

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

THAIS BAZILLI DE ALMEIDA CORREIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE AQUECIMENTO NA TAXA DE
HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL EMPREGANDO LIPASES IMOBILIZADAS**

ALFENAS- MG

2022

THAIS BAZILLI DE ALMEIDA CORREIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE AQUECIMENTO NA TAXA DE
HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL EMPREGANDO LIPASES IMOBILIZADAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biomoléculas e Tratamento de Resíduos.

Orientador: Dr. Ernandes Benedito Pereira

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

ALFENAS- MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Correia, ThaisBazilli de Almeida. Avaliação de diferentes fontes de aquecimento na taxa de hidrólise de óleo residual empregando lipases imobilizadas. / ThaisBazilli de Almeida Correia. - Alfenas, MG, 2022. 46 f. : il. –

Orientador(a): Ernandes Benedito Pereira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Óleo residual de fritura. 2. Imobilização. 3. Hidrólise. 4. Lipase.
Ernandes Benedito , orient. II. Título.

Ficha Gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor

THAIS BAZILLI DE ALMEIDA CORREIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE AQUECIMENTO NA TAXA DE
HIDRÓLISE DE ÓLEO RESIDUAL EMPREGANDO LIPASES IMOBILIZADAS**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a 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 Resíduos.

Aprovada em: 26 de agosto 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: Universidade Estadual Paulista



Documento assinado eletronicamente por Ernandes Benedito Pereira, Professor do Magistério Superior, em 26/08/2022, às 16:37, 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 26/08/2022, às 16:38, 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 26/08/2022, às 16:41, 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 0796568 e o código CRC 421B771D.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a presença de Deus em minha vida.

Aos meus pais, Márcia e Antero, por serem meu alicerce e meu amparo. Dentre os diversos ensinamentos, me fizeram enxergar que o conhecimento é a maior conquista do ser humano e que na vida devemos correr atrás daquilo que sonhamos.

Aos meus irmãos, Marcos e João pelo companheirismo e incentivo, para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus avós, Maria e Antônio com amor e carinho dedicou seu tempo para fazer sempre os agradecimentos e encorajando-me a superar os obstáculos em todas as jornadas da minha vida.

Ao orientador Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira por toda paciência, dedicação, apoio e ensinamentos. É meu grande exemplo de mestre, principalmente de pessoa íntegra e comprometida.

À coorientadora Profa. Dra. Patrícia Caroline Molgero Da Rós, pela dedicação, ensinamentos e carinho. Uma pessoa que admiro pelo profissionalismo e comprometimento.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e incentivos que só agregaram melhorias em minha vida. Ao Doutorando Willian e a Mestre Grazielle pela ajuda no laboratório da UNIFAL-MG para realização dessa pesquisa.

À Escola de Engenharia de Lorena – Área/USP, pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

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

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Biotecnologia/UNIFAL por permitir a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Bioprocessos- Unifal, pela realização das análises.

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 001.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para que eu pudesse chegar até a finalização desta etapa importante da minha vida.

RESUMO

A hidrólise enzimática catalisada por lipases é uma alternativa bastante utilizada no meio industrial, atuando em condições baixas de temperatura e pressão, capaz de obter produtos de grande valor. O óleo residual de fritura é utilizado diversas vezes, são transformados em resíduo e o seu descarte inadequado pode causar danos ambientais, como: além de provocar a danificação das tubulações domésticas e das redes de tratamento de esgoto. Este estudo teve como objetivo estudar a hidrólise enzimática do óleo residual de fritura em diferentes sistemas aquecimento: ultrassom, convencional e micro-ondas, utilizando uma combinação de lipases: *Burkholderia cepacia* (85%) e Pâncreas de porco (15%) na sua forma livre e imobilizada ligação covalente em suportes: Óxido de nióbio (ON), Quitosana (QUIT) e Polihidroxibutirato (PHB), sob as condições: razão molar 1:1 (óleo/solução de goma arábica pH 7,0 tampão fosfato), em temperatura de 40°C, 100 W de potência, agitação de 600 rpm por um período 6h de reação, as condições foram estabelecidas de acordo com o planejamento experimental de misturas das lipases, definido por estudos anteriores. A fim de obter a maior eficiência de hidrólise do óleo residual de fritura, primeiramente foram realizados testes com as lipases em sua forma livre, no entanto foi observado que no sistema de micro-ondas teve um baixo rendimento na hidrólise (22,61%), em comparação com os demais sistemas: ultrassom (48%) e convencional (31,21%). Com isso foram realizados os ensaios com as lipases LBC e LPP imobilizadas em diferentes suportes: Oxido de nióbio, Quitosana e Polihidroxibutirato, afim de avaliar a sua eficiência na imobilização ao serem utilizadas no processo de hidrólise neste presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que o suportes oxido de nióbio e PHB apresentaram maior eficiência e que a utilização da lipases imobilizadas são mais viáveis. A imobilização apresentou grande vantagem, onde as lipases foram reutilizadas em até três ciclos na reação de hidrólise.

Palavras-chave: Lipase *Burkholderia cepacia*; Lipases Pâncreas de porco; Imobilização; Hidrólise; Óleo residual de fritura; Óxido de nióbio; Quitosana; Polihidroxibutirato.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis catalyzed by lipases is an alternative widely used in the industrial environment, acting in low temperature and pressure conditions, capable of obtaining products of great value. Residual frying oil is used several times, they are transformed into waste and their improper disposal can cause environmental damage, such as: in addition to causing damage to domestic pipes and sewage treatment networks. This study aimed to study the enzymatic hydrolysis of residual frying oil in different heating systems: ultrasound, conventional and microwave, using a combination of lipases: *Burkholderia cepacia* (85%) and pork pancreas (15%) in its free and immobilized covalent bond on supports: Niobium oxide (ON), Chitosan (QUIT) and Polyhydroxybutyrate (PHB), under the conditions: molar ratio 1:1 (oil/gum arabic solution pH 7.0 phosphate buffer), in temperature of 40°C, 100 W of power, agitation of 600 rpm for a period of 6h of reaction, the conditions were established according to the experimental design of lipase mixtures, defined by previous studies. In order to obtain the highest efficiency of hydrolysis of residual frying oil, tests were first carried out with lipases in their free form, however it was observed that in the microwave system it had a low hydrolysis yield (22.61%), compared to the other systems: ultrasound (48%) and conventional (31.21%). As a result, tests were carried out with the lipases LBC and LPP immobilized on different supports: Niobium oxide, Chitosan and Polyhydroxybutyrate, in order to evaluate their efficiency in immobilization when used in the hydrolysis process in this present study, the results obtained showed that the Niobium oxide and PHB supports showed greater efficiency and that the use of immobilized lipases are more viable. The immobilization presented great advantage, where the lipases were reused in up to three cycles in the hydrolysis reaction.

Keywords: Lipase de *Burkholderia cepacea*; Lipase Porcine pancreas; Immobilizat
Immobilization; Hydrolysis; Residual frying oil; niobium oxide;
Chitosan; Polyhydroxybutyrat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação.....	24
Figure 1-	Enzymatic hydrolysis of the mixture of BCL and PPL lipases in its free form using different systems: ultrasound, microwave, and conventional	32
Figure 2-	Combi-Nb ₂ O ₅ enzymatic hydrolysis using the conventional and ultrasound system.....	33
Figure 3-	Combi- Nb ₂ O ₅ recycle in the ultrasound system.....	34
Figure 4-	Enzymatic hydrolysis and recovery of Combi-Nb ₂ O ₅ in the conventional system.....	35
Figure 5-	Enzymatic hydrolysis and recovery of Combi-PHB in the ultrasound system.....	35

LISTA DE TABELAS

Table 1-	Hydrolytic activities of BLC and PPL lipases in their free form and immobilized in the supports: Nb ₂ O ₅ , PHB, CHIT	30
Table 2-	Operational stability parameters of Combi-PHB and Combi- Nb ₂ O ₅ constants of thermal inactivation and half-life times	36

LISTA DE ABREVIATURAS

LBC	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>
LPP	Lipases <i>Pâncreas de porco</i>
AGL	Ácidos graxos livres
ON	Óxido de nióbio comercial
QUIT	Quitosana
PHB	Polihidroxiacetato

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	12
2.0	OBJETIVO PRINCIPAL	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.0	REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO	16
3.1	CAPÍTULO 1	16
3.2	ENZIMAS COMO CATALISADORES	16
3.3	LIPASES.....	17
3.4	LIPASES DE <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> (LBC) E PÂNCREAS DE PORCO (LPP).....	18
3.5	SUBSTRATO: ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA	19
3.6	FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	20
3.7	IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	20
3.8	SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	21
4.0	CAPÍTULO 2 - ARTIGO SUBMETIDO	25
EVALUATION OF DIFFERENT HEATING SOURCES IN THE HYDROLYSIS REACTION RATE OF RESIDUAL FRYING OIL CATALYZED BY FREE AND IMMOBILIZED LIPASE		25
1.0	INTRODUCTION	27
2.0	MATERIAL AND METHODS	28
2.1	MATERIALS	28
2.2	SYNTHESIS OF THE SUPPORTS	28
2.3	IMMOBILIZATION OF LIPASES	28
2.4	DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY	28
2.5	ENZYMATIC HYDROLYSIS OF RESIDUAL COOKING OIL CATALYZED LIPASES	29
2.6	RECOVERY OF IMMOBILIZED LIPASE	29
2.7	OPERATIONAL STABILITY OF BIOCATALYSTS	29
3.0	RESULTS	29
3.1	HYDROLYTIC ACTIVITY OF LIPASES IN THEIR FREE AND IMMOBILIZED FORM	29
3.2	HYDROLYSIS WITH RESIDUAL OIL USING LIPASES <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> AND PORCINE PANCREAS IN FREE FORM	30
3.3	HYDROLYSIS WITH RESIDUAL OIL USING A MIXTURE OF <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i>	

LIPASES AND PORCINE PANCREAS IMMOBILIZED IN THE NIOBIUM OXIDE SUPPORT (COMBI-NB ₂ O ₅)	31
3.4 OPERATIONAL STABILITY OF THE MIXTURE OF <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LIPASES AND PORCINE PANCREAS IMMOBILIZED IN THE NIOBIUM OXIDE SUPPORT	32
3.5 ULTRASSOM OPERATIONAL STABILITY OF THE MIXTURE OF LIPASES <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> AND PORCINE PANCREAS IMMOBILIZED IN THE PHB (COMBI-PHB) SUPPORT - ULTRASOUND SYSTEM	34
3.6 DETERMINATION OF OPERATIONAL STABILITY PARAMETERS	34
4.0 CONCLUSION	35
5.0 REFERENCES	35
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES	38

1.0 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais podem ser extraídos a partir de sementes oleaginosas como, soja, milho, girassol, algodão entre outros cereais (FORERO-HERNANDEZ *et al.*, 2020, p.1). A composição química desses óleos vegetais é formada por ácidos graxos saturados ou insaturados e glicerídeos, compondo os triacilglicerídeos, entre três ácidos graxos e molécula do glicerol (RABELO *et al.*, 2017, p. 24).

O óleo de soja é o óleo vegetal mais comumente utilizados, apresentando cor levemente amarelada, límpida, com odor e sabor suave característico, sendo bastante utilizado como óleo de cozinha para preparação de alimentos e setores industriais. (LANDGRAF *et al.*, 2020, p. 27). A composição química do óleo de soja, apresenta em média 55,3% de ácido linoleico, 23,6% de ácido oleico, 12,7% ácido palmítico, 4,5% ácido linolênico e 3,9% esteárico, visto que o óleo de soja é rico em ômega 3 e ômega 6, uma gordura poli-insaturada. (JESUS *et al.*, 2016, p. 158).

Os óleos vegetais refinados para o consumo humano, são caracterizados como óleo residual urbano e industrial, sendo utilizado com grande frequência em restaurantes, domicílios, shopping, padaria, bares e indústrias de alimentos (STOCKER LAGO; ROCHA JÚNIOR, 2016, p. 1438). A demanda mundial de óleos vegetais aumentou ao longo das últimas décadas. (TEIXEIRA *et al.*, 2021, p. 2), sendo que em 2020/2021 atingiu cerca de 210 milhões de toneladas, gerando altas quantidades de óleo residual (GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2022, p. 1).

Entre as diversas aplicações com o óleo comercial, a mais utilizada é a fritura de alimentos, onde ocorre um processo térmico em altas temperaturas, caracterizando o óleo utilizado como óleo de fritura residual, composto por triglicerídeos, ácidos graxos livres, água, esteróis, fosfolípidios entre outras impurezas resultando na degradação térmica comprometendo a sua estabilidade oxidativa (SILVA *et al.*, 2021).

Ao passar por esse processo térmico repetidamente, sofrem alterações indesejáveis, como a mudança de cor e a viscosidade, formação de espuma. (OLIVEIRA *et al.*, 2022). A ação do oxigênio nos óleos vegetais, na presença do calor, resulta na formação de produtos indesejáveis como por exemplo radicais livres voláteis e não voláteis, peróxidos e ácidos dienóicos (SILVA *et al.*, 2021, p. 38).

Essas transformações indesejáveis, inviabilizam a continuidade de utilização do óleo para fins alimentícios, diminuindo a sua qualidade nutricional devido aos

produtos de degradação (ROSSI *et al.*, 2018, p. 2.). Dessa maneira passa a ser considerado um resíduo problemático, no qual o descarte muitas vezes é de forma incorreta, gerando impactos ambientais negativos, como o entupimento das tubulações de tratamento de esgotos, poluição dos solos e o bloqueio da oxigenação da água (ROSA *et al.*, 2020, p. 61).

Devido a problemática do descarte inadequado do óleo residual, torna-se importante buscar alternativas que possibilitam formas de reduzir, reutilizar e reciclar resíduos de frituras, proporcionando formação de novos produtos, com viabilidade de valores agregados e ambientalmente correta (MA *et al.*, 2021, p. 2).

Portanto, esses impactos negativos causados pelos óleos residuais podem ser minimizados tendo como alternativa a utilização de enzimas hidrolíticas (por exemplo, as lipases), nas reações de hidrólise. Essa reação de hidrólise apresenta algumas vantagens, podendo ocorrer em baixas temperaturas e pressão, não havendo formação de produtos indesejáveis, devido à alta seletividade dessas enzimas (COSTA *et al.*, 2018, p.1).

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para operação: a formação de interface óleo/água e a absorção da enzima nesta interface. Entretanto quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima absorvida, ocasionando velocidades mais altas de hidrólise (MAROTTI *et al.*, 2017, p. 1).

A hidrólise de óleos vegetais irá produzir ácidos graxos, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e glicerol livre, podendo ser utilizado em diversas aplicações industriais, tais como, fabricação de sabões, agentes tensoativos e detergentes, além de indústrias alimentícias. Como os óleos são substratos muito heterogêneos, a alta especificidade e seletividade das lipases que serão utilizadas na reação de hidrólise vão resultar em produtos de melhor qualidade (ZHAO *et al.*, 2022, p.2).

As lipases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos (óleo/gordura) de cadeia longa, além disso, são enzimas de interface, que pela sua grande versatilidade ocupam uma posição de destaque devido ao seu potencial biotecnológico. As lipases geralmente são estáveis, com isso têm sido utilizadas em diversos meios, como meios aquosos, solventes orgânicos, líquidos iônicos, entre outros (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015, p. 44).

Levando-se em consideração a importância do estudo dessa nova tecnologia, este trabalho visa estudar novas alternativas na reação de hidrólise do óleo residual de fritura, avaliando a eficiência com as lipases imobilizadas em diferentes tipos de

suporte: Óxido de nióbio, Quitosana e Polihidroxibutirato, em variados tipos de sistemas de fontes de aquecimentos: micro-ondas, convencional e ultrassom, utilizando as lipases comerciais *Burkholderia cepacia* (LBC) e Pâncreas de porco (LPP).

Nos últimos anos, a técnica de imobilização de lipases apresenta um grande interesse como uma ferramenta para tratamento de efluentes industriais e comerciais, a imobilização é um processo de adesão de moléculas enzimáticas em suportes, afim de melhorar o desempenho das mesmas. (YAO *et al.*, 2022, p. 2). Embora as enzimas possam ser usadas em sua forma livre, a imobilização pode melhorar algumas de suas propriedades como: estabilidade seletividade especificidade, além de ser utilizada para influenciar no aumento da atividade enzimática. (WANG *et al.*, 2022, p. 2).

Existe várias técnica para imobilização de lipases: como encapsulamento, adsorção, ligação covalente e reticulação. (MIRZAEI; VALIZADEH; PAZHANG, 2022, p. 307). A escolha do método de imobilização ideal depende de alguns fatores entre a interação com o suporte e a lipase (REN *et al.*, 2021, p. 2).

2.0 OBJETIVO PRINCIPAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar alguns fatores que podem favorecer no aumento do percentual da hidrólise enzimática para a produção de ácidos graxos livres que estão presentes no óleo residual de fritura utilizando as lipases comerciais *Burkholderia cepacia* (LBC) e pâncreas de porco (LPP) na forma livre e imobilizada.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a eficiência de diferentes tipos de suportes: Óxido de nióbio (ON), Quitosana (QUIT) e Polihidroxibutirato (PHB) ;
- b) Avaliar a influência dos sistemas de aquecimento na reação: micro-ondas, convencional e ultrassom;
- c) Avaliar a atividade hidrolítica e eficiências das combilipases;
- d) Avaliar a eficiência da reutilização das lipases imobilizadas na reação;
- e) Avaliar tempo de meio vida das lipases nos suportes.

3.0 REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO

3.1 CAPÍTULO 1

O presente capítulo tem por objetivo apresentar, de forma sucinta, a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre enzimas, lipases de uma forma geral e especificamente lipases *Burkholderia cepacia* (LBC) e pâncreas de porco (LPP); Substrato: óleo residual de fritura; reação de hidrólise enzimática; imobilização de enzimas (lipases) e diferentes tipos de suportes (Quitossana, Polihidroxibutirato e Óxido de Nióbio).

3.2 ENZIMAS COMO CATALISADORES

As enzimas são catalisadores biológicos macromoleculares de natureza predominantemente proteica, uma vez que reações catalisadas por RNA são também possíveis. Sua ação é semelhante à dos catalisadores inorgânicos, onde há uma redução da energia de ativação dos processos em que ocorram quaisquer alterações do equilíbrio termodinâmico e sem que elas sejam consumidas nas reações químicas envolvidas. A principal diferença de temperaturas e atuação entre os catalisadores inorgânicos e as enzimas está na sua especificidade frente aos sítios ativos presentes no substrato (moléculas nas quais a enzima atuará). As enzimas podem ainda ser temporariamente modificadas por inibidores e ativadores, que são compostos que se ligam ao sítio ativo da enzima, ou do substrato, ocasionando a redução e intensificação da sua atividade, respectivamente. O complexo enzima-substrato é o coração da reação enzimática, sendo utilizado como base para o desenvolvimento dos modelos cinéticos para estudo do seu comportamento cinético e descrição dos mecanismos das reações envolvidas (VARANDAS *et al.*, 2018, p.1-2).

Portanto, as enzimas são uma classe de moléculas que atuam em uma variedade de processos bioquímicos celulares, apresentando algumas vantagens, tais como, alta eficiência catalítica, especificidade, condições moderadas (pH, temperatura, solventes, força iônica) (ORTIZ *et al.*, 2019, p.1). Além disso, outra vantagem da utilização de enzimas como biocatalisadores, a redução do tempo e números de etapas das reações (GARRIDO; BISPO; SILVA, *et al.*, 2018, p.1).

Com tudo, entre as várias funções das enzimas, também estão sendo utilizadas no tratamento de resíduos e efluentes, desempenhando um papel importante na

degradação da matéria orgânica obtendo novos produtos (QUEIROZ; SOUSA, 2020, p. 51850).

Podem ser obtidas a partir de diferentes fontes como vegetais, animais e microbianas, e industrialmente, as enzimas são aplicadas na produção, conservação e modificação de produtos (animais ou vegetais e seus derivados), bem como na produção de medicamentos, cosméticos, têxtil, alimentos e bebidas (SILVA *et al.*, 2018, p. 1-2).

As enzimas foram divididas em seis classes, de acordo com o tipo de reação realizada por elas. Dentre essas classes, destacam-se as lipases, que são biocatalisadores, apresentando características que fazem com sejam extremamente atraentes para aplicações biotecnológicas (SILVEIRA; ROCHA; BENASSI, 2021, p.1).

3.3 LIPASES

As lipases (triacilglicerídeos acilhidrolase EC 3.1.1.3) são uma classe de enzimas com capacidade de hidrolisar triacilglicerídeos insolúveis na interface entre substrato e água, resultando em ácidos graxos livres e glicerol, além de monoacilglicerol e diacilglicerol. Além de suas propriedades hidrolíticas, as lipases têm sido um grande interesse em processos biocatalíticos, pela sua capacidade de catalisar ampla reações (SHUAI *et al.*, 2016, p.2).

É importante ressaltar também que estas enzimas possuem a capacidade de catalisar vários outros tipos de biotransformações como reações inversas de interesterificação e transesterificação em condições de baixo teor de água (SALIHU *et al.*, 2011, p. 66). Entretanto, as lipases são consideradas solúveis em água, podendo catalisar suas reações, em dois tipos de sistemas: meio aquoso e orgânico (JAVED *et al.*, 2018, p. 23).

As lipases estão entre os biocatalisadores mais valorizados na área da biotecnologia com grande importância (TAVARES FILHO *et al.*, 2015, p. 1). Já é utilizada em diversos setores industriais: alimentícia, farmacêutica, química, detergentes, tratamento efluentes e águas residuais, biodiesel, entre outros (FERRAZ *et al.*, 2018).

Segundo Munhoz *et al.*, (2020), as lipases podem ser produzidas por todos os seres vivos, como, fungos, plantas e animais. As de origem vegetal são encontradas em grandes concentrações, em látex, frutos, folhas ou sementes. Já as

de origem animal são adquiridas de bezerros ou suínos, e tem alta influência comercial e industrial. As microbianas são obtidas a partir de processo industrial, são divididas em dois processos: fermentativo, separação e recuperação das enzimas. No presente estudo podemos citar duas lipases de diferentes fontes, *Burkholderia cepacia* (LBC) e Pâncreas de porco (LPP).

3.4 LIPASES DE *BURKHOLDERIA CEPACIA* (LBC) E PÂNCREAS DE PORCO (LPP)

A Lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) (anteriormente denominada por *Pseudomonas cepacia*) recebe destaque na aplicação industrial por realizar a catálise em ambos os meios aquosos e não aquosos (ABDULLA e RAVINDRA, 2013, p. 1).

As lipases oriundas de *Burkholderia* possuem como características: boa estabilidade a alta alcalinidade; estabilidade térmica; tolerância a solventes orgânicos; enantioselectividade; atividade enzimática em diferentes pH; e não toxicidade ao ambiente (LAU *et al.*, 2011, p. 7003). Outras vantagens são sua boa atividade catalítica em diferentes substratos bem como sua solubilidade parcial (SHOW *et al.*, 2013, p. 112.).

A lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) é uma enzima extracelular que pode ser amplamente utilizada para o controle biológico de doenças em plantas e a biodegradação de poluentes ambientais. É frequentemente usada como biocatalisador em várias biotransformações (LI *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2012). Tendo em vista as observações anteriormente mencionadas, o presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de lipase produzida por *Burkholderia cepacia* em diferentes condições de cultivo.

A lipase LBC é solúvel em água, podendo ser encontrada em duas formas, livre e imobilizada, conhecida pela tolerância de alto número de solventes e álcoois de cadeia curta. Além disso, a lipase LBC apresenta algumas características ótimas como estabilidade, alcalinidade, estabilidade térmica, seletividade e trabalha em diferentes pHs (DEPOORTER *et al.*, 2016, p. 5215).

A lipase pancreática de porco (LPP) é a preparação de lipase mais barata comercialmente disponível, o que é recomendado para processos de sínteses em que o custo é considerado como fator crítico (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; PAULA *et al.*, 2007). É considerada uma das lipases mais promissoras na resolução

de álcoois racêmicos e ácidos carboxílicos por meio da hidrólise enantiosseletiva dos ésteres correspondentes (MIURA *et al.*, 2008).

Também tem sido utilizada na hidrólise regiosseletiva (BAGI; SIMON; SZAJÁNI, 1997), pré-tratamento de águas residuais ricas em lipídios (MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001) e sua aplicação em meios orgânicos envolve a síntese de sabores e fragrâncias (GOGOI *et al.*, 2006; OZYILMAZ; GEZER, 2010), biodiesel (MOREIRA *et al.*, 2007; YESILOGLU, 2004), produtos farmacêuticos (ZHENG *et al.*, 2011), emulsificantes e cosméticos (PAULA *et al.*, 2007; PLOU *et al.*, 1996). Sua estrutura é composta por uma cadeia de 449 aminoácidos, com peso molecular de 50 – 52 KDa (SUO *et al.*, 2018).

A lipase LPP possui dois principais fatores que influencia na sua atividade, tais como, pH ótimo de atuação em meio alcalino, na faixa de 7,3 a 9,0 e a temperatura na faixa de 35°C a 45°C, ao contrário da LBC essa lipase hidrolisa apenas na posição 1,3 de triacilglicerídeos. (TAVARES *et al.*, 2018, p. 255).

3.5 SUBSTRATO: ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

O óleo de fritura residual é proveniente do consumo humano, sendo gerado diariamente em diversos estabelecimentos, onde muitas vezes é descartado incorretamente, considerado altamente poluidor, gerando impactos ambientais, como contaminação do solo e da água, apresentando dificuldade de degradação pela baixa solubilidade e densidade (ANTUNES, 2018, p. 97). Os óleos de frituras residuais, caracterizam por uma variação significativa na quantidade de água, materiais sólidos, composto polares e ácido graxos livres de acordo com as condições operacionais as quais foram submetidas. (CASTRO *et al.*, 2018, p. 48).

O processo de fritura é um dos procedimentos mais antigos no preparo de alimentos, sendo o óleo de soja um dos mais utilizados nesse processo, em virtude do seu menor custo. A utilização do óleo na preparação de alimentos, depois de um tempo deve ser descartado, como consequência dessa reação as propriedades sensoriais são alteradas, sendo inviável para o consumo (DEHGHANNYA; NGADI, 2021, p. 786-).

Segundo Silvia e Almeida (2015), o descarte inadequado desse resíduo ocorre muitas vezes por falta de conhecimento da sociedade, devido à pouca divulgação sobre o impacto que pode ocorrer ao meio ambiente. Deve informa a população quais

tipos de providências o consumidor deve tomar para o descarte adequado, também a falta de regulamentação e fiscalização, influenciando a sociedade e indústrias fazem o descarte inadequado, como, lançando em rios, pias e redes de esgoto sanitário.

O reaproveitamento do óleo de fritura residual é uma alternativa viável, além de contribuir para o meio ambiente, ainda possibilita a obtenção de produtos que podem ser utilizados em diversos setores (ZHANG; LIU; FAN, 2020, p. 1). Portanto a reação de hidrólise enzimáticas de óleos residuais pode ser uma alternativa promissora, garantindo a reciclagem e influenciando sustentabilidade econômica e ambiental.

3.6 FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. A hidrólise enzimática utilizando o óleo como substrato catalisado por lipases, ocorre na interface água- óleo, na qual as ligações de éster dos triglicéridos são quebradas, gerando produtos como, ácidos graxos livres, monoacilglicerol e diacilglicerol e glicerol, sendo uma alternativa de grande importância no meio industrial entre setores farmacêuticos, cosméticos, alimentícios e têxtil (TAVARES, 2021, p.1).

Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise usando lipases como catalisadores. Com isso existe muitos estudos que apresentam os fatores principais que afetam a reação de hidrólise enzimática, tais como, relação fase aquosa/fase oleosa; influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo, temperatura e o efeito da agitação na taxa de reação, em virtude da adsorção-dessorção da lipase na interface (GU *et al.*, 2022, p. 1).

Assim a utilização da reação de hidrólise enzimática apresenta grandes vantagens, podendo ocorrer em baixas temperaturas e pressões, não havendo formação de produtos indesejados, devido à alta seletividade das enzimas (COSTA *et al.*, 2018, p. 1).

3.7 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A imobilização de enzimas abriu novos e promissores campos de atuação, entre eles, sua aplicação como catalisadores industriais de elevada eficiência. A alta

especificidade e possibilidade de reuso têm permitido a gradual substituição de catalisadores convencionais. Portanto, a imobilização enzimática consiste no confinamento físico da enzima sobre um suporte por meio de sua adsorção física, ou ligação covalente, retendo sua atividade catalítica e permitindo seu reuso (VARANDAS *et al.*, 2018, p. 2).

A imobilização de enzimas tem sido considerada um processo eficaz apresentando melhorias, como a estabilidade, especificidade e seletividade. Além disso essa técnica facilita a separação dos produtos, possibilitando a sua reutilização, gerando menor custo no processo. (WANG *et al.*, 2021, p. 240).

Contudo, as lipases podem ser imobilizadas em diferentes tipos de suportes classificados como orgânicos ou inorgânicos possuindo graus de porosidades variados, entre outras características. Os suportes inorgânicos estão entre óxidos inorgânicos, sílica, vidro de porosidade, minerais ou materiais à base de carbono, representando uma ótima estabilidade térmica e resistência mecânica. Já os suportes orgânicos são de origem natural ou sintético, como carboidratos, albumina, gelatina e quitosana, caracterizam pela biocompatibilidade e biodegradabilidade, considerados não tóxicos (SHELDON *et al.*, 2021, p. 5850).

3.8 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Existe vários tipos de suporte para a imobilização, aplicável para maioria das enzimas. (MELO *et al.*, 2017, p. 2). A escolha do tipo de suporte, depende da peculiaridade e fins de utilização, dessa maneira um bom suporte deve permitir estabilidade física, química e biológica durante a imobilização (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Contudo, as enzimas podem ser ligadas diretamente a um suporte sólido ou fisicamente confinadas em uma matriz, e os suportes podem ser considerados viáveis para os métodos de imobilização de acordo com o tipo de interação pela ligação da enzima no suporte poroso ou não poroso (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Dessa forma, vários materiais vêm sendo utilizados como suportes, sendo que no presente estudo foram utilizados o Polihidroxibutirato (PHB), a Quitosana (QUIT) e o Óxido de nióbio (ON), para a imobilização das enzimas *Burkholderia cepacia* e Pâncreas de porco.

Entre todas as matrizes inorgânicas estudadas, o óxido de nióbio (ON) vem

apresentando resultados eficientes no estudo de imobilização de lipase, esse tipo de suporte é utilizado em vários tipos de reações como: esterificação, hidrólise e condensação, entre outros. Podendo aumentar acentuadamente a atividade catalítica e prolongam a vida do catalisador mesmo adicionando em pequenas quantidades (LOPES *et al.*, 2015, p. 106).

O nióbio é um metal de transição, possuindo algumas características como: refratário, e $Z = 41$. Seu principal uso é como matéria-prima na fabricação de ligas de aço para a produção de tubos condutores de fluidos. Sua aplicação tem aumentado em razão da versatilidade, vantagens econômicas e disponibilidade de suprimento a longo prazo deste metal (ROCHA *et al.*, 2020, p. 122-123).

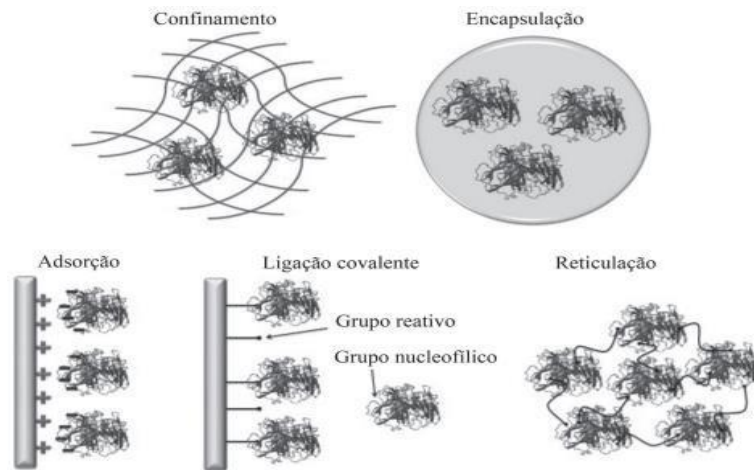
Entre diversos materiais orgânicos utilizados para suportes na imobilização, destaca-se a quitosana (QUIT) que apresenta algumas vantagens devidos as propriedades como, não toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além disso é considerada um suporte promissor devido a presença de vários grupos reativos, capazes de reagir com um alto número de agentes ativadores imobilização enzimática (RAFIEE; REZAAE, 2021).

Devido essas propriedades alguns estudos apresentaram que a quitosana pode ser aplicada como suporte em diferentes tipos como, hidrogéis, membranas e principalmente na sua forma em esferas, devido sua interação na superfície de contato (SHANKAR *et al.*, 2020).

O polihidroxibutirato (PHB) é considerado macromolécula orgânica, podendo ser utilizado como biomaterial biodegradável e termoplástico. Esse material é obtido por uma variedade de microrganismos (BINHAYEEDING *et al.*, 2020). Alguns estudos mostram que o PHB pode servir para a suporte de imobilização de enzimas devido suas vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil reabsorção (BIANCO; PADILHA; CORREA, 2019).

Diversos tipos de imobilização são classificados pelo tipo de ligação e interação: covalente, reticulação, adsorção, aprisionamento e encapsulamento (REIS *et al.*, 2019) (FIGURA 1).

Figura 1 - Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação.



Fonte: Modificada de Fernández-Fernández *et al.* (2013).

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. Isso se deve às diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e às diversificadas aplicações dos produtos obtidos. Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações. A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada. (REIS *et al.*, 2019).

Neste trabalho, uma ênfase maior será dada ao método de imobilização por ligação covalente. A imobilização por ligação covalente consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes. A força dessa ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros. (REN *et al.*, 2021).

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas.

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos. (SU *et al.*, 2021).

Geralmente, o glutaraldeído é uma molécula mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis. Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff. (MENDES; CASTRO; GIORDANO, 2013; DARIFF, 2021).

4.0 CAPÍTULO 2 - ARTIGO SUBMETIDO

Evaluation of different heating sources in the hydrolysis reaction rate of residual frying oil catalyzed by free and immobilized lipase

1 Article

2 **EVALUATION OF DIFFERENT HEATING SOURCES IN**
 3 **THE HYDROLYSIS REACTION RATE OF RESIDUAL**
 4 **FRYING OIL CATALYZED BY FREE AND IMMOBILIZED**
 5 **LIPASE**

6
 7 **Thais B. A. Correia¹**

8 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

9 **Grazielle P. R. Souza¹**

10 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

11 **Willian S. M. Reis²**

12 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

13 **Janaina M. Theodoro²**

14 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

15 **Vitor B. Hidalgo²**

16 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

17 **Jorge H. V. Santos²**

18 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

19 **Patrícia C. M. Da Rós^{2*}**

20 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

21 **Ernandes B. Pereira¹**

22 <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

23 ¹Federal University of Alfenas, Postgraduate in Biotechnology, Alfenas, MG, Brazil

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

25 Editor-in-Chief: (Filled in by the admin.)

26 Associate Editor: (Filled in by the admin.)

27 Received: DD-MM-YYYY; Accepted: DD-MM-YYYY. (Filled in by the admin.)

28 *Correspondence: patriciadaros@usp.br; ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br

29 **HIGHLIGHTS**

- Efficiency test of the cycle of immobilized lipases in the hydrolysis of residual oil.
- Study of different heat sources in the treatment of greasy waste (oil).

Abstract: The growing demand for residual cooking oil is being generated with high frequency in various sectors, where it is often improperly disposed of, causing serious environmental problems. However, another widely used alternative is the use of lipases in enzymatic hydrolysis, since it has been very attractive for several sectors, allowing the use of products generated from this reaction, such as: free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols and free glycerol, besides presenting advantages in operating in mild conditions of temperatures and pressure. The present study aimed to evaluate alternatives for hydrolysis reaction of residual frying oil by evaluating the efficiency of different types of supports and different types of heating systems, using the free and immobilized forms of lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) and Porcine pancreas (PPL) as a biocatalyst. Polyhydroxybutyrate (PHB), niobium oxide (Nb_2O_5) and chitosan (CHIT) were evaluated as support for immobilization of BCL and PPL lipases, with the results of hydrolytic activity superior to the immobilization derivatives with PHB and Nb_2O_5 . Among the heating systems evaluated, the highest percentage of hydrolysis of residual oil was obtained in the ultrasound system for both free lipases and immobilized lipases, reaching 57.91% hydrolysis for lipases immobilized in Nb_2O_5 and 61.11% hydrolysis for the derivative immobilized in PHB. The operational stability of both prepared biocatalysts was evaluated with similar half-life time values for both.

Keywords: Residual cooking oil 1, *Burkholderia cepacia* lipase 2, Porcine pancreas lipase 3, Immobilization 4, Hydrolysis 5.

1.0 INTRODUCTION

Vegetable oils are considered natural products and can be extracted from seeds, grains or plants, are soluble in organic solvents and insoluble in water, consisting mainly of triacylglycerols formed from three fatty acid molecules and a glycerol molecule [1].

Vegetable oil extracted from soybean (*Glycine max*) is the most commonly produced oil, being mostly composed of linoleic acid, lecithin and a variety of vitamins [2]. This oil is widely used in food preparation, mainly by frying method, in homes, restaurants, bakeries and food process industries, generating large amounts of residual oil [3].

In the frying process, the oil is subjected to high temperatures, thus, when used repeatedly, multiple reactions can occur such as the change in the composition of fatty acids, monoglycerides, diglycerides, polymerization, hydrolysis, isomerization and oxidation causing unpleasant taste, foaming and change in viscosity. The harmful compounds generated by the frying process makes the oil unsuitable for human consumption, and may also cause environmental problems when discarded incorrectly [4].

With the growing demand for fried products and the inadequate disposal of residual oil, concerns arise as to their destination [5]. In most cases, the final destination of residual oil generated annually in Brazil is inadequate, causing serious environmental problems, such as clogging of sewage networks, direct contamination of rivers, lakes and soils causing the death of fauna and flora and increased processes in sewage treatment plants [6].

In this context, technological advances have been proposed to reduce, reuse and recycle residual frying oil, in order to generate valuable products to be used in various sectors [7]. The possibility of recycling residual oil is very attractive, based on the sustainability of biological resources, environmental protection and economic considerations [8].

Lipases have the function of catalyzing hydrolysis reactions of fats and vegetable oils partial or total of the triacylglycerols, generating free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols and glycerol, which can be applied in various industrial sectors, such as food, pharmaceuticals, cosmetics, detergents, effluent treatment, biodegradable polymers, biodiesel, among others [9]. The enzymatic hydrolysis reaction has advantages and can be performed in lower temperature and pressure conditions by conventional chemical route, being able to obtain high quality products with higher yields.

In addition, lipases can be used in their immobilized form allowing their reuse for new reactions. Therefore, the use of lipases in their immobilized form is more advantageous due to their high thermal stabilization, ease in their recovery at the end of the process reducing costs, improvement in catalytic activity and specificity [10].

With everything, the importance of investigating new technology to recycle oil, this work aims to investigate new alternatives for hydrolysis reaction of residual frying oil evaluating the efficiency of different types of supports: niobium oxide, chitosan and polyhydroxybutyrate, in several types of systems: microwave, conventional and ultrasonic, using free and immobilized forms of *Burkholderia cepacia* commercial lipase (BCL) and Porcine pancreas (PPL).

2.0 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Two commercial lipases *Burkholderia cepacia* and Porcine pancreas bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) in a crude form were used in this study. The residual frying oil was obtained at the university restaurant of the Federal University of Alfenas, (UNIFAL-MG), from the frying of food. The oil was stored in dark plastic containers, kept at a temperature of 20 °C for the preservation of its characteristics. All other reagents were of analytical grade, including arabic gum, monobasic potassium phosphate, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, both acquired from Dinâmica company[®], sodium hydroxide, 70% ethyl alcohol (Vetec[®]); acetone (Neon[®]); phenolphthalein (Cinética[®]), Hexane, Nitric Acid, Polyhydroxybutyrate (PHB), γ aminopropyltriethoxysilane (γ -APTS), Polyethylene Glycol (PEG), Glutaraldehyde 25%, Potassium Bifthalate, Olive Oil (Carbonell).

2.2 Synthesis of the supports

Three supports for immobilization of BCL and PPL lipases were tested: niobium oxide, kindly given by the Brazilian Metallurgy and Mining Company-CBMM and by the Chemistry Department of the Federal Technological University of Paraná, Campus Pato Branco/PR, Chitosan in natura and polyhydroxybutyrate (PHB) kindly provided by the Federal University of Ceará.

The commercial niobium oxide support was prepared according to the methodology described by Da SILVA [11]. Initially, the material was pretreated by immersion in nitric acid solution (HNO_3 at 1 %) and heated to 75 °C under agitation for 1 h. Subsequently, the material was filtered and washed with distilled water until neutral pH was obtained. The support was taken to kiln drying at a temperature of 105 °C for 24 h. Then, pretreated niobium oxide was activated involving two steps: silanization of the support with triethoxysilane γ -aminopropyl (γ -APTS at 0,5 % v/v) solution and activation of the support with glutaraldehyde solution (GA at 2.5 % in hydrogen phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, pH 8).

The chitosan hydrogel (CHIT) support was prepared according to the methodology described by Mendes [12]. For each gram of chitosan powder, 20 mL of glacial acetic acid 5% (v/v) was used under a mechanical agitation of 1000 rpm at 25 °C. The solution was dripped in NaOH 0.5 mol L⁻¹ in the ratio 1:10 support: NaOH, under agitation of 100 rpm at 25 °C for approximately 15 h. Then, the suspension was filtered, thoroughly washed with distilled water and stored in 70% (v/v) ethanol solution at 4 °C. Subsequently, chitosan hydrogel was activated with glutaraldehyde 2.5% (v/v) under agitation of 200 rpm at 25 °C for 1 h.

The preparation of polyhydroxybutyrate (PHB) support was based on the adapted methodology of Binhayeeding [13], where PHB powder was immersed in anhydrous ethanol for 4 h followed by filtration. The activation of this support was performed according to the activation steps of the niobium oxide support described above.

2.3 Immobilization of lipases

The immobilization of lipases in the supports was performed according to the methodology described by Da Silva [11], in which the activated support was immersed in hexane in a solid:liquid ratio of 1:10 and kept under mild agitation for 2 h. Then, for each gram of activated support, 100 μL of polyethylene glycol solution 5 mg mL⁻¹ (PEG-1500) and 250 mg lipase were added in its free form. The suspensions containing enzyme and support were kept under agitation for 2 h, followed by static contact for an additional period of 18 h to 4 °C. Then the immobilized lipase was recovered by vacuum filtration and subjected to drying in a desiccator.

The process of immobilization of lipases in the hydrogel support of chitosan was also carried out according to the methodology described by Mendes [12], in which 9 mL of enzymatic solution was used for each gram of support, at a concentration of 0.025 g mL⁻¹ of lipase. The mixture was kept under agitation of 200 rpm for 18 h followed by filtration, with distilled water washing and stored at 4 °C for 18 h.

2.4 Determination of enzyme activity

The enzymatic activity (U g^{-1}) was evaluated by the hydrolysis of olive oil emulsion at a fixed proportion oil/water 1:1. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1 μmol of free fatty acid per min under the assay conditions. The results were expressed in activity units per gram of free enzyme [14].

2.5 Enzymatic hydrolysis of residual cooking oil catalyzed lipases

Hydrolysis reactions were conducted in different heating systems: conventional, ultrasound (Model USC 1800-A Ultrasonic Cleaner (Unique)) and microwave irradiation (Discover/ University-Wave, Cem Corporation model PN# CE-925SB235-SPB-PLUG), containing substrate consisting of a 1:2 oil/buffer solution (0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) and emulsifier. The reactions conducted under conventional heating were performed in 50 mL spherical glass reactor under mechanical stirring (500 rpm) at 40 °C for 4 h. The ultrasound heating reactions were performed under the same temperature and time conditions, with a power of 100 W. Experiments carried out in the microwave reactor were maintained in a 100 mL spherical glass reactor, coupled with reflux condenser and magnetic agitation at 200 rpm.

The proportions of biocatalysts were defined from the work developed by Souza [15], in which a mixture planning was used to optimize the proportion of each biocatalyst in the process. Thus, the best-established condition was 85% of BCL lipase and 15% of PPL.

In order to investigate the hydrolysis kinetic behavior, 0.1 g aliquot samples were taken at various time intervals and analyzed by titration according to Da Rós [16]. The 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 amount. ROONEY AND WEATHERLEY [17].

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

Where: V_{KOH} is the volume of potassium hydroxide solution (KOH) required during titration; M_{KOH} is the KOH molarity (0.0483 mol L⁻¹); \overline{MW} is the average molecular weight of fatty acids (g mol⁻¹); W is the weight of the sample taken; and f is the fraction of oil at start of reaction.

2.6 Recovery of immobilized lipase

The immobilized lipases, resulting at the end of each reaction, were separated from the reaction medium and recovered by filtration and washing with hexane in the Buchner funnel. Then, the biocatalyst was kept in a desiccator for 2 h and stored at 4 °C for later use in hydrolysis reactions.

2.7 Operational stability of biocatalysts

After the definition of the best heating system for conduction of reactions, the operational stability of the immobilized systems was verified in hydrolysis reactions of the fried residual oil in consecutive batches with reuse of the immobilized system. Hydrolysis reactions were performed using the same operating conditions described in the hydrolysis process of residual frying oil. Between batches, immobilized lipase was washed and filtered with hexane for 3 h for removal of the reagents and/or products eventually retained in the support. After this period, the recovered lipase was reused in another batch with the substrate at the same concentration as the initial reaction.

3.0 RESULTS

3.1 Hydrolytic activity of lipases in their free and immobilized form

Table 1 presents the results performed by the hydrolytic activities of BCL and PPL lipases in their free and immobilized form in the different supports: niobium oxide (Nb₂O₅), polyhydroxybutyrate (PHB) and chitosan (CHIT), using the hydrolysis method of olive oil.

Table 1. Hydrolytic Activities Of Bcl And Ppl Lipases In Their Free Form And Immobilized In The Supports: Nb₂o₅, Phb, Chit.

Biocatalyst	Hydrolytic Activity (U/g)			
	Enzyme Free	Nb ₂ O ₅	PHB	CHIT
BCL	8020.07	1428.50	1122.37	61.07
PPL	1201.06	798.70	205.31	48.66

The results presented in Table 1 indicated that BCL lipase of microbial origin presented higher hydrolytic activity (8020.07 U/g), compared with PPL lipase of animal origin (1201.06 U/g), both in its free

form. According to the literature, there are some factors that differentiate the two sources of lipases, which may explain these results.

The high activity of lipases from *Burkholderia cepacia* is due to the fact that they do not present regiospecificity, that is, they have the ability to hydrolyse in any position the fatty acids of triacylglycerols [18]. Another relevant factor of BCL is its high thermal stability. According to studies conducted by SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA [19], the results showed that BCL lipases at temperatures of 40 - 60°C do not denature, and can be applied in processes such as hydrolysis of soybean oil at temperatures lower than those applied in traditional commercial processes. On the other hand, PPL lipase can present optimum temperature of performance between 40 - 45°C [20], being a soluble enzyme secreted by the Porcine pancreas. In addition, another characteristic of PPL lipase is to hydrolyse only the fatty acids of triglyceride positions 1,3 [21]. Thus, both lipases evaluated could be applied as combilipases (lipase mixture) in residual oil hydrolysis reactions in the same temperature range in later stages.

When analyzing the results of lipase activity in their immobilized form (Table 1), the most expressive values of hydrolytic activity were also achieved by BCL lipase immobilized in the Nb₂O₅ (1428.50 U/g) and PHB (1122.37 U/g) supports, when compared to chitosan immobilization, which obtained lower results (61.07 U/g). Thus, in view of this lower result, the lipases immobilized with chitosan support were not applied in the hydrolysis tests of residual oil, since the low activity value would not present efficiency in the percentage of hydrolysis. Despite the wide variety of immobilization methods, no method can be applied to all enzymes efficiently, that is, this is due to the fact that there is a heterogeneity between enzymes, in relation to the composition and conformation of their structure, substrate and product properties, and reaction medium [22].

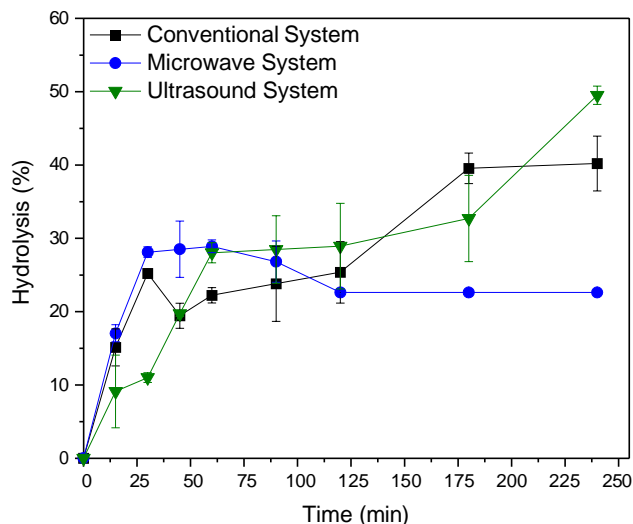
Regarding the immobilization of immobilized PPL lipase in the two supported supports, the results were lower than those presented by BCL immobilized in the same supports, reaching Nb₂O₅ (798.70 U/g), PHB (205.31U/g) and CHIT (48.66 U/g). In addition to the lower hydrolytic activity of PPL in its free form, it should be considered that when a portion of the lipases are immobilized, the support is immobilized in such a way that its active site is less accessible to the substrate, and consequently its reaction activity [23].

3.2 Hydrolysis With Residual Oil Using Lipases *Burkholderia Cepacia* And Porcine Pancreas In Free Form

This study was the choice of the best enzymatic combination between lipases of microbial and animal origin for the hydrolysis reaction with residual oil, through an experimental planning of lipase mixtures, carried out by SOUZA [15] whose objective was to determine the best conditions for the hydrolysis reaction. The optimized hydrolysis results found by the authors were as follows: BCL lipases 0.4g (85%) and PPL 0.545g (15%). In the present study, the masses of immobilized enzyme corresponding to the results of the study by Souza [15], of each lipase (BCL and PPL) were used in different heating systems: microwave, conventional and ultrasound.

The use of a mixture with lipases of different specificities, known as "combilipases" has become increasingly attractive to the industrial sectors, allowing to use enzymes capable of hydrolysing optimally, resulting in high reaction yield and productivity in the process [24]. Rodrigues and Ayub [25], evaluated the hydrolysis of soybean oil, using a mixture with two different types of lipases: *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei*. The results showed that the use of combilipases, yields were 15% higher than using only one of the lipases, obtaining 95% hydrolysis with the mixture of the two lipases. Thus, in view of the results presented, the use of mixture with different lipases is an efficient and promising technology for the enzymatic synthesis and hydrolysis of vegetable oils. Figure 1 shows the results of the percentage of hydrolysis obtained in the microwave system.

Figure 1 - Enzymatic hydrolysis of the mixture of BCL and PPL lipases in its free form using different systems: ultrasound, microwave and conventional.



At the end of the 2 h hydrolysis time, the reaction stabilized reaching 22.61% hydrolysis. According to Dalla Rosa [26], agitation is an important variable to be evaluated, as it can promote a better homogenization of the medium during the reaction, minimizing the separation of phases and allowing adequate contact enzyme/substrates. Therefore, magnetic agitation of 200 rpm was insufficient to maintain the emulsion intact, occurring phase separation (water/oil), thus decreasing hydrolysis yields, since agitation is one of the fundamental factors for the efficiency of the hydrolysis process.

In conventional and ultrasound systems, a mechanical agitation of 500 rpm was employed, being higher than the power of the microwave system. Therefore, the test that obtained the highest percentage in the hydrolysis of the residual frying oil was the ultrasound system, reaching 49.51% in a period of 240 minutes. In the conventional system, hydrolysis reached about 40.2% and was also superior to the microwave system with magnetic agitation, but lower than the result obtained with the ultrasound system. In view of these results presented, agitation is not the only factor that influenced the increase in enzymatic hydrolysis, ultrasound irradiation waves also provided an increase in reaction yield, providing greater stability of the reaction medium (water/oil).

Marotti [27], evaluated the effect of the ultrasound system and the stability of the medium emulsified with mechanical agitation (300 rpm), in the process of hydrolysis of vegetable oils for the performance of *Penicillium* lipase, it was noted that mechanical agitation became the most effective reaction process, providing interfacial stability (water/oil), increased diffusion of substrates with the active sites of the enzyme, resulting in increased hydrolysis yield.

In the study by Raizer [28], they evaluated the influence of the enzyme and temperature on the reaction of enzymatic hydrolysis of sunflower oil, using phospholipase A1 lipase (Lecitase Ultra) in its free form, assisted by the ultrasound system, the best conditions obtained for the hydrolysis reaction were 40°C and 1.7 m% of enzyme/substrate fraction, noted that the use of ultrasound, the reaction medium (water/oil) acquires a homogeneous and opaque appearance, generating stable emulsions, based on the results (95%), reported that the use of this system in the enzymatic process proved to be effective in the reaction of enzymatic hydrolysis.

In search of new techniques that bring improvement to the performance of processes in various sectors, especially industrial ones, the technology that employs the ultrasound system, has become increasingly an efficient alternative, due to the benefits: product quality, good reuse of the catalyst, minimization of reaction time [29, 30].

3.3 Hydrolysis with residual oil using a mixture of *burkholderia cepacia* lipases and porcine pancreas immobilized in the niobium oxide support (combi-nb₂O₅)

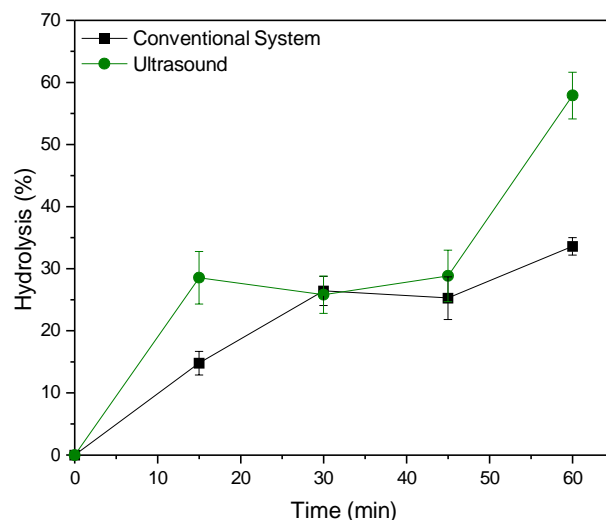
Another important factor in the present study is the technique of enzymatic immobilization using the combilipases, this technique presents some advantages, such as, possibility of reuse, ease of separation between the catalyst with product, high degree of substrate conversion and purity of the product making it more commercially competitive, improving the operational stability of the enzyme, reducing production costs [23, 31].

Although the immobilization process can occur in several methods, there is a constant search for simpler and more economical techniques. However, the most common methods for lipase immobilization are physical adsorption and covalent bound [32]. By the results of superior hydrolytic activity of lipases

immobilized in the niobium support (Combi-Nb₂O₅), they were selected to be evaluated in the ultrasound systems and in the conventional system.

According to the results presented in Figure 2, the Combi-Nb₂O₅ derivative used in the ultrasound system proved to be efficient and reached a hydrolysis percentage of 57.91%, in a period of 60 min, being a higher result than that obtained with BCL + PPL in its free form (49.51%). With a conventional method, approximately 34% of hydrolysis was reached in 60 min of reaction, and a result was also higher than that achieved with combilipase (BCL + PPL) in its free form (22.23%).

Figure 2 - Combi-Nb₂O₅ enzymatic hydrolysis using the conventional and ultrasound systems.



When comparing the results between the heating sources, the ultrasound system showed superior results. This fact may be attributed to the irradiation waves of the ultrasound system that promote a greater interaction with the emulsion, thus increasing the reaction speed favoring the hydrolysis process. In the literature, studies that elucidate the ultrasound system can be found, reporting its benefits in biotechnological reactions [33].

Mello [34] also evaluated the application of ultrasound in hydrolysis of crambe oil catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase in its free form. The authors reported that the use of ultrasound as a heating source provided an increase in the rate of hydrolysis, reaching up to 78% of hydrolysis of crambe oil. It was also reported that the ultrasound waves provided a greater stability of the emulsion during the hydrolysis reaction, not occurring the separation of the substrate phases (water/oil) and thus increasing the interaction between the lipases and the substrate.

Another important factor of this study is the combined use of several lipases with different specificities, this technique can be a way to obtain an ideal biocatalyst [25]. The concept of combilipase is considered an alternative to reduce reaction time and increase the conversion rates of the hydrolysis reaction, since combilipase will act briefly, acting in different positions of triglycerides in the composition of the oil [35].

According to Alves [36] report on the concept of the biocatalyst called combilipase for heterogeneous substrates, this conception of the authors was based on the fact that a biocatalyst composed of a mixture with different lipases presents to be more effective on heterogeneous substrates than using a specific lipase.

In the study by Huang [37] used a mixture of two different lipases: a specific 1,3 lipase of *Rhizomucor miehei* and another lipase not specific, *Penicillium cyclopium*, where they were submitted to a hydrolysis reaction of lard, according to the authors, the results obtained reached up to 78.1%, report that the use of combilipases with different specificity proved to be effective for the enzymatic production of AGL, used lipid substrates such as lard.

3.4 Operational stability of the mixture of *burkholderia cepacia* lipases and porcine pancreas immobilized in the niobium oxide support

The stability of the biocatalyst is a parameter of fundamental importance when one intends to industrially use an immobilized enzyme [38]. When we reuse the immobilized lipases in several reaction cycles, it can cause partial or total loss of catalytic activity, due to the desorption of this enzyme in the reaction medium.

The Combi-Nb₂O₅ derivative was used in 3 cycles for at least 180 min in the hydrolysis reaction of the residual oil, being recovered twice. The tests were submitted to the ultrasound system that presented better

efficiency in the percentage of ultrasonic and conventional hydrolysis with mechanical agitation at 500 rpm, temperature 40°C. The results obtained in the ultrasound and conventional systems are presented in Figures 3 and 4, respectively

Figure 3 - Combi-Nb₂O₅ recycle in the ultrasound system.

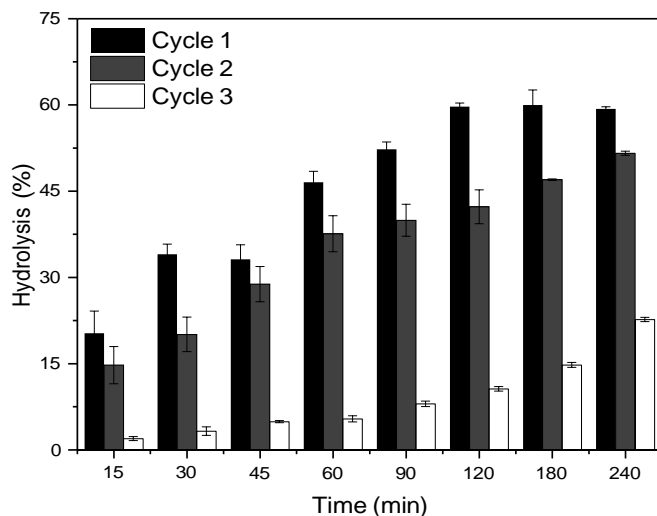
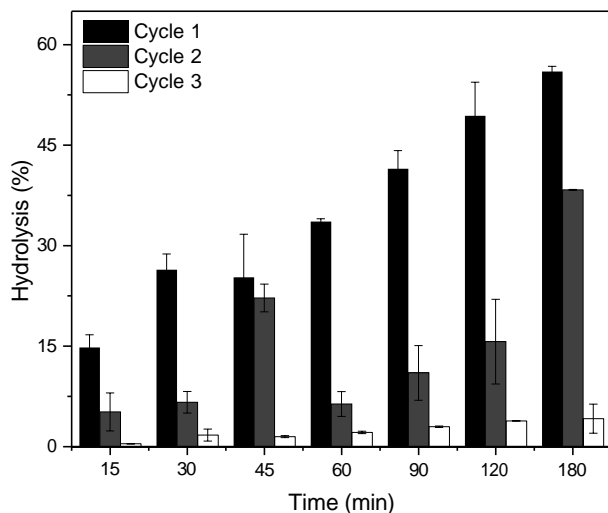


Figure 3 shows the use of the ultrasound system in the Combi-Nb₂O₅ recycle. For the first reaction cycle, a percentage of approximately 60% was reached in 120 min of reaction and that was maintained until 240 min. In the second cycle there was a decrease of 13.06%, with 51.60% of the percentage of maximum hydrolysis and in the third cycle a more marked decrease of 61.77%, with a maximum hydrolysis of 22.69% in 240 min. These results may have been influenced by the recovery of the biocatalyst in each cycle, and in the second cycle, 59.30% of the recovery of the immobilized derivative was obtained and in the third cycle 7.71%.

Zenevicz [29] reported that the use of the ultrasound system in the enzymatic hydrolysis of soybean using 10% (m/m) of the immobilized commercial lipase Lipozyme TL IM, the authors obtained results of 89% hydrolysis, in a reaction time period (2h), indicating that the ultrasound system influences the increase in the percentage of hydrolysis.

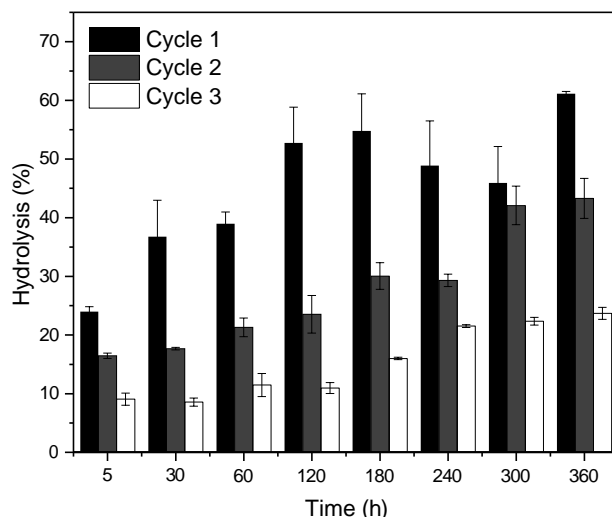
According to studies conducted by Waghmare and Rathod [30] when they used Novozyme commercial lipase immobilized in macroporous polyacrylic resin granules, in the hydrolysis of residual cooking oil, under the influence of ultrasound irradiation, they obtained results of 74.19% in two hours of reaction, thus concluded that ultrasound-assisted hydrolysis has a certain efficiency in the process, mainly in reducing reaction time and high yield of 80%.

Figure 4 shows the use of the conventional system in the Combi-Nb₂O₅ recycle. For the first reaction cycle a maximum percentage of 56% was reached in 180 min of reaction. In the second cycle there was a decrease of 31.52%, with a maximum percentage of 38.35% of hydrolysis percentage in 180 min and in the third cycle a decrease of 92.52%, with a low percentage of hydrolysis of 4.19% in 240 min. The pronounced decrease in both cycles and the percentage of hydrolysis lower than the ultrasound system may be due, in addition to the absence of ultrasound waves, to the low recovery of the biocatalyst, which already in the second recycle obtained only 31.21% of recovery and in the third cycle was 7.25%.

Figure 4- Enzymatic hydrolysis and recovery of Combi-Nb₂O₅ in the conventional system.

3.5 Ultrasonom operational stability of the mixture of lipases *burkholderia cepacia* and porcine pancreas immobilized in the phb (combi-phb) support - ultrasound system

Due to the high hydrolytic activity presented by lipases immobilized in PHB (BCL, 1122.37U/g and PPL, 205.31U/g), the derivative of BCL and PPL lipases immobilized in PHB (Combi-PHB) was evaluated with the objective of comparing its efficiency in the hydrolysis and recycle process with the results obtained by Combi-Nb₂O₅. The ultrasound system was selected to evaluate the application of Combi-PHB in the hydrolysis reaction of the residual frying oil because it proved to be more efficient in benefiting the hydrolysis process than the conventional system. Figure 5 shows the results obtained in the hydrolysis of the residual oil with the application of combi-PHB using the ultrasound system, in a period of 360 min of reaction and temperature of 40°C.

Figure 5 - Enzymatic hydrolysis and recovery of Combi-PHB in the ultrasound system.

In the recycle assay with Combi-PHB, in the first cycle there was a percentage of hydrolysis of the residual oil of 61.11% in 360 min. In the second hydrolysis cycle, 43.21% and in the third cycle 23.64% hydrolysis. When comparing the recycle of Combi-PHB and Combi-Nb₂O₅ derivatives at the same reaction time (240 min), the Combi-PHB derivative was less efficient with 48.90% hydrolysis, being lower than the results obtained by the Combi-Nb₂O₅ derivative (59.35%). In addition, in the second cycle a greater decrease in the percentage of hydrolysis was also observed, with a decrease of 40.10% in relation to the first cycle and 56% for the third cycle. Some factors may be attributed to this result, such as the immobilization efficiency for each support, the initial activity of each biocatalyst, and the characteristics of each support used [39].

3.6 Determination of operational stability parameters

Enzymatic immobilization allows the reuse of expensive lipases, favoring improved stability and activity, increasing their productivity and bringing savings in reaction [40]. One of the main objectives of

immobilization is to increase its time of use in relation to free lipase, keeping it efficient several consecutive reactions [41]. The operational stability factor is limited to the half-life time of an enzyme, this parameter is used to determine the effectiveness of immobilization, especially when you want to use the enzyme immobilized in industrial sectors [42] In the present study, the operational stability of combilipases Combi-PHB and Combi- Nb₂O₅ was evaluated.

From the results obtained from lipase recycles in hydrolysis reactions, half-life time ($t_{1/2}$) and thermal inactivation constants were calculated (Table 2). The half-life time is defined as the time required for a 50% reduction in the initial activity of the enzyme to occur.

Table 2 - Operational stability parameters of Combi-PHB and Combi- Nb₂O₅- Constants of thermal inactivation and half-life times.

Supports	k_d (h ⁻¹)	Half-life time (h)
Combi-PHB	0.11	5.99
Combi-Nb ₂ O ₅	0.12	5.76

According to the results of Table 2, it is observed that for the Combi-PHB derivative, a k_d of 0.11 h⁻¹ and a half-life time of 5.99 h were had. For the Combi-Nb₂O₅ derivative, a k_d of 0.12 h⁻¹ and a half-life of 5.76 h were obtained. It is noted that the half-life time for both enzymatic derivatives were similar, approximately 6h. Therefore, for a temperature of 40 °C, both prepared biocatalysts presented the same operational stability during hydrolysis of the residual soybean oil of frying.

4.0 CONCLUSION

In the present study, the influence of the different heating systems (ultrasound, conventional and microwave) on the enzymatic hydrolysis of residual oil was evaluated, as well as the efficiency of the three types of support (Niobium oxide, PHB and CHIT) on the immobilization of BCL and PPL lipases. Niobium oxide and PHB have been shown to be efficient in immobilizing lipases. It was found that the use of ultrasound favors a higher rate of hydrolysis. The results obtained with the use of Combi-Nb₂O₅ proved to be more efficient than the combilipases in its free form in both ultrasound and conventional systems. Regarding the operational stability of Combi-PHB and Combi- Nb₂O₅, the half-life time was similar for both combilipases.

5.0 REFERENCES

- 01-Florindo, DNF; Freitas, SGD; Rodrigueiro, MM da S.; Mollo Neto, M. .; Oliveira, KSM.; Santos. Revisão sistemática da literatura: Produção de biodiesel a partir de óleo residual de fritura. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento. 2022. vol. 11, n. (5) 33511527106
- 02-Zhang J, Li M, Kong Z, Bai T, Quan R, Gao T, Duan L, Liu Y, Fan B, Wang F. Model prediction of herbicide residues in soybean oil: Relationship between physicochemical properties and processing factors. Food Chemical. 2022 Feb 15;370 131-363.
- 03- FRAGA JL, Pereira AS, Diniz MM, Fickers P, Amaral PFF. Valorization of urban waste oil by microbial conversions. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering. 2021 Dec;4: 100-145.
- 04- Khor YP, Wan SY, Tan CP, Zhao G, Li C, Wang Y, Li Y. Potential of using basa catfish oil as a promising alternative deep-frying medium: A thermo-oxidative stability study. Food Res Int. 2021 Mar;141:109-897.
- 05- Tarmizi, AHA, Hishamuddin E, Razak Ra. Impartial assessment of oil degradation through partitioning of polar compounds in vegetable oils under simulated frying practice of fast food restaurants. Food Control. 2019 Feb;96:445-455.
- 06-Júnior JGEG, Mattos FR, Sabi GJ, Carvalho WCA, Luiz JHH, Cren EC, Fernandez-Lafuente R, Mendes AA. Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2022 Feb;10(1):107062.
- 07- Bácoli MRS, Nunes PCA, Milan WW. Óleo De Cozinha Residual: Análise Na Cidade De Iturama/Mg Da Destinação, Impactos Ambientais E Viabilidade Empresarial. Rev. Eletrônica Organ. Soc. 2018 Dec;7(8): 80-102.
- 08- Oliveira MM, Gonçalves MFS. Perspectivas do óleo residual de fritura: uma abordagem economica, jurídica e socioambiental. Revista Espacios. 2016 May;37(25):17
- 09- Reinehr CO, Bortoluzzi L, Morais VQ, Smaniotto TM, Zen CK, Oliveira D, Treichel H, Colla LM. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por Aspergillus utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. Revista Ciências Exatas e Naturais. 2016 Jun;18(1):19.
- 10- Silva LB, Silva LHA, Júnior PJS, Silva MGO. Production of artisanal soaps from residual frying oil and mixing it with Babassu and Tucum oils. Brazilian Journal of Development. 2021;7(9):91176-91192.

- 11- Da Silva APT, Bredda EH, De Castro HF, Da Rós. Enzymatic catalysis: An environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. *Fuel*. 2020 Aug;273:117786
- 12- Mendes AA, Oliveira PC, Hezir F. de Castro HF, Raquel de L. C. Giordano RLC. Aplicação de Quitosana como suporte para a Imobilização de Enzimas de interesse industrial. *Química Nova*. 2011 Jul 18;34(5):831-840.
- 13- Binhayeeding N, Yunu T, Pichid N, Klomklao S, Sangkharak K, Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. *Process Biochemistry*. 2020 Aug;95:174-185.
- 14- Fernandes AJ, Bredda EH, Da Rós PCM, Pereira EB. Sustainable Enzymatic Approach for the Production of Essential Fatty Acid Based on Coffee Oil Hydrolysis. *Catalysis Letters* 2021:1–8.
- 15- Souza GPR, Correia TBA, Reis WSM, Bredda EH, Da Rós PCM, Pereira EB. Enzymatic Hydrolysis of Waste Cooking Oil by Lipase Catalysis: Simplex Mixture Design Optimization. *Catalalyses letters*. 2022 May4:1-9
- 16- Da Rós PCM, Menezes TK, Bredda EH, Silva MB, De Castro HF. Microalgae as a Feedstock for Sustainable Fatty Acids: Factorial Design Study. *Chemical Engineering and Technology*. 2019 Sept;43(1):119–125
- 17- Rooney D, Weatherley LR. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biocher*. 2001 Apr;36(10):947–953.
- 18- GUIMARÃES, J., R. Evaluation of Strategies to Produce Highly Porous Cross-Linked Aggregates of Porcine Pancreas Lipase with Magnetic Properties. *Molecules*. 2018, 23(11), 2993.
- 19- Sánchez DA, Tonetto GM, Ferreira ML. Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions, *Biocatalysis*. 2017 Jan;115(1): 6–24.
- 20- Dias MF, Martins ML, Da Silva RR, Trevizano LM. Pré-Tratamento Enzimático de Efluente de Indústria de Laticínios Utilizando Lipases Microbianas. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*. 2021; 2(1):51-65.
- 21- Ramos MD, Miranda LP, Giordano RLC, Fernandez-Lafuente R, Kopp W, Tardioli PW. 1,3-Regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. *Biotechnol Prog*. 2018 Jul;34(4):910-920
- 22- Mesquita MVN, Gomes LS, Matos LFL, Oliveira ABM, Nunes DB, Cambrussi ANCO, Freitas AR, Ribeiro AB. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. *Boletim Informativo Geum*. 2018 Jun;9(2):38-50.
- 23-Souza LTA, Veríssimo LAA, João BCP, Santoro MM, Resende RR, Mendes AA. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. Vol. 4, *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. São Paulo: Blucher, 2017. p.529 -568.
- 24- Arana-Peña S, Carballares D, Berenguer-Murcia Á, Alcántara AR, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente, R. One Pot Use of Combi-lipases for Full Modification of Oils and Fats: Multifunctional and Heterogeneous Substrates. *Catalysts*. 2020 May;10(6):605.
- 25- Rodrigues RC, Ayub MAZ. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*. 2011 Mar;46:682-688.
- 26- Dalla Rosa, C, Morandim MB, Ninow JL, Oliveira D, Treichel, H, Oliveira JV. Lipase-Catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *Journal of supercritical Fluids*. 2008. Vol. 47, 49-53.
- 27- Marotti BS, Cortez DV, Gonçalves DB, Castro HF. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. *Química Nova*. 2017 May;40(4):427-435.
- 28- Raizer E, Molinari D, Reinehr TO, Fetsch VT, Awadallak JA, Da Silva C, Da Silva EA. Produção de ácidos graxos livres através de hidrólise enzimática do óleo de girassol em ultrassom. *Revista Tecnológica*. 2015 Mar 18:63-71.
- 29- ZENEVICZ, M. C. P. et al. Hidroesterificação enzimática de óleo de fritura em sistema de ultrassom utilizando lipases imobilizadas. Vol. 80, *Industrial Crops and Products*. 2016 February; 235-241
- 30-Waghmare GV, Rathod VK. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. *Ultrason Sonochem*. 2016 Sept;32:60-67.
- 31- Tavares F, Petry J, Sackser PR, Borba CE, Silva EA. Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. *Industrial Crops and Products*. 2018 Nov 15;124:254-264.
- 32- Remonatto D, Miotti RH, Monti R, Bassan JC, De Paula AV. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*. 2022 Mar;114:1-20.
- 33- Feiten MC, Rosa CD, Treichel H, Jr AF, Zenevich MC, Oliveira D, Oliveira JV. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014 Jul;3: 83-85
- 34- Mello BTF, Rodrigues GM, Silva C. Hidrólise Enzimática do Óleo de Crambe (*Crambe Abyssinica* H.) Assistida por Ultrassom. *E-xacta*. 2015 May 30;8(1):77-85
- 35- Freitas, VO, Matte CR, Poppe JK, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Ultrasound-Assisted Transesterification Of Soybean Oil Using Combi-Lipase Biocatalysts. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2019 June: 36: 995-1005
- 36- Alves, JS, Vieira NS, Cunha AS, Silva AM, Záchia Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. *RSC Advances*. 2014. 4(14), 6863–6868.
- 37- Huang, J. t al., Ultrasound-assisted hydrolysis of lard for free fatty acids catalyzed by combined two lipases in aqueous medium. *Bioengenharia*. 2020 January, 11:241-250
- 38- Kennedy JA, White CA. “Principles of Immobilization of Enzymes”. In: Wiseman, A. (ed.), *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2 ed., Chichester, Great Britain, John Wiley and Sons, 1985.
- 39- Remonatto D, Miotti RH, Monti R, Bassan JC, De Paula AV. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*. 2022 Mar;114:1-20.

- 502 40- Cardoso LC, Moraes MC, Cass QB. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na
503 busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*, 2009, Vol. 32, 1:175-187.
- 504 41- Saikia K, Rathankumar AK, Vaithyanathan VK, Cabana H, Vaidyanathan VK. Preparation of highly diffusible prous
505 cross-linked lipase B from *Candida antarctica* conjugates: Advances in mass transfer and application in
506 transesterification of 5-Hydroxymethylfurfural. *Int J Biol Macromol*. 2021 Feb 15;170:583-592.
- 507 42-Resende RR, Soccol CR, França LR. *Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria; Fundamentos E Aplicações*. 2016:
508 04: 12:20.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

Neste trabalho foram empregado diferentes sistemas de aquecimento na hidrólise do óleo residual de fritura, com as lipases LBC e LPP em sua forma livre e imobilizadas em diferentes tipos de suporte, a fim de determinar as condições que favorece a maior conversão em ácidos graxos. Durante os testes realizados, pode-se concluir que foi possível avaliar alguns fatores que influenciam no aumento do percentual da reação. O sistema de ultrassom apresentou maior eficiência na reação. As lipases imobilizadas com os suportes: Óxido de Nióbio, PHB foram mais eficientes apresentando um resultado de óxido de nióbio (57,91%) de hidrólise e PHB (61,11%).

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

- ✓ 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.
- ✓ Quantificar monoacilglicerol e diacilglicerol e avaliar a utilização como emulsificantes.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Taiwan**, Taiwan, v.44, p. 545–551, 2013.
- ANTUNES, M. C. Cadeia Reversa do Óleo de Cozinha Residual: o papel do Ponto de Entrega Voluntária (PEV). **Dignidade Re-Vista**, [S.l.], v.3, n.5, p.96-111, 2018.
- BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, Holanda, v. 20, p. 531–535, 1997.
- BIANCO, G. D.; PADILHA, G.; CORREA, W. Síntese de lubrificante sustentável usando lipase imobilizada de Burkholderia cepacia em polihidroxibutirato (PHB). **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, Campinas-SP, n. 27, p.1–1, 2019.
- BINHAYEEDING, N., et al. Immobilisation of Candida rugosa lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, [S.l.], v.95, p.174-185, 2020.
- CASTRO, A. C. C. M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, Holanda, v. 246, p. 48–57, 2018.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 38, p. 399 -409, 2015.
- CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial Application Of Lipase: A Review. **Biopharm Journal**, [S.l.], v.1(2), p.41-47, 2015.
- COSTA, M. J. et al. Otimização da etapa de hidrólise enzimática para a produção de biodiesel via hidroesterificação. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, São Paulo, 23, 2018. São Paulo. Anais...
- DARIFF, A. P. et al. Production and functionalization of paraffin support for enzymatic immobilization. **Perspectiva, Erechim**, [S.l.], v. 45, n. 171, p. 73-83, 2021
- DEHGHANNYA, J.; NGADI, M. Recent advances in microstructure characterization of fried foods: Different frying techniques and process modeling. **Trends in Food Science & Technology**, EUA., v.116, p. 786-801, 2021.
- DEPOORTER, E. et al. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Suíça, v. 100, p. 5215–5229, 2016.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B**, Italia, v. 11, no. 4–6, p. 649-656, 2001.

FERRAZ, J. L. A. A. et al. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [S.l.], v.20, n°.1, p.31-54, 2018.

FORERO-HERNANDEZ, H., et al. Comprehensive development, uncertainty and sensitivity analysis of a model for the hydrolysis of rapeseed oil. **Computers & Chemical Engineering**, [S.l.], v. 133, 2020.

GARRIDO, J. V. M. L.; BISPO, D. F.; SILVA, C. F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. **Scientia Plena**, [S. l.], v.14, n°. 6, p.064207, 2018.

GOGOI, S. et al. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross- linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. **Biocatalysis and Biotransformation**, Inglaterra, v. 24, n. 5, p. 343–351, 2006.

GU, Y., et al. Multifactorial effects of gluconic acid pretreatment of waste straws on enzymatic hydrolysis performance. **Bioresource Technology**, [S.l.], v.346, p.126617, 2022.

GUEDES JÚNIOR, J. G. E. et al. Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S.l.], v.10, 2022.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [S.l.], v.132, p.23-34, 2018.

JESUS, J. H., et al. Teor de Lipídios Da Batata Pré-Frita: Fritura Em Diferentes Óleos. **FAEMA Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v.7, p.151-164, 2016.

LANDGRAF, D. C.; BERTHO, R. M.; DIJULI, D. A. S.; SEIBEL, N. F. Qualidade do Óleo de Soja e de Batata Pré-Frita e Congelada Durante o Processo de Fritura. **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas**, Londrina, v. 5, p. 25-46, 2020.

LAU, H., et al. Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. **African Journal of Biotechnology**, Africa, v. 10, p. 7002- 7009, 2011.

LI, X., et al. Improving activity and enantioselectivity of lipase via immobilization on macroporous resin for resolution of racemic 1- phenylethanol in non-aqueous medium. **BMC Biotechnology**, [S.l.], v. 13, p. 986-991, 2013.

LOPES, O. F., et al. Óxidos de nióbio: uma visão sobre a síntese do Nb_2O_5 e sua aplicação em fotocatalise heterogênea. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 38, n°. 1, 106-117, 2015.

MA, J. et al. Understanding the role of waste cooking oil residue during the preparation of rubber asphalt. **Resources, Conservation and Recycling**, EUA, v.167, 2021.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource technology**, [S.I.], v. 77, n. 2, p. 145–55, abr. 2001.

MAROTTI B, S.; et al. Seleção de espécies do gênero penicillium produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 40, No. 4, p. 427-435, 2017.

MELO, A. D.; et al Synthesis of Benzyl Acetate Catalyzed by Lipase Immobilized in Nontoxic Chitosan-Polyphosphate Beads. **Molecules**, Suíça, v. 22, p. 1-17, 2017.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 78, p. 119–134, 2012.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L.C.; Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces Lanuginosus*. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p.245-251, 2013

MIRZAEI, F.; VALIZADEH, H.; PAZHANG, M.; Immobilization of papain on nitrogen-doped graphene quantum dots improves the enzymatic properties and makes it a biosensor for cystatin C. **Process Biochemistry**, Londres, v. 118, p. 307-316, 2022.

MIURA, T., et al. Convenient synthesis of Z-monoacetates of 2-alkylidene1,3- propanediols. **Tetrahedron**, [S.I.], v. 64, n. 39, p. 9305–9308, 2008.

MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. **Energy & Fuels**, [S.I.], v. 21, n. 6, p. 3689–3694, nov. 2007.

MUNHOZ, M. D. et al. Enzimas: da obtenção à aplicação. **Technical Report**, [S.I.], p. 1- 11, 2020.

OLIVEIRA, D. C. S., et al. Use of adsorbent materials to reduce the acid index of residual frying oil: An integrative review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, p.3259-3281, 2022.

ORTIZ, C. et al. O biocatalisador imobilizado com lipase “perfeito”? **Journal The Royal Society of Chemistry 2019**, Londres, v. 9, p. 2380–2420, 2019.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 64, n. 3–4, p. 140–145, jul. 2010.

PAULA, A. V., et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane– polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.I.], v. 82, n. 3, p. 281–288, 2007.

- PLOU, F. J. et al. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.I.]. v. 18, n. 1, p. 66–71, jan. 1996.
- QUEIROZ, C.; SOUSA, A. C. B., Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba v. 6, n. 7, p.51849-51860, 2020.
- RABELO, D. M.; HENRIQUES, O.; LABANCA, R. A. Avaliação da rotulagem de óleos vegetais segundo a legislação vigente: itens obrigatórios e opcionais. **A Barriguda Revista Científica**, [S.I.], v. 7, p. 23-34, 2017.
- RAFIEE, F.; REZAAE, M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan-based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.179, p.170-195, 2021.
- REIS, C. L. B., et al. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 42, No. 7, p.768-783, 2019
- REN, S.; et al. Enzymatic characteristics of immobilized carbonic anhydrase and its applications in CO₂ conversion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.I.], v. 204, p. 111779, 2021.
- ROCHA, A. G., et al. Modificação superficial em óxido de nióbio para a produção de hidrogênio. **Revista Tecnologia e Tendências**, Novo Hamburgo-RS , n°. 1, p. 112-137, 2020.
- ROSA, A. et al. Produção de biodiesel de óleo cru refinado e óleo de fritura de soja. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.9, n.2, p.59-66, 2020.
- ROSSI, G. Z. et al. Technical analysis of biodiesel production from residual fry oil. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa-MG, v. 04, n. 0, p.1- 8, 2018.
- SALIHU, A. et al. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent-based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda , v. 69, p. 66-73, 2011.
- SILVA B. M. et al. Otimização da produção enzimática de um aroma floral (octanoato de amila) catalisada por lipase imobilizada em sílica de casca de arroz funcionalizada, **Processos Químicos e Biotecnológicos**, Belo Horizonte, Editora Poisso, v.7, 1ª Edição, cap 10, p. 81-90, 2021.
- SILVA, B. C. R., et al. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**, [S.I.], v.14, n°.2 p.024201, 2018.
- SILVA, L. B., et al. Production of artisanal soaps from residual frying oil and mixing it with Babassu and Tucum oils. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba v.7, p.91176-91192, 2021.
- SILVA, M. C. L.; ALMEIDA, M. L. Logística Reversa e Destinação Correta do Óleo Residual Vegetal: Uma Análise do Programa Mundo Limpo Vida Melhor. **Seminários em Administração**, [S.I.], p. 1- 17, 2015.

- SILVEIRA, R. L.; ROCHA, A. C. P.; BENASSI, V. M. Importância biotecnológica das lipases. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, Ceará, v. 2, n. 3, p. 1- 6, 2021.
- SHANKAR, S. Development of support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the immobilization of anti-Shiga toxin 2B antibody. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 232, p.115785, 2020
- SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, Londres ,v. 50, p. 5850-5862, 2021.
- SHOW, P. L., et al. Recovery of lipase derived from Burkholderia cenocepacia ST8 using sustainable aqueous two-phase flotation composed of recycling hydrophilic organic solvent and inorganic salt. **Separation and Purification Technology**, [S.I.], v. 110, p. 112-118, 2013.
- SHUAI, W. et al. A Review on the Important Aspects of Lipase Immobilization on Nanomaterials. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S.I.], v.64, p.496–508, 2017.
- STOCKER LAGO, S. M.; ROCHA JUNIOR, W. F. Logística reversa, legislação e sustentabilidade: o óleo de fritura residual como matéria-prima para produção de biodiesel. **Gestão e Sociedade**, Belo Horizonte, v.10, n.27, p. 1437-1458, 2016.
- SUO, H., et al. Enhancement of catalytic performance of porcine pancreatic lipase immobilized on functional ionic liquid modified Fe₃O₄-Chitosan nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 119, p.624- 632, 2018.
- SUO, Z., et al. An enzymatic membrane reactor for oligodextran production: Effects of enzyme immobilization strategies on dextranase activity. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 271, p. 118430, 2021.
- TAVARES FILHO, C. R. L. et al. Síntese de Partículas De Copolímero de Estireno-divinilbenzeno Magnetizadas e sua Aplicação na Imobilização de Lipases. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Campinas, v. 11, 2015, Anais...
- TAVARES, F. et al. Rapid enzymatic hydrolysis of crambe oil catalyzed by castor seeds lipases. **Industrial Crops and Products**, [S.I.], v. 171, 2021.
- TAVARES, F., et al. Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. **Industrial Crops and Products**, Holanda , v.124, p. 254-264, 2018.
- TEIXEIRA, G. L., et al. Tecnologias alternativas para extração de óleos vegetais. **SBOG- Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras**, Campinas, Ed. 6, p. 1-5, 2021.
- VARANDAS, V. S., et al. Imobilização de lipase de Candida rugosa em suporte de quitosana por ligação covalente. **Scientia Plena**, [S.I.], v. 14, n. 6, p.064204, 2018.

WANG, X., et al. Immobilization of lipases onto the halogen & haloalkanes modified SBA-15: Enzymatic activity and glycerolysis performance study. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v 169, n°1, p. 239-250, 2021.

WANG, Q., et al. Engineering balanced anions coupling with tailored functional groups of poly(ionic liquid)s immobilized lipase enables effective biodiesel production. **Molecular Catalysis**, Holanda, v.531, p.112673, 2022.

YAO, L. W., et al. Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. **Journal of Molecular Liquids**, [S.l.], v. 354, p. 118849, 2022.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S.l.]. v. 81, n. 2, p. 157–160, fev. 2004.

ZHANG, J.; LIU, Y.; FAN, L. Effect of pore characteristics on oil absorption behavior during frying of potato chips. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Holanda, v. 66, p.102508, 2020.

ZHAO, J., et al. Expression and characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for application in enhancing fatty acids flavor release for low-fat cheeses. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 368, p. 1-10, 2022.

ZHENG, C.-Z. et al. Regioselective synthesis of amphiphilic metoprolol–saccharide conjugates by enzymatic strategy in organic media. **Process Biochemistry**, Londres, v. 46, n. 1, p. 123–127, jan. 2011.

ANEXOS

ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO/ E-MAIL

Adim BAPT <onbehalf@manuscriptcentral.com >

Para: patriciadaros@usp.br

Cc: Você; grazielle_2009_123@hotmail.com; willian.matias@usp.br; janamath@usp.br; vitorbhidalgo@usp.br **+4 pessoas**



Sáb, 13/08/2022 21:00

Dear Dr. Da Rós:

Your manuscript entitled "Evaluation of different heating sources in the hydrolysis reaction rate of residual frying oil catalyzed by free and immobilized lipase" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Your manuscript ID is BAPT-2022-0625.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Sincerely,

Brazilian Archives of Biology and Technology Editorial Office