | 7,9 | 18,7 | 46,8 | 10,5 |
| Palmitoleico C16:1 | 4,8 | - | 4,0 | - | - |
| Esteárico C18:0 | - | 2,6 | 2,8 | 3,8 | 3,2 |
| Oleico C18:1 | 60,0 | 6,1 | 53,4 | 37,6 | 22,3 |
| Linoleico C18:2 | 21,4 | 1,6 | 17,7 | 10,5 | 54,5 |
| Linolênico C18:3 | 7,8 | - | 1,5 | - | 8,3 |

Fonte: MARROTI *et al* (2017).

3.2 MATÉRIA-PRIMA: ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais representam um dos principais produtos extraídos de plantas, sendo que aproximadamente 2/3 são usados em produtos alimentícios, fazendo assim parte integrante da dieta humana. Uma das fontes para extração de óleo vegetal mais presentes na alimentação humana que representa a principal oleaginosa anual produzida e consumida no mundo e sendo o principal produto do agronegócio brasileiro. Tem como importância fundamental O gerenciamento eficiente do agronegócio da soja, por meio da adoção de tecnologias que visam reduzir riscos e custos e aumentar a produtividade de forma sustentável (EMBRAPA, 2020).

Estudos realizados por Borges e colaboradores (2015), demonstra que o óleo vegetal tem maior suscetibilidade à degradação, quando comparado à gordura vegetal hidrogenada, diante de elevadas temperaturas por tempo prolongado da utilização sem troca de óleo.

As condições de fritura não saturam os ácidos graxos insaturados, embora a proporção de ácidos graxos saturados para insaturados mude devido à degradação e polimerização dos ácidos graxos insaturados. O processo de fritura também resulta em um aumento no nível de “*compostos polares*” (mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres e ácidos graxos oxidados) formados durante a fritura / aquecimento de alimentos no óleo (ISEO, 2016).

3.3 LIPASES

As lipases são produzidas a partir de células animais, vegetais e microbianas de diferentes especificidades de substrato, seletividades e propriedades bioquímicas (RAMNATH; SITHOLE; GOVINDEN, 2017).

As lipases microbianas consideradas universais na natureza e são comercialmente substanciais devido ao baixo custo de fabricação, estabilidade superior e mais disponibilidade do que as lipases de origem animal e vegetal. Lipases microbianas naturais ou recombinantes são geralmente utilizadas em diversas aplicações de bioengenharia (CHANDRA *et al.*, 2020).

A utilização de lipases mostra-se eficaz do que as sínteses químicas comuns em aplicações industriais como farmacêutica, cosmética, oleoquímica, detergentes e fragrâncias. Além de seu papel vital em outras aplicações, como alimentos, biossensores, couro, polpa de papel e tratamento de águas residuais ricas em lipídios (HELAL *et al.*, 2021).

As lipases (éster triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) desempenham uma pluralidade de funções em diversos setores industriais pela sua ampla especificidade por substratos, disponibilidade comercial e sua capacidade de atuar em concentrações de substrato

bem elevadas, tanto em ambientes aquosos (natural dessa classe de enzimas), quanto em solventes orgânicos (RODRIGUES *et al.*, 2019; SEDDIGI *et al.*, 2017).

A atividade *in vivo* das lipases é a hidrólise de triacilgliceróis (ZECHNER *et al.*, 2012), e elas podem ser usadas *in vitro* para catalisar reações como esterificação (AGUIEIRAS *et al.*, 2019; BARSÉ *et al.*, 2019; CRUZ *et al.*, 2018), transesterificação (; BAUWELINCK *et al.*, 2018; LÖFGREN *et al.*, 2019), interesterificação (ou acidólise) (ABED *et al.*, 2018; CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018). Na hidrólise, a molécula de água libera íons de H⁺ e OH⁻ na solução, onde o hidrogênio aloja em uma parte da molécula e a hidroxila de aloja em outra parte diferente da molécula, resultando na formação de outros compostos. Na esterificação ocorre quando há um álcool e um ácido carboxílico que origina de água e o próprio éster e a transesterificação são a obtenção do éster a partir de outro éster com um álcool (KYRIACOS, 2020).

As lipases são classificadas quanto à sua regioespecificidade versus as diferentes posições dos triglicerídeos, ou seja, a capacidade das lipases de hidrolisar especificamente ou não especificamente os ácidos graxos ligados às diferentes posições da estrutura do glicerol (RAMNATH, SITHOLE, GOVINDEN, 2017).

No trabalho desenvolvido podemos citar as três lipases de diferentes fontes utilizadas: *Burkholderia cepacia* (LBC), *Rhizopus oryzae* (LRO) e a de pâncreas de porco (LPP).

As lipases oriundas de *Burkholderia* possuem como características: boa estabilidade a alta alcalinidade; estabilidade térmica; tolerância a solventes orgânicos; atividade enzimática em diferentes pHs; e não toxicidade ao ambiente. Além de apresentarem uma boa atividade catalítica em diferentes substratos (CASTIGLIONI, COSTA, ALEGRE, 2017).

O fungo *Rhizopus oryzae* foi relatado como ótimo produtor de lipase. O *Rhizopus oryzae* é um fungo filamentosos do gênero *Rhizopus sp.*, capaz de produzir diferentes substâncias, como enzimas (celulases, lipases, proteases, tanases), ácidos orgânicos (ácido lático e fumárico), compostos aromáticos e corantes. A lipase de *Rhizopus oryzae* possui forte regioespecificidade além de ter uma alta termoestabilidade, excelente atividade em uma ampla faixa de valores de pH e temperatura apresentando uma maior estabilidade (.HELAL *et al.*, 2021).

A lipase do pâncreas de porco (LPP) é composta por 449 aminoácidos em uma única cadeia e é uma das lipases mais utilizadas devido ao seu baixo preço em relação a outras lipases, apresentando melhor atividade em pH alcalino e temperatura variável (RIAL *et al.*, 2020)

A lipase pancreática é relatada como mais vantajosa do que as lipases microbianas em ambiente orgânico devido à sua alta seletividade, grande tolerância a solventes, alta atividade

catalítica e estabilidade térmica em alta temperatura sob baixas concentrações de água (MENDES; OLIVEIRA; CASTRO *et al.*, 2012).

3.4 FATORES QUE INTERFEREM A VELOCIDADE E CINÉTICA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Chandra e colaboradores (2020) relata que os fatores primordiais que interferem na velocidade e na cinética das reações catalisadas por lipases são o pH, temperatura e o substrato.

- a) O pH interfere na atividade de uma enzima ocorrendo uma alteração no padrão de cargas de um determinado sítio ativo ou catalítico.
- b) A temperatura altera a velocidade reação, pois ao aumentar a temperatura há um aumento na taxa de reação enzimática devido ao aumento de energia cinética das moléculas participantes da reação
- c) A concentração do substrato interfere na velocidade de uma reação catalisadas por lipases, ao aumentar a concentração de substrato, aumenta também a quantidade de enzima presente sob a forma de complexo enzima-substrato.

3.5 HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS

De acordo com Lv *et al.*, (2018), a hidrólise dos triglicerídeos é baseada em três etapas consecutivas: os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos que são convertidos em monoglicerídeos e finalmente em glicerol, resultando em três ácidos graxos formados individualmente em cada etapa. Os monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos são produtos importantes obtidos da reação de hidrólise enzimática de triglicerídeos ocorrendo em pressões e temperaturas moderadas. A grande vantagem da utilização de lipase é quanto à sua regioespecificidade, formando um produto de composição química com maior definição aos obtidos por via química tradicional. A tecnologia de produção de ácidos graxos com enzimas, possuem as vantagens de operarem condições moderadas de temperaturas e pressão, redução no uso de produtos químicos agressivos ao meio ambiente reduzindo o custo com energia e facilitando a recuperação e purificação do produto final (FERREIRA *et al.*, 2019; NITBANI *et al.*, 2020).

3.6 PLANEJAMENTO DE MISTURA

O planejamento de mistura possibilita o uso de diversos polinômios para a modelagem, como o linear, o quadrático, o cúbico especial e o cúbico completo. Neste estudo estatístico, é avaliada a influência que a composição de uma mistura de dois ou mais elementos tem sobre uma ou mais variáveis (BREDDA, 2019).

A técnica de planejamento experimental de misturas consiste na obtenção de um modelo para descrever como as propriedades de interesse variam em função da composição da mistura. Faz-se um planejamento experimental especificando as composições das misturas a serem estudadas, há o ajuste do modelo avaliado aos resultados experimentais e comparação com modelos alternativos (SANTOS, SOLETTI, FARIAS, 2019).

Leite (2018) relata que o objetivo de um planejamento de experimentos de misturas é o ajustamento do relacionamento das respostas às proporções relativas de seus componentes através de uma equação matemática, assim ao modelar uma superfície de resposta, é possível obter:

- a) A influência de cada componente de forma isolada ou em combinações que permite a possibilidade de utilizar apenas componentes mais reativos ou mais eficientes;
- b) Identificar as composições de proporcionem valores de respostas em um campo desejado.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO SUBMETIDO

4 “ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION”, SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO INDEXADO CATALYSIS LETTERS.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION

Grazielle P.R. Sousa¹, Thais B. A. Correia¹, Willian S. M. Reis², Eduardo H. Bredda², Patrícia C. M. Da Rós^{2*}, Ernandes B. Pereira¹

¹Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

²Engineering School of Lorena-University of São Paulo-12602-810, Lorena, SP, Brazil

ABSTRACT

A growing generation of waste cooking oil (WCO) and its inappropriate disposal has led to the worsening of serious environmental problems. Thus, such a massive amount of WCO generated by household consumption and the food industry encourages the development of new technologies for reusing it to produce products of high economic value. The use of lipases in enzymatic hydrolysis of WCO allows employing the free fatty acids (FFA) and glycerol in the production of various bioproducts in oleochemical industries. Enzymatic hydrolysis offers advantages if compared to conventional processes of FFA production (Colgate-Emery), as it can operate under milder pressure and temperature conditions and high substrate specificity, resulting in high purity products and reduced by-product formation. Therefore, a simultaneous use of three different types of lipases in WCO hydrolysis was evaluated. For such a purpose, a simplex centroid mixture design (SMD) was used to model the influence of lipase composition on hydrolysis yield. Three commercial lipases were used: *Burkholderia cepacia* (LBC), *Rhizopus oryzae* (LRO) and porcine pancreas (LPP). Results reveal that high reaction yields of approximately 97% hydrolysis were achieved. SMD provided optimal conditions for lipase mixtures and higher hydrolysis yield, resulting in 15% LPP lipase and 85% LBC.

Key words: enzymatic hydrolysis; lipase; waste cooking oil; design of experiments; mixture design

* Corresponding author.

E-mail: patriciadaros@usp.br

1. INTRODUCTION

Waste cooking oil is generated mainly in urban areas where there is a large consumption of refined vegetable oils, such as households, restaurants, bakeries, food processing, dairy and beverage industries, among others. [1, 2]. Oils that are usually healthy at room temperature become unhealthy when heated above certain temperatures (226°C – 232°C), as they are harmful to human health when ingested. [3].

Restaurants, in general, find it difficult to reach a consensus on an ideal way to handle the disposal of waste cooking oil. The reuse of frying oil, in addition to becoming inappropriate for consumption after saturated, adds an unpleasant flavor and odor to food [4]. Studies reveal that an improper disposal of one liter of oil contaminates about one million liters of water, which results in negative impacts on the environment. In addition to clogging pipelines, WCO forms a waterproofing layer, which hinders drainage and gas exchange with the atmosphere, in addition to causing the death of fauna and flora present in the soil. In landfills, excess oil hinders the process of decomposing waste. In water bodies, due to the immiscibility of oil with water and its lower density, it forms a supernatant film that prevents oxygen diffusion, in addition to the fact that it may cause the death of aquatic life forms. [5–7].

An interesting alternative is to reuse waste cooking oils and fats (OGR) from food frying processes to produce biodiesel, since it not only contributes to its economic viability, but also results in harnessing the energy of a residue that, if discarded improperly, can harm the environment [8].

Biodiesel is used to fuel internal combustion engines. It is produced from renewable, biodegradable and less toxic raw materials than those used in diesel production. It has some advantages over regular diesel such as lower carbon monoxide emission, her boiling point (150 °C) which results in a lower boiling poi, safer transportation and storage, in addition to having lubricating properties that minimizes vehicle engine wear [3].

Taking into account some characteristics of this lipid raw material, such as high acidity and humidity, the most appropriate production route is hydroesterification, which consists in a two-step process. [8, 10]. The first step of hydroesterification is hydrolysis in which a chemical reaction occurs between triacylglycerols in oil and water, thus producing free fatty acids (FFA) and glycerol. In the second step, the FFAs generated by hydrolysis are esterified with short-chain alcohols in the presence of a catalyst (acid/base), which results in an alkyl ester molecule [8, 10].

The hydroesterification process can also be catalyzed enzymatically, in which lipase is used as catalyst in the hydrolysis and/or esterification step, therefore it becomes an important research field that allows reusing of this lipid residue. In addition to allowing operation under mild temperature and pressure conditions, lipases have several advantages over chemical catalysts such as high selectivity, specificity and purity of products, thus there is no cogeneration and, therefore, no need for additional steps of biodiesel purification [9, 11].

Lipase-catalyzed enzymatic hydrolysis of triacylglycerols has been used to obtain free fatty acids (FFA) and glycerol, which are important precursors in pharmaceutical, cosmetic, oil-chemical and biodiesel production industries [9, 12], among other applications.

In available literature, there are several works achieving good results from enzymatic hydrolysis using microbial lipases. Some studies demonstrate that the use of enzymatic combinations enables faster reaction kinetics. [13–15]. In this sense, it is worth studying the combination of biocatalysts to enable this step, such as lipases from different sources, e.g. *Burkholderia cepacia*, *Rhizopus oryzae* and porcine pancreas, using the simplex mixture design.

The simplex mixture design is an interesting statistical tool among the multiple multivariate data analyses known as Design of Experiments (DOE). It is used to model how the components of a given mixture can affect its final properties. Each component's content (composition) is related to an input variable for the simplex mixture design. Consequently, input variables are restricted to values between 0 and 1. Furthermore, for all experimental conditions, a sum of values of all input variables must be 1. The output variable, on the other hand, is a property of interest, as it is measured from the final mixture [16, 17]. The simplex mixture design is extremely useful for industries and it can be applied in various areas of research [18–21]. In the present work, it was tested a simultaneous use of three kinds of lipases (a mixture of enzymes) in the hydrolysis of waste cooking oil. For such a purpose, the simplex mixture design was used to model how lipase composition affects the reaction yield.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Biocatalysts

Burkholderia cepacia lipase (LBC) lipase, porcine pancreas lipase (LPP) and *Rhizopus oryzae* lipase (LRO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used as catalyst in the enzymatic hydrolysis.

Waste cooking oil, used for food preparation, was obtained from the Alfenas Federal University restaurant. It was kept in dark plastic bottles at 20°C to preserve its original properties. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Waste cooking oil characterization

The American Oil Chemist's Society method [22] was used to determine total free fatty acids (FFA), which was expressed in terms of free oleic acid (%). Absolute viscosity was determined using a Brookfield viscometer (Brookfield Viscometers Ltd, England) and a CP 52 cone [23]. Iodine and peroxide values were determined using the AOCS method [22].

Fatty acid methyl esters (FAMES) were synthesized according to AOCS [22] and identified by gas chromatography (GC). GC analyses were performed using a PerkinElmer™ - Clarus 580 chromatograph equipped with a flame-ionization detector. A 30 m capillary column with 0.25 mm of internal diameter, 5% diphenyl - 95% dimethylpolysiloxane stationary phase (non-polar) was employed during the analysis. Nitrogen was the carrier gas. External patterns were MIX Supelco™ and 37 fatty acids methyl ester (Sigma-Aldrich™), C₄C₂₄.

2.3. Determination of enzymatic activities

The enzymatic activity (U g⁻¹) was evaluated by hydrolysis of olive oil emulsion at a fixed ratio of oil/water 1:1. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μmol of free fatty acid per min under assay conditions. Results were expressed in activity units per gram of free enzyme [24].

2.4. Enzymatic hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by lipase blends: Mixture design and data analysis

In order to analyze and optimize the enzymatic hydrolysis of waste cooking oil, it was studied the use of a combination of different lipases: *Burkholderia cepacia* lipase (LBC), *Rhizopus oryzae* lipase (LRO), and porcine pancreas lipase (LPP). For such a purpose, a simplex centroid mixture design was used. Input variables were the composition of used lipases.

Table 1 describes the experimental conditions adopted herein.

Table 1: Experimental conditions to perform the simplex mixture design analysis. Input variables are presented in coded and real values (in grams)

| Exp. | A | B | C |
|------|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| | Porcine pancreas lipase (LPP) | <i>Rhizopus oryzae</i> lipase (LRO) | <i>Burkholderia cepacia</i> lipase (LBC) |
| 1 | 1 (3.650g) | 0 (0.000g) | 0 (0.000g) |
| 2 | 0 (0.000g) | 1 (0.490g) | 0 (0.000g) |
| 3 | 0 (0.000g) | 0 (0.000g) | 1 (0.470g) |
| 4 | 1/2 (1.820g) | 1/2 (0.245g) | 0 (0.000g) |
| 5 | 1/2 (1.820g) | 0 (0.000g) | 1/2 (0.235g) |
| 6 | 0 (0.000g) | 1/2 (0.245g) | 1/2 (0.235g) |
| 7 | 1/3 (1.210g) | 1/3 (1.630g) | 1/3 (0.157g) |
| 8 | 2/3 (2.420g) | 1/6 (0.082g) | 1/6 (0.078g) |
| 9 | 1/6 (0.605g) | 2/3 (0.327g) | 1/6 (0.078g) |
| 10 | 1/6 (0.605g) | 1/6 (0.082g) | 2/3 (0.313g) |

In Table 1, values between brackets represent the amount of each lipase in grams. Experiment 8, for instance, was performed using 2.420 g of Porcine pancreas lipase (LPP), 0.082 g of *Rhizopus oryzae* lipase (LRO) and 0.078 g of *Burkholderia cepacia* lipase (LBC).

Coded values outside parenthesis in Table 1 are the fractional compositions of each lipase. These numbers, however, were not based on lipase mass, but calculated according to the total enzyme activity of the system, which was set at 2000 U g⁻¹. For experiment 8, it was used 1/6 of *Rhizopus oryzae* lipase. It means that, out of the total enzyme activity (2000 Ug⁻¹), the *Rhizopus oryzae* lipase activity was about 333.3 Ug⁻¹ (1/6 of the total). Moreover, *Burkholderia cepacia* lipase activity was also 333.3 Ug⁻¹ (1/6 of the total) in experiment 8. Thus, although weights were different (0.082 and 0.078g, respectively), enzyme activity was the same (333.3 Ug⁻¹, 1/6 of the total). On the other hand, porcine pancreas lipase activity was 1333.3 Ug⁻¹ (2/3 of the total).

The 10 experimental conditions can be divided into four basic groups:

- 1 to 3: only one lipase was used as catalyst whose enzyme activity is 2000 Ug⁻¹;
- 4 to 6: two lipases were used as catalyst with 1000 Ug⁻¹ enzyme activity each;
- 7: three lipases were simultaneously used with 666.7 Ug⁻¹ enzyme activity each;

- 8 to 10: one of the lipases used had 1333.3 U g^{-1} enzyme activity, and the other two had 333.3 U g^{-1} enzyme activity.

This approach reveals the differences in hydrolytic activity of lipases: Porcine pancreas lipase (LPP) – 547.78 U g^{-1} ; *Rhizopus oryzae* lipase – 4070.28 U g^{-1} ; *Burkholderia cepacia* lipase – 4252.87 U g^{-1} .

To investigate the behavior of hydrolysis kinetics, 0.2 g aliquot samples were taken at various time intervals and analyzed by titration according to Da Rós et al.[25]. Hydrolysis percentage (%) was calculated by equation 1. Hydrolysis (%) is defined as the percentage weight of free fatty acids in the sample divided by its maximum theoretical value [26].

$$\text{Hydrolysis (\%)} = \frac{V_{KOH} \times M_{KOH} \times \overline{MW}}{W \times f} \times 100 \quad (1)$$

Where; V_{KOH} is the volume of potassium hydroxide solution (KOH) required during titration; M_{KOH} is KOH molarity (0.02 mol L $^{-1}$); \overline{MW} is the average molecular weight of fatty acids (g mol $^{-1}$); W is the weight of the collected sample; and f is the fraction of oil at the beginning of the reaction.

The output variable used for the simplex centroid mixture design was % Hydrolysis when the process achieved stability. Each experimental condition was in duplicate.

For the statistical (regression and graphical) analysis, the following software were used: Minitab (version 18.0; Minitab Inc., USA); Design expert (version 6.0 - Stat-Ease Corporation, USA); and Statistical (version 8.0 - Stat Soft Inc., USA). Minitab was used to optimize the obtained model using the desirability approach.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of waste cooking oil

The fatty acid profile of the waste cooking oil used in the present work contained 13.5% of saturated fatty acids and 83.3% of unsaturated fatty acids. The main fatty acids were: linoleic acid (C18:2) 46.8 %, oleic acid (C18:1) 27.4 %, palmitic acid (C16:0) 9.7 %, and linolenic acid (C18:3) 9.1 %. The unidentified fatty acids in this analysis amounted to 3.2%.

Despite the fact that there was a large amount of polyunsaturated fatty acids, mainly C18:2, the iodine index of WCO being used was relatively low, i.e. only 26.83 g I₂ 100 g⁻¹. Iodine values higher than 115 g I₂ 100 g⁻¹ indicates low oxidation stability, which limits the industrial application of WCO [27]. Thus, the WCO being used had an iodine level of 26.83 g I₂ 100 g⁻¹, i.e. it presents reasonably good oxidatiostability. Fernandes et al.[28], for instance, obtained higher iodine values, 110.59 g I₂ 100 g⁻¹, from coffee oil. Such relatively high iodine value means that the coffee oil used by Fernandes et al. [28] has lower oxidation stability than the waste cooking oil used herein.

The peroxide value observed for the waste cooking oil used in the present work was 8.79 mequiv./kg of oil, which is a higher value than the one obtained by Fernandes et al. [28], i.e. 1.58 mequiv./kg, from coffee oil. The higher peroxide index of waste cooking oil is related to its degradation[29] due to prolonged use in high temperatures for food preparation. The acid value of waste cooking oil was 0.39 mg KOH g⁻¹, and absolute viscosity was 23.49 mm² s⁻¹.

3.2. Optimizing the hydroesterification of waste cooking oil using the simplex centroid mixture design

The results obtained from all experimental conditions predicted by the simplex mixture design are shown in Figure 1 and Table2. In Figure 1, it is observed different reaction kinetics between all obtained results. Experiments 1 and 10, for instance, had higher Hydrolysis % (84.84 and 96.66%, respectively). However, other results ranged between about 36 and 56%. Despite these differences between results, it is also noticeable, in Figure 1, that all curves showed practically the same kinetics pattern.

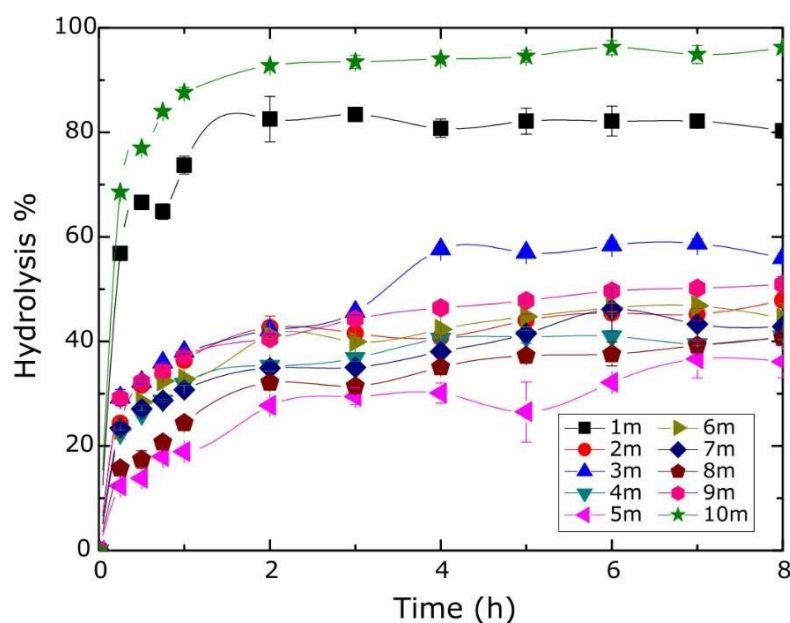


Figure 1: Kinetics results of the simplex mixture design.

Table 2: Results obtained for experimental conditions required for the simplex mixture analysis

| Exp. | A (LPP) | B (LRO) | C (LBC) | Y (% Hydrolysis) |
|------|---------|---------|---------|------------------|
| 1 | 1 | 0 | 0 | 84.84 ± 0.18 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 47.87 ± 1.27 |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 59.45 ± 0.19 |
| 4 | 1/2 | 1/2 | 0 | 41.54 ± 0.54 |
| 5 | 1/2 | 0 | 1/2 | 36.68 ± 3.61 |
| 6 | 0 | 1/2 | 1/2 | 47.30 ± 0.01 |
| 7 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 47.14 ± 3.16 |
| 8 | 2/3 | 1/6 | 1/6 | 40.72 ± 1.12 |
| 9 | 1/6 | 2/3 | 1/6 | 51.65 ± 0.78 |
| 10 | 1/6 | 1/6 | 2/3 | 96.66 ± 0.95 |

Another fact worth mentioning about Figure 1 is that Hydrolysis % has stabilized after about 4 h of reaction. In other words, after 4 h of reaction, a steady state was achieved with

almost no yield increase. This is quite important for the process optimization since it reduces processing time from 8 to 4h (half the predicted value) and lowers its costs.

Empiric data, collected after reaction stabilization, was used to determine the final Hydrolysis % (see Table 2) and used to perform the simplex mixture analysis. There was good correlation between Hydrolysis % results and input variables (lipase composition). The natural logarithm of experimental results, however, achieved higher correlation with input variables (with an adjusted R² of 0.94). Thus, the output variable adopted to increase the model accuracy was $\ln(\% \text{ Hydrolysis})$. Under these conditions, the obtained model can be described by Equation 2.

$$\ln(Y) = 4,415A + 3,854B + 4,045C - 1,561AB - 2,559AC + 6,660ABC - 8,280AC(A - C) + 8,620AC(A - C)^2 \quad (2)$$

According to the ANOVA results shown in Table 3 and considering significance level quartic and cubic terms are relevant justifies the use of a special quartic model instead of a quadratic or linear one. Finally, the ANOVA results reveal an insignificant lack of fit to the obtained model.

Table 3: ANOVA of Hydrolysis % from the simplex mixture design analysis ($\alpha=0.01$)

| Factor | Df | SS | Adjusted | | F | p |
|------------------------|----|---------|----------|----------|--------|-------|
| | | | SS | MS | | |
| Regression | 7 | 1.72160 | 1.72160 | 0.245942 | 40.11 | ≈0 |
| Linear | 2 | 0.15162 | 0.37743 | 0.188713 | 30.78 | ≈0 |
| Quadratic | 2 | 0.49976 | 0.68657 | 0.343286 | 55.99 | ≈0 |
| A*B | 1 | 0.15207 | 0.20976 | 0.20976 | 34.21 | ≈0 |
| A*C | 1 | 0.34769 | 0.56281 | 0.562809 | 91.79 | ≈0 |
| Special Cubic | 1 | 0.22826 | 0.09306 | 0.093057 | 15.18 | 0.002 |
| A*B*C | 1 | 0.22826 | 0.09306 | 0.093057 | 15.18 | 0.002 |
| Full Cubic | 1 | 0.69831 | 0.69777 | 0.697768 | 113.80 | ≈0 |
| A*C*(A-C) | 1 | 0.69831 | 0.69777 | 0.697768 | 113.80 | ≈0 |
| Full Quartic | 1 | 0.14365 | 0.14365 | 0.143652 | 23.43 | ≈0 |
| A*C*(A-C) ² | 1 | 0.14365 | 0.14365 | 0.143652 | 23.43 | ≈0 |
| Residual Error | 12 | 0.07358 | 0.07358 | 0.006131 | | |
| Lack of fit | 2 | 0.03933 | 0.03933 | 0.019664 | 5.74 | 0.022 |

| | | | | |
|------------|----|---------|---------|----------|
| Pure Error | 10 | 0.03425 | 0.03425 | 0.003425 |
| Total | 19 | 1.79518 | | |

df: degrees of freedom; SS: sum of squares; MS: mean squares; F: F-distribution
critical value; P: p-value

The Anderson-Darling normality test of model residuals depicted in Figure 2 resulted in a p-value of 0.217. Since this result is higher than the level of significance ($\alpha=0.01$), residual behavior can be considered normal, thus fulfilling the analysis requirement.

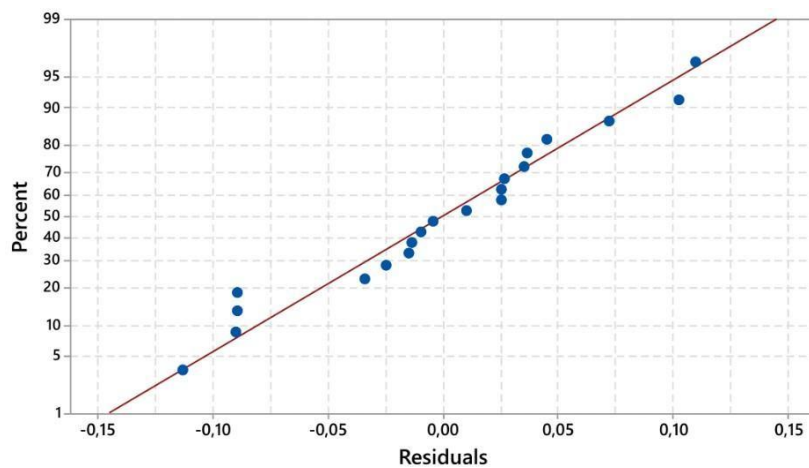


Figure 2: Normality test of model residuals

Once model reliability was confirmed, it can be used to understand the Hydrolysis % behavior as lipase composition changes. For such a purpose, Figures 3 and 4 are useful, as they show a 3D and a contour plot of the obtained model, respectively (see Equation 2).

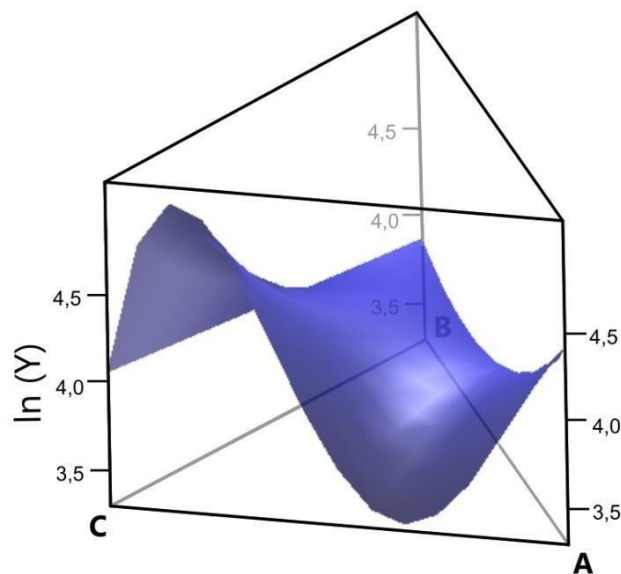


Figure 3: Response surface of the model predicted by the simplex mixture design analysis

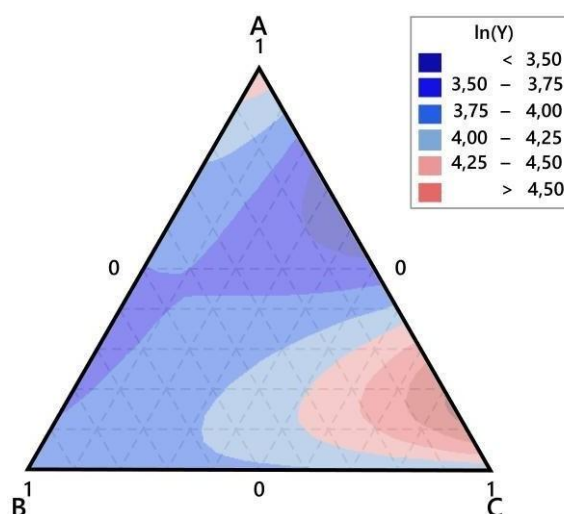


Figure 4: Contour plot of the model predicted by the simplex mixture design analysis

A graphic representation of the model (Figures 3 and 4) assists to identify which lipase compositions achieve higher hydrolysis yields. In the present study, there are at least 3 lipase compositions achieving high Hydrolysis %., as shown in Table 4 . The first two conditions are the same as those presented in Table 2. The last one is an extra experiment obtained using the same methodology as the others, whose lipase composition was obtained through the statistical model optimization (see Equation 2).

Table 4: Lipase compositions resulting in high Hydrolysis %

| Exp. | A (LPP) | B (LRO) | C (LBC) | Y (% Hydrolysis) |
|--------------|-----------|---------|------------|------------------|
| 1 | 1 | 0 | 0 | 84.84 ± 0.18 |
| 10 | 1/6 | 1/6 | 2/3 | 96.66 ± 0.95 |
| Extra | 3/20=0.15 | 0 | 17/20=0.85 | 96.05 ± 0.25 |

According to the results presented in Table 4, it is possible to use different lipase compositions and achieve high reaction yields, which is quite advantageous from a financial standpoint, since the process is not going to be dependent on a single input. Thus, as future application, a producer could modify lipase ratio based on its prices. Such versatility can reduce processing costs and increase its feasibility with little or no yield loss.

4. CONCLUSION

The obtained results showed that lipase composition has a major impact on the hydrolysis yield of waste cooking oil. It is also found that the simplex mixture design is a powerful statistical tool to be used in modeling and optimizing lipase composition. This approach provides not just optimal results, but also alternative lipase compositions achieving good yields.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

E-mail: patriciadaros@usp.br

Acknowledgments

The present work was supported the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) – Financing Code 001. The authors also thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG for granting the master's degree scholarship to Grazielle Pereira and CNPq for the financial support (Process Number 40934

REFERENCES

1. Mohamed RKM, Renendran C, Yacob P (2012) A Study on Turnover Intention in Fast Food Industry: Employees' Fit to the Organizational Culture and the Important of their Commitment. 9–42
2. de Araújo CDM, de Andrade CC, de Souza E Silva E, Dupas FA (2013) Biodiesel production from used cooking oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27:445–452. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.014>
3. Montebelo N di P, Araújo WMC, Borgo LA, Botelho RBA (2007) *ALQUIMIA DOS ALIMENTOS*, 3rd ed. Editora Senac, Brasília
4. Barbosa MS, Freire CCC, Almeida LC, et al (2019) Optimization of the enzymatic hydrolysis of Moringa oleifera Lam oil using molecular docking analysis for fatty acid specificity. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 66:823–832. <https://doi.org/10.1002/bab.1793>
5. Pinto-Coelho RM (2009) *Reciclagem e desenvolvimento sustentável no Brasil*. Belo Horizonte: Recóleo Coleta e Reciclagem de Óleos, p. 241-282, 2009., 1st ed. Recóleo, Belo Horizonte
6. Scheffer D, Simonetto E Descarte do óleo de cozinha: uma análise dos procedimentos nas maiores cidades do Rio Grande do Sul. In: *FÓRUM INTERNACIONAL ECOINNOVAR*, 4, 2015, Santa Maria/RS. Anais Santa Maria/RS. 2015. p.11
7. Junqueira WB de C (2014) *Desempenho de caixa de gordura empregada no tratamento preliminar dos efluentes de restaurante universitário*. 2014. 218f. Tese (Doutorado). Programa Pós-Graduação em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícola. Universidade Federal de Lavras. 2014.
8. dos Santos LK, Hatanaka RR, de Oliveira JE, Flumignan DL (2017) Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production. *Renewable Energy* 114:574–580. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.066>
9. Costa MJ, Silva MRL, Ferreira EEA, et al (2020) Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 157:. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>
10. Ramos LP, Silva FR, Mangrich AS, Cordeiro CS (2011) Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química* 3:385–405
11. Aguiaras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, Freire DMG (2015) Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel* 159:52–67. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.064>
12. Cavalcante FTT, Neto FS, Rafael de Aguiar Falcão I, et al (2021) Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel* 288
13. Poppe JK, Garcia-Galan C, Matte CR, et al (2013) Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on

- hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.010>
14. Poppe JK, Matte CR, do Carmo Ruaro Peralba M, et al (2015) Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Applied Catalysis A: General* 490:50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.050>
 15. Araki CA, Marcucci SMP, da Silva LS, et al (2018) Effects of a combination of lipases immobilised on desilicated and thiol-modified ZSM-5 for the synthesis of ethyl esters from macauba pulp oil in a solvent-free system. *Applied Catalysis A: General* 562:241–249. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2018.06.007>
 16. Menchaca-Méndez A, Zapotecas-Martínez S, García-Velázquez LM, Coello Coello CA (2021) Uniform mixture design via evolutionary multi-objective optimization. *Swarm and Evolutionary Computation*. <https://doi.org/10.1016/j.swevo.2021.100979>
 17. Montgomery DC (2013) *Design and analysis of experiments*, 8th ed. John Wiley & Sons, inc, New York
 18. Marcheafave GG, Tormena CD, Pauli ED, et al (2019) Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. *Microchemical Journal* 146:713–721. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.073>
 19. Viegas IMA, Barradas Filho AO, Marques EP, et al (2018) Oxidative stability of biodiesel by mixture design and a four-component diagram. *Fuel* 219:389–398. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.01.124>
 20. Jiao D, Shi C, Yuan Q, et al (2018) Mixture design of concrete using simplex centroid design method. *Cement and Concrete Composites* 89:76–88. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2018.03.001>
 21. Bredda EH, da Silva AF, Silva MB, da Rós PCM (2020) Mixture design as a potential tool in modeling the effect of light wavelength on *Dunaliella salina* cultivation: an alternative solution to increase microalgae lipid productivity for biodiesel production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 50:379–389. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697936>
 22. AOCS (2004) *Society Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5th ed. AOCS Press, Champaign
 23. da Rós PCM, Silva CSP, Silva-Stenico ME, et al (2013) Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Marine Drugs* 11:2365–2381. <https://doi.org/10.3390/md11072365>
 24. Fernandez-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Palomo JM, et al (2001) Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 11:649–656. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00080-1)

25. da Rós PCM, Menezes TK, Bredda EH, et al (2020) Microalgae as a Feedstock for Sustainable Fatty Acids: Factorial Design Study. *Chemical Engineering and Technology* 43:119–125. <https://doi.org/10.1002/ceat.201800643>
26. Fernandez AJ, Bredda EH, da Rós PCM, Pereira EB (2021) Sustainable Enzymatic Approach for the Production of Essential Fatty Acid Based on Coffee Oil Hydrolysis. *Catalysis Letters* 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03649-x>
27. Knothe G (2002) Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:847–854. <https://doi.org/10.1007/s11746002-0569-4>
28. Fernandes AJ, Bredda EH, da Rós PCM, Pereira EB (2022) Sustainable Enzymatic Approach for the Production of Essential Fatty Acid Based on Coffee Oil Hydrolysis. *Catalysis Letters* 152:452–459. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03649-x>
29. Carvalho AKF, da Rós PCM, Teixeira LF, et al (2013) Assessing the potential of nonedible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. *Industrial Crops and Products* 50:485–493. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.040>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

Nesse trabalho foram empregadas diferentes concentrações (g) e proporções de unidades de atividade (U/g), a fim de determinar as condições que favorecem a maior conversão em ácidos graxos na hidrólise enzimática do óleo residual de fritura, utilizando um planejamento experimental de mistura. Durante os ensaios realizados, pode – se concluir que o experimento 10 apresentou resultados bastante promissor atingindo uma porcentagem de hidrólise de 96,22% e uma conversão em ácidos graxos livres (AGL) de 1730,12 mMol/L em 8 h de reação, cujos resultados foram superiores ao do ponto central (experimento 7) que utilizou 1/3 (2000 U/g) atingindo 42,8% de hidrólise e 759,411 mMol/L de AGL.

Abaixo estão descritas algumas possibilidades a acerca de novos estudos sobre a hidrólise enzimática do óleo residual fritura otimizada através de um planejamento experimental de misturas:

- a) Testar alternativas para remoção do glicerol formado e a água não reagida na hidrólise enzimática;
- b) Desenvolver um processo de hidroesterificação a partir da proposta desse trabalho da otimização da hidrólise enzimática do óleo residual de fritura a fim de se produzir biodiesel.
- c) Quantificar monoglicerídeos e diglicerídeos, e avaliar a utilização como emulsificantes
- d) Ensaio de hidrólise no banho de ultrassom e micro-ondas, utilizando as 3 enzimas imobilizadas

REFERÊNCIAS

- ABED, S. M. *et al.* Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **LWT - Food Science and Technology**, [S.I], Elsevier, v. 93, p. 306–315, 2018.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [S.I], v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013
- AGUIEIRAS, E. C. G. *et al.* Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, [S.I], v. 130, p. 574–581, 2019.
- BASSO A; SERBAN S. Industrial applications of immobilized enzymes— A review. **Molecular Catalysis**, [S.I], v. 479, p. 110607, 2019.
- BARSÉ, L. Q. *et al.* Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.I], v. 94, n. 2, p. 389–397, 2019.
- BAUWELINCK, J. *et al.* Investigation of the enzyme-catalysed transesterification of methyl acrylate and sterically hindered alcohol substrates. **ChemistrySelect**, [Europe], v. 3, n. 18, p. 5169–5175, 2018.
- BORJES, L. C.; PERIN, C. S.; LAZZAROTTO, L. Degradação de óleo ou gordura de fritura utilizados por vendedores ambulantes de churros em Chapecó (SC). **Vigilância Sanitária em Debate**, [S.I], v. 3, n. 4, p. 114-119, 2015. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/368>. Acesso em: 18 dezembro 2021.
- BRASIL, Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sanidade e produtividade na nova soja da Embrapa**. Brasília, DF, 2020.
- BREEDA, E. H. **Estudo comparativo e otimização da quantidade de ômega 3 e ômega 6 produzido pelas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina***. 2019. Dissertação (Doutorado em Engenharia Mecânica. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá. Guaratinguetá, 2019.
- BRAUN, J. V. *et al.* Oxidative stability and cold filter plugging point of biodiesel blends derived from fats and soy oil. São Paulo: Quím. Nova, v. 43, n. 9, p. 1246-1250, 2020.
- CASTIGLIONI, G.L.; COSTA, J.A.V.; ALEGRE, R.M. Produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.23 n.4 p.637-644, 2018
- CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microb Cell Fact**, [S.I], v.19, n.169, pp.42, 2020.
- CHOJNACKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Production of structured phosphatidylcholine with high content of myristic acid by lipase-catalyzed acidolysis and interesterification. **Catalysts**, [S.I] v. 8, n.7, 2018.

- CRUZ, M. *et al.* **Enzymatic esterification of acid oil from soapstocks obtained in vegetable oil refining: Effect of enzyme concentration.** *Renewable Energy*, [S.I.], v. 124, p. 165–171, 2018.
- FERREIRA, M. M. *et al.* Optimization of free fatty acid production by enzymatic hydrolysis of vegetable oils using a non-commercial lipase from *Geotrichum candidum*. 10. ed. [Germany]: **Bioprocess and biosystems engineering**, Germany, v. 42, n.10, p. 1647-1659, 2019.
- FREIRE, P. C. M *et al.* Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. **Revista Nutrição**, Campinas, v.26. p.353-368, 2013.
- HELAL, S. E *et al.* Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. 1. ed. **J Genetic Engineering & Biotechnology**, [S.I.], v.19, pp. 13, 2021.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. India: **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
- KYRIACOS, D. Chemistry of Triglycerides and Fatty Acids. **Biobased Polyols for Industrial Polymers**, [S.I.], p.133–176, 2020.
- TECHNICAL COMMITTEE OF THE INSTITUTE OF SHORTENING AND EDIBLE OILS. **ISEO Food fats and oils**. 10. ed. Washington: ISEO, 2016, 30 p. . Acesso em: 11 nov. 2021. Disponível em: <http://www.iseo.org/httpdocs/FoodFatsOils2016.pdf>.
- LEITE, G. U. **Uso de planejamento experimental de misturas na otimização de pasta e noempacotamento de agregados para produção de CAA**, 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil Ambiental – Universidade Federal do Paraíba – João Pessoa, 2018)
- LV, E. *et al.* An Integrated Process of Catalytic Hydrolysis and Membrane Separation for Fatty Acids Production from Lard Oil. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Canada, v. 96, n.9, p.2014–2024, 2018.
- LÖFGREN, J. *et al.* Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered Candida antarctica Lipase A. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 20, n. 11 p. 1438–1443, 2019.
- MARROTI, B. S. *et al.* Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, [São Paulo], v.40, n.4, p.427-435, 2017.
- MCA SANTANA *et al.* Lipídeos: classificação e principais funções fisiológicas. Málaga, **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, España , v. 18, n. 8, p. 1-14, 2017.
- MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. O; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.I.], v.78, p. 119–134, 2012.

MONTEIRO R. R. C. *et al.* Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, [S.I.], v.164, p.1566-1587, 2021.

NITBANI, F. O. *et al.* Preparation of fatty acid and monoglyceride from vegetable oil.: **Journal of oleo science**, [S.I.], v. 69, n. 4, p. 277-295, 2020.

RAMNATH,L.; SITHOLE, B.; GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.63, n.3 p.179-192, 2017.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism , advantages , problems , and solutions.: **Biotechnology Advances**, New York, v. 37, n. 5, p. 749 –770, 2019.

SANTOS, A T.; SOLETTI, J I; FARIAS, R. O. "Otimização da cor do açúcar utilizando planejamento experimental de misturas e o Software Gams", In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. São Paulo/ SP **Anais** [...]. São Paulo: Blucher. p. 2891-2897, 2019.

SANTOS, L. P. A; MARTINAZZO, A. P; FREITAS, W. K. Atuação dos restaurantes na logística reversa do óleo de cozinha no município de Volta Redonda/RJ. **Engevista**, v. 20, n.4, p.589-600, 2018.

SEDDIGI *et al.* Facile synthesis of light harvesting semiconductor bismuth oxychloride nano photo-catalysts for efficient removal of hazardous organic pollutants.: **Plos one**, Germany, v.12, n.2, p.19, 2017.

SOUZA, M. S; SOUZA, R. G. Análise da sensibilidade do segmento de restaurantes em relação ao uso de biotecnologia no tratamento de efluentes In: XI CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO. 11. 2015. Rio de Janeiro/RJ. **Anais**[...]. Rio de Janeiro, 2015.

ZAMINDAR, N. *et al.* Antioxidant efficacy of soybean cake extracts in soy oil protection: **Journal of Food Science and Technology**, [S.I.], v.54, n.7, p.2077–2084, 2017.

ZECHNER, R. *et al.* Fat signal: Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metabolism**, [S.I.], v. 15, n.3, p. 279–291, 2012.

ZENEVICZ, M.C.P., *et al.* Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 80, p. 235-241, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 – CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO/ E-MAIL

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Catalysis Letters

Manuscript ID
CATLET-2022-0166

Title
ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION

Authors
DE SOUSA, GRAZIELLE
CORREIA, THAIS
Reis, Willian
Bredda, Eduardo
Da Rós, Patricia
Pereira, Ernandes

Date Submitted
14-Feb-2022

15/02/2022 13:01

E-mail de Universidade Federal de Alfenas - Catalysis Letters - Manuscript ID CATLET-2022-0166



Ernandes Benedito Pereira <ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br>

Catalysis Letters - Manuscript ID CATLET-2022-0166

Catalysis Letters <onbehalf@manuscriptcentral.com>

14 de fevereiro de 2022

Responder a: catl.editorial@gmail.com

Para: patriciadaros@usp.br

Cc: grazielle_2009_123@hotmail.com, ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br 14-Feb-2022

Dear Dr. Da Rós:

Thank you for submitting your manuscript entitled "ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE COOKING OIL BY LIPASE CATALYSIS: SIMPLEX MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION" for publication in Catalysis Letters.

The paper will be considered for publication, and you shall hear from me shortly.

Finally, please make sure to add the Scholar One server, uranus.scholarone.com, to your list of trusted internet sources, so that you successfully receive future emails from the Manuscript Central website.

With best regards.

Catalysis Letters