



## Análise dos resíduos industriais e caseiros, óleos e gorduras residuais (OGR) processados em fermentação por microrganismos lipolíticos e isolados de óleos residuais.

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca <sup>1</sup>, Sandro Rogério de Sousa <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão (damarishadassa@hotmail.com)

<sup>2</sup> Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão (srsousa@ifsp.edu.br) - Orientador

### Resumo

O meio ambiente é direito de todos e a sua preservação deve ser exercida para que futuras gerações possam usufruir e obter boa qualidade de vida. Visando esse objetivo o presente trabalho busca uma nova alternativa para o reciclo de óleos e gorduras residuais (OGR's), que se descartados incorretamente podem provocar impactos significativos ao meio ambiente. O tratamento desse óleo pode ser feito a partir de leveduras lipolíticas que são capazes de produzir lipases ou ácido cítrico, como por exemplo, a *Yarrowia lipolytica*. Sendo assim esse óleo torna-se mais limpo e apto para ser reutilizado na produção de biodiesel, sabões e sabonetes, ou também com a produção de ácido cítrico. Esse composto pode ser usado em indústrias de alimentos, bebidas, produtos lácteos, como também na agricultura. Essa pesquisa utiliza oito linhagens de leveduras selecionadas de óleo residual em comparação com a *Yarrowia lipolytica*, e analisa se esses microrganismos são capazes de modificar o óleo e torná-lo mais limpo ou se produzem algum composto que possa ter algum valor agregado, obtendo assim uma nova alternativa para reaproveitar o óleo residual.

Palavras-Chave: Meio Ambiente. Óleos e Gorduras Residuais. *Yarrowia lipolytica*.

Área Temática: Impactos Ambientais

## Analysis of industrial waste and homemade, oils and fats waste (OGR), processed in proving in micro and isolated lipolytics oils waste

### Abstract

The environment is everyone's right and its preservation must be exercised so that future generations can enjoy and get good quality of life. Just for that purpose this paper seeks a new alternative for the recycling of waste oils and fats (OGR's), which is incorrectly disposed of can lead to significant impacts on the environment. Treatment of this oil can be made from lipolytic yeasts that are capable of producing lipases or citric acid, such as *Yarrowia lipolytica*. Thus this oil becomes clean and able to be reused in the production of biodiesel, soaps and soap, and also with the production of citric acid such compound may be used in food, beverage, dairy products, but also in agriculture. This research uses eight strains of residual oil selected yeast compared to *Yarrowia lipolytica*, and analyzes whether these microorganisms are able to modify the oil and make it cleaner, or to produce any compound that may have some value, thereby obtaining a new alternative to reuse the residual oil.

Key words: Environmen. Oils and Waste Fats. *Yarrowia lipolytica*

Theme Area: Environmental Impact



## 1 Introdução

“Todos têm direito ao meio ambiente equilibrado, bem de uso comum do povo essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.” É o que diz na Constituição da República Federativa do Brasil (CRFB) ART.225, visando a preservação ambiental juntamente com o desenvolvimento econômico e social, acarretando em um futuro melhor.

A preocupação com o meio ambiente começou apenas da década de 1960 a 1970, onde a industrialização crescia fortemente e os impactos ambientais já eram visíveis. Com isso fez-se necessário à busca por estratégias para resolver esse problema, foi então que na época de 1972 realizou-se a primeira conferência mundial voltada ao meio ambiente, a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente Humano, (Conferência de Estocolmo), que elaborou políticas de gerenciamento ambiental. Desde então políticas, leis e conferências vem surgindo para buscar uma diminuição do impacto ambiental mundialmente, podendo-se destacar o Protocolo de Kyoto em 1997, e a Rio+20 no ano de 2012.

No Brasil a importância com a preservação ambiental é buscada desde o surgimento de políticas ao meio ambiente, pode-se observar a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 275 de abril 2001, onde se busca a reciclagem de resíduos para se reduzir o consumo de matérias-primas, recursos naturais não renováveis, energia e água. Dentro desses resíduos se enquadra o óleo, que seu reaproveitamento é de suma importância para que se diminuam grandes impactos ao meio ambiente.

Os óleos e gorduras são comumente usados para alimentação humana, geralmente são utilizados para realização de frituras domésticas ou estabelecimentos de lanchonetes como as pastelarias.

Devido às características desses compostos, eles não devem ser descartados em pias, rios ou solos, pois a sua insolubilidade em água pode provocar grandes estragos ambientais. Segundo Rizzo; Gasparini; Silva, 2013, esses impactos são significativos. Quando são descartados em córregos, lagos, rios e mares, pode-se ocorrer a morte de seres aquáticos, como peixes, plantas marinhas e microrganismos. Se descartados em pias e vasos sanitários faz com que aconteça o entupimento de tubulações, que em um estado muito grave devem-se utilizar produtos químicos tóxicos para limpar essas tubulações podendo assim contaminar ainda mais o meio ambiente com uso dessas substâncias. E por fim na rede de esgoto pode ocasionar a infiltração no solo, poluindo o lençol freático. Sendo assim a reciclagem e o tratamento do óleo residual são de suma importância para a preservação do ambiente.

Novos estudos vêm surgindo para o tratamento e descarte do óleo, como a produção de biodiesel e produção de sabão e sabonetes. Para a quebra do óleo é necessário à utilização de catalisadores. E as lipases segundo Curi, et.al; 2002, são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em reações heterogêneas, suas funções fisiológicas digerem gorduras e mobilizam os triacilgliceróis armazenados nos organismos.

Um dos microrganismos capazes de sintetizar lipases são as leveduras, elas são fungos unicelulares não filamentosos, podem ser em sua maioria anaeróbio facultativo, podendo utilizar o oxigênio ou um composto orgânico como acceptor final de elétrons. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As leveduras que produzem lipases são classificadas como lipolíticas. Uma delas é a *Yarrowia lipolytica*, ela é conhecida por habitar ambientes lipídicos, e vem sendo modelo de estudos pelo fato de conseguir metabolizar lipídios associados à absorção de gordura, armazenamento, deposição, mobilização e regulação. (BEOPOLUS, 2009)

Outro método que se tem estudado é assimilação que as leveduras lipolíticas podem fazer usando uma fonte de carbono para produzir ácido cítrico. De acordo com Silva, 2010, pode-se concluir que a levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir ácido cítrico



utilizando glicerol PA e glicerol bruto como sua única fonte de carbono. Além do glicerol as leveduras lipolíticas podem assimilar glicose, álcoois, acetato e substratos hidrófobos, como ácidos graxos ou alcanos. (BARTH; GAILLARDIN, 1997)

Sendo assim a *Y. lipolytica* será utilizada como referência para a análise de outras leveduras selecionadas no Projeto: **Seleção de microrganismos aptos a produção industrial de lipídios a partir de resíduos industriais caseiros, óleos e gorduras residuais (OGR) e glicerol.** O óleo coletado residual caseiro será fermentado por oito linhagens dessas leveduras. Com isso, esse estudo analisará se esses microrganismos lipolíticos em meio OGR são capazes de produzir lipase, ácido cítrico ou outro composto que podem minimizar os efeitos causados ao meio ambiente, obtendo uma nova alternativa aos métodos de reciclagem e tratamento de óleos que hoje existem.

## 2 Materiais e métodos

Os experimentos desta pesquisa foram realizados em duas fases, a primeira etapa foi-se realizado a preparação das amostras e a segunda etapa realizou-se a análise dessas amostras.

Em seguida na figura 1, em forma de fluxograma mostra-se como foram realizados os procedimentos dessas duas fases.

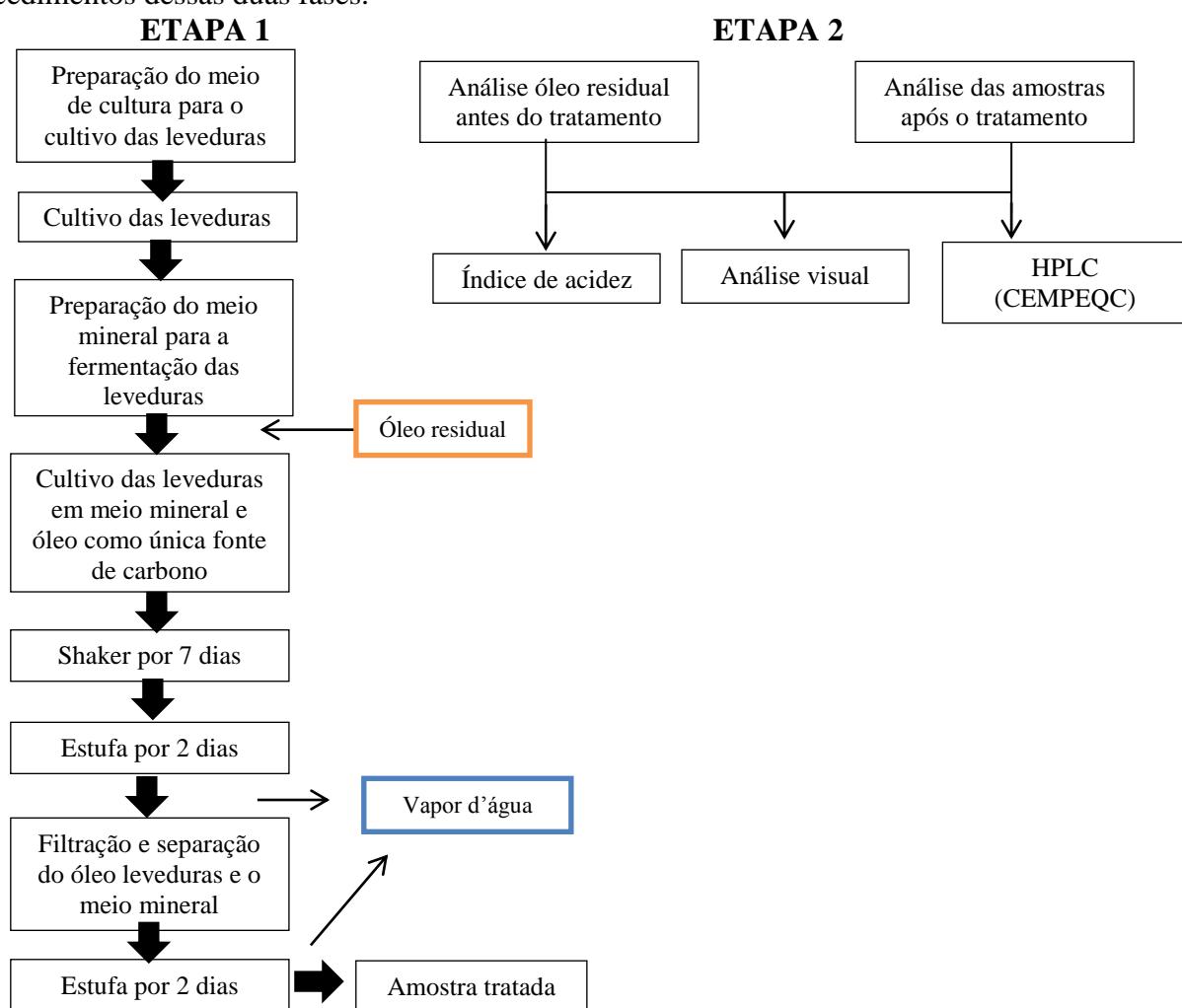


Figura 1 - Fluxograma das etapas 1 e 2. Etapa 1, obtenção da amostra tratada. Etapa 2 análise da amostra residual antes e depois do tratamento



## 2.1 Primeira etapa

### 2.1.1 Preparação do meio de cultura

Utilizou-se o meio de cultura YEPD (Yeast Extract Peptone dextrose), preparou-se um volume de 100mL, pegou-se 20 vials e colocou 3mL de meio em cada e levou-se para autoclave a 121°C por 15 minutos para esterilização das vidrarias e do meio, ao término os frascos foram encaminhados para a câmara de fluxo previamente limpa e esterilizada com raios ultra violeta (UV) até a sua solidificação.

### 2.1.2 Cultivo das leveduras

O cultivo das 8 linhagens mais a *Y. lipolytica* foram feitas nos vials previamente identificados com numeração de 1 a 8 e para a padrão identificou-se como Y.L. E utilizou uma alça de cultivo esterilizada no bico de Bunssen, passando uma alçada do vial principal para o novo vial. Ao concluir essa etapa as leveduras cultivadas foram encaminhadas para uma câmara de germinação por 2 dias com temperatura a 28°C.

### 2.1.3 Preparação do meio mineral

O meio mineral foi baseado de acordo com Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage contínuos culture, que relata os parâmetros de cultura ideal para o meio de cultura mineral. Utilizou-se então em g/L, 7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O; 1,5 MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O; 0,15 CaCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O; 0,02 FeCl<sub>3</sub> . 6 H<sub>2</sub>O; 0,06 ZnSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O; 0,5 MnSO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O; 0,5 extrato de levedura. Com o preparo de 1 litro desse meio neutralizado, pegou-se 9 erlenmeyer e em cada colocou-se 100mL de meio e mais 50mL de óleo residual, levou-se para autoclave afim de esterilizar, ao fim levou-se para a câmara de fluxo, previamente esterilizada.

### 2.1.4 Cultivo das leveduras em meio mineral, shaker e estufa

Na câmara de fluxo esterilizada, pegou-se os erlenmeyer com o meio mineral e óleo como única fonte de carbono, identificou-os e passou com duas alças as leveduras dos vials para o meio. Então esses frascos devidamente tampados foram colocados em uma incubadora shaker como mostra figura 2, sob agitação de 240rpm a 28°C. Depois de uma semana foram

Figura 2 - Amostras com meio mineral na incubadora shaker.



retirados os frascos do shaker, e foram colocados em uma estufa a 80°C por dois dias, onde parte da água foi evaporada e precipitou-se leveduras e os minerais no fundo do erlenmeyer.

### 2.1.5 Filtração, separação e estufa



Todas as amostras foram separadas utilizando um erleynmeyer, um funil e um papel de filtro, separando a parte sólida da parte líquida, depois com uma pipeta de pauster separou a parte superior (amostra), colocou-se em outros erleynmeyers e levou-se novamente para a estufa a 80°C por dois dias, a fim de realizar por completa a secagem das amostras. Posterior a essa etapa, os erleynmeyer foram tampados com parafilme e reservados.

## 2.2 Etapa 2

### 2.2.1 Índice de acidez

O índice de acidez corresponde à quantidade em miligramas (mg) de uma determinada base sendo elas KOH ou NaOH, necessária para neutralizar os ácidos graxos livres (AGL), presentes em 1 grama de gordura. A quantidade de ácidos graxos livres estará indicando que a amostra está em um processo de decomposição, como consequência está ficando cada vez mais ácida. O aumento de acidez ainda pode indicar a produção de ácido cítrico.

#### Procedimento:

O índice de acidez foi realizado tanto para amostras antes do tratamento quanto para depois do tratamento. Utilizou-se NaOH 0,1M como a base titulante, 2 gramas de amostra tratada, 25mL de solução éter-álcool (2:1) neutro para a solubilização da amostra e 2 gotas de fenolfitaleína 1%, a amostra foi titulada até a aparição da cor rosa claro.

Cálculo para obtenção do índice de acidez em mg de KOH/g de óleo está representado na Equação 1.

$$I.A \text{ (mgKOH/ g óleo)} = \frac{V \times Fc \times 5,61}{P} \quad \text{Eq. 1}$$

V: Volume em mL de NaOH 0,1M, gasto na titulação

Fc: Fator de correção de NaOH

P: Número de gramas da amostra

### 2.2.2 Análise em HPLC

As análises em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram realizadas no laboratório CEMPEQC localizado no Instituto de Química da UNESP (Universidade do Estado de São Paulo) em Araraquara São Paulo.

### 2.2.3 Análise visual

Foi-se observado a cor das amostras antes e depois do tratamento.

## 3 Resultados e discussões

Duas leveduras não foram analisadas, pois a levedura 4 foi registrada como inativa, porque não houve o crescimento da mesma no meio de cultivo YEPD, a levedura 5, foi descartada no meio do processo de estufa por erros na hora de se realizar o experimento com essa lipolítica. As demais linhagens e a *Y. lipolytica*, seguiram corretamente as etapas citadas no tópico 3.

### Índice de acidez

O índice de acidez foi então calculado, podendo obter os seguintes resultados apresentados na tabela 1.



## 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

Tabela 1 - Índice de acidez em mgKOH/g óleo das amostras antes e após o tratamento

Amostras	Índice de acidez mgKOH/g óleo
Óleo residual antes do tratamento	0,55
Óleo residual levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	5,29
Óleo residual levedura 1	1,42
Óleo residual levedura 2	1,12
Óleo residual levedura 3	1,21
Óleo residual levedura 6	0,9
Óleo residual levedura 7	0,93
Óleo residual levedura 8	1,37

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Pode-se observar que o óleo tratado com as leveduras apresentou um índice de acidez maior que a amostra que não foi tratada com as leveduras, isso pode ter ocorrido devido à presença de ácidos graxos livres, como também a possível produção de ácido cítrico.

### HPLC

As análises em HPLC já foram realizadas, mas não foi possível obter o resultado até o período de entrega desse artigo, se aprovado o resultado será incluído para a apresentação do mesmo.

### Análise visual

Outra análise que se realizou foi a análise visual, verificando que o óleo depois do tratamento ficou mais claro que o óleo antes de ser tratado, nota-se então que essas leveduras são capazes de tornar o óleo mais limpo, clareando o mesmo. Essa mudança de coloração pode ser observada nas figuras a seguir:

Figura 3 - Óleo residual antes do tratamento

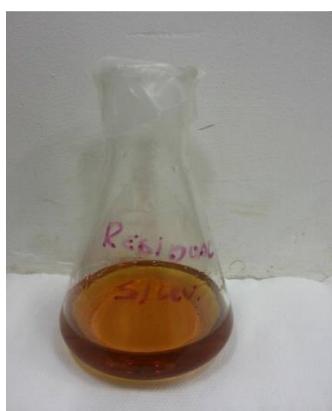


Figura 4 - Óleo tratado por levedura *Y. lipolytica*

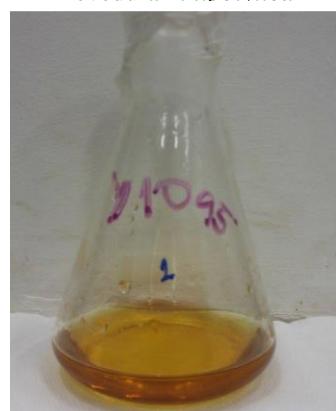


Figura 5 - Óleo tratado pela levedura 1





## 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

Figura 6 - Óleo tratado pela levedura 2



Figura 7 - Óleo tratado pela levedura 3



Figura 8 - Óleo tratado pela levedura 6



Figura 9 - Óleo tratado pela levedura 7



Figura 10 - Óleo tratado pela levedura 8



### 4 Conclusões

Pode-se concluir que o óleo tratado com as leveduras selecionadas no óleo residual, e a *Yarrowia lipolytica*, conseguem modificar a estrutura do óleo, que devido a sua alta acidez pós-tratamento há a grande possibilidade de ser ácido cítrico, isso será confirmado com a análise em HPLC. Essas leveduras são capazes também de clarificar o óleo, tornando-o mais limpo. Então essa alternativa pode ser eficaz para a sua utilização em alimentos, bebidas, agricultura entre outras indústrias que utilizam esse ácido em sua composição, obtendo assim uma nova alternativa para a reciclagem do óleo residual, colaborando com o meio ambiente.

### 5 Referências

- BARTH, G.; GAILLARDIN, C., **Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica***, [S.l.], FEMS Microbiology Reviews, v. 19, n. 4, p. 219-237, abr. 1997. Disponível em:< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x/pdf>> Acesso em: 12 de nov. 2015.



## 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

BEPOULOS, A., et al., ***Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production***, Toulouse, Elsevier Science, p. 375-387, ago. 2009. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/plipres](http://www.elsevier.com/locate/plipres)> Acesso em: 22 de out. 2015.

CURI, R. et al. **Entendendo as gorduras.** Os ácidos graxos. São Paulo: Barueri, Manole Ltda, 2002. 583 p. ISBN: 85-204-1355-2. Disponível em:<[https://books.google.com.br/books?id=8fdzDancvKMC&pg=PA461&dq=o+que+s%C3%A3o+lipases&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi\\_89KAzbTJAhVHlpAKHQpGB7YQ6AEIHDA#v=onepage&q=&f=false](https://books.google.com.br/books?id=8fdzDancvKMC&pg=PA461&dq=o+que+s%C3%A3o+lipases&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi_89KAzbTJAhVHlpAKHQpGB7YQ6AEIHDA#v=onepage&q=&f=false)> Acesso em: 22 de out. 2015.

PAPANIKOLOAU, S.; AGGELIS, G., **Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage contínuos culture**, Iera Odos, Elsevier Science, p. 43-49, ago. 2002.

RIZZO, M. R.; GASPARINI, S. T.; SILVA, N. F., **Óleos saturados: um estudo do descarte em estabelecimentos de Três Lagoas e Andradina**, [S.l.], ANAP Brasil, v. 6, n. 7, p. 85-104, jul. 2013. Disponível em <[file:///C:/Users/User/Downloads/424-862-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/424-862-1-SM%20(1).pdf)> Acesso em 15 de nov. 2015.

SILVA, L. V. **Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono.** 2010. 94p. Dissertação (Mestre em ciências) - Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:<<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/producao-de-acido-citrico-por-yarrowia-lipolytica-utilizando-glicerol.pdf>> Acesso em: 22 de out. 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. Eucariotos: Fungos, Algas, Protozoários e Helmintos. In: **Microbiologia**, 10ª Edição, Artmed, Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2012. p. 332. ISBN: 9780321550071