



BIORREMEDIAÇÃO DE ÓLEO LUBRIFICANTE USADO E CONTAMINADO UTILIZANDO LIPASES DE RESÍDUOS DE LARANJA E COMERCIAL

MURILO SPROCATTI SOUBHIA, MARCEL RODRIGUES FERREIRA, MILENE
STEFANI PEREIRA, LUCIANA FRANCISCO FLEURI

RESUMO

No Brasil mais da metade dos óleos lubrificantes comercializados e usados não são devidamente coletados e tratados, representando um grande problema ambiental e de saúde pública. O óleo lubrificante usado e contaminado (OLUC) é um resíduo tóxico, portanto, precisa ser coletado e receber processamento, sendo a biorremediação por lipases uma alternativa. O objetivo principal do presente trabalho foi o estudo da biorremediação do OLUC a partir da aplicação de lipases obtidas de resíduos de laranja, bem como de lipases comerciais, com o intuito de se estabelecer uma comparação. Foi realizada análise de atividade enzimática das diferentes lipases por método titulométrico, utilizando emulsão de goma arábica e azeite de oliva como substrato; biorremediação do OLUC, inferida pela atividade enzimática das diferentes lipases por método titulométrico, utilizando emulsão de goma arábica e OLUC como substrato; bem como análises dos componentes reacionais, em especial dos produtos, quanto à atividade antioxidante (determinada pelo método DPPH) e de influência no metabolismo celular de fibroblastos (determinada pelo método MTT). Como principais achados foram observadas biorremediação do OLUC por ambas as lipases, com atividades estatisticamente iguais. As atividades antioxidantes dos produtos reacionais das lipases na hidrólise do OLUC também foram estatisticamente iguais. Além disso, pela análise de PCA, constatou-se que OLUC antes da hidrólise enzimática comprometeu o metabolismo celular de fibroblastos, e, após a reação com lipase vegetal, possibilitou um aumento significativo do metabolismo das células. Dessa forma, este estudo inicial indica a utilização de lipases, em especial a de resíduos de laranja, para a biorremediação do OLUC.

Palavras-chaves: enzimas; *frit*; hidrólise; resíduos; óleo tóxico.

1 INTRODUÇÃO

Biorremediação é o processo em que um microrganismo ou uma biomolécula são utilizados para o tratamento de algum resíduo indesejado, metabolizando-o até gerar um produto menos tóxico. Sendo assim, o microrganismo ou biomolécula utilizados nesse método não podem demonstrar riscos significativos ao ambiente onde serão expostos. Dentro deste processo, podemos citar uma vertente mais específica chamada de biorremediação enzimática. Esta, por sua vez, terá o mesmo objetivo da biorremediação, porém haverá necessariamente o uso de uma enzima como meio para o tratamento do resíduo desejado (VIDALI, 2001).

Um tipo de enzima utilizada neste processo são as lipases, as quais são específicas à catálise da hidrólise de triglicerídeos. Esta reação ocorre em meio aquoso, mas esta mesma enzima em condições de baixa quantidade de água, é capaz de realizar reações inversas (FREIRE e CASTILHO, 2008). Quando comparadas em relação a métodos convencionais de biorremediação de resíduos oleosos, as lipases apresentam vantagens como especificidade com o substrato, atuação em condições brandas e na presença de poluentes, bem como a geração de

subprodutos atóxicos e maior rendimento do processo (OKINO-DELGADO et al., 2017).

No Brasil, pode-se considerar que o mercado de lubrificantes é dependente do mercado externo, uma vez que, entre os lubrificantes comercializados no país cerca de 55% em volume tem óleos básicos de origem nacional, tanto de primeiro refino como de rerrefino, sendo estes produtos muitas vezes de baixa qualidade (ANP, 2016). O principal componente do óleo lubrificante acabado é o chamado óleo básico, representando geralmente 90% de seu volume (PETROBRÁS, 2019), podendo ser de origem mineral (derivado do refino do petróleo), sintético (derivado de reações químicas), ou vegetal. Os óleos básicos minerais são classificados de acordo com a natureza dos principais hidrocarbonetos de sua composição, o que lhes conferem diferentes características, tais como índice de viscosidade, ponto de fluidez, volatilidade, resistência à oxidação (QUELHAS et al., 2011) e diversas aplicações (ANP, 2016). No entanto, esse óleo pode se tornar inadequado devido ao uso convencional e à presença de contaminantes, quando isso ocorre, ele é denominado de óleo lubrificante usado e contaminado (OLUC) (ANP, 2009; DUARTE, 1981). O OLUC é um resíduo perigoso e deve ser reciclado através dos processos de reprocessamento, regeneração, incineração ou rerrefino (ANP, 2016).

Assim, a partir do exposto, o presente trabalho visou a obtenção de lipases vegetais a partir de resíduos agroindustriais de laranjas; análise das atividades enzimáticas; estudo da biorremediação enzimática do OLUC com as lipases de resíduos de laranja e comercial; e análise dos componentes reacionais quanto às atividades antioxidante e de influência no metabolismo celular de fibroblastos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizadas lipases vegetais obtidas a partir de resíduos de laranjas (*Citrus sinensis*), variedade Pera, cultivadas e processadas pela empresa parceira *JBT Food Tech* (Araraquara-SP). Essas enzimas foram obtidas a partir da fração *frit*, a qual foi processada segundo o método realizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014). A título de comparação, também foi utilizada a lipase comercial de pâncreas suíno.

A atividade lipolítica das enzimas foi determinada pelo método titulométrico descrito por Macedo, Park e Pastore (1997) modificado por Okino-Delgado e Fleuri (2014), utilizando uma emulsão de goma arábica com azeite de oliva como fonte de triglicerídeos. Uma atividade de lipase (U/g) foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

A biorremediação do OLUC pelas lipases foi determinada em sistema reacional contendo emulsão de goma arábica e OLUC a 15,5% (v/v) e 0,5g de lipase de resíduo de laranja liofilizada ou de lipase comercial, por 30 minutos a 40°C (MACEDO, PARK e PASTORE, 1997), seguindo escopo descrito por Okino-Delgado et al. (2017). A biorremediação do óleo foi inferida pela atividade enzimática das diferentes lipases por método titulométrico, sendo calculada em termos de unidades de atividade enzimática, como descrito acima. O OLUC utilizado neste estudo foi obtido de uma doação feita pela Auto Mecânica Inter-Rios (Campinas-SP), proveniente da troca de óleo lubrificante de veículo popular.

As atividades antioxidante [determinada pelo método de redução do DPPH e calculada em % de redução do radical (ZHU et al., 2002)] e de influência no metabolismo de fibroblastos [determinada pelo método do MTT (BRACKETT et al., 2012; FARQUHARSON et al., 1993)] foram determinadas nos componentes reacionais, em especial nos produtos resultantes e seus respectivos controles (sistema reacional sem ação enzimática) após a atividade enzimática e na biorremediação por lipases.

Todas as análises foram realizadas em sextuplicatas, tendo seus dados avaliados pelo *software* Minitab 18, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, os componentes reacionais quanto à análise de influência

no metabolismo de fibroblastos, foram analisados, via SAS, por PCA (Análise dos Componentes Principais).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas atividade de lipase de *frit* de laranja e da lipase comercial utilizando emulsão de goma arábica e azeite de oliva de, respectivamente, 42,32 U/g e 664,5 U/g (Tabela 1), sendo a atividade da comercial cerca de 15 vezes maior em relação à de laranja. Essas atividades são superiores à descrita por Okino-Delgado e Fleuri (2014) que descreveu 22,95 U/g de lipase obtidas de resíduos da mesma fração e variedade de laranja. No entanto, a lipase de laranja, no presente estudo, apresentou atividade inferior em relação às de semente de maracujá e girassol, utilizando goma arábica e azeite de oliva como substrato, sendo, respectivamente, 77,9 e 77,1 U/g (SANTOS, 2013).

A biorremediação da emulsão de goma arábica e OLUC pela lipase de *frit* de laranja e pela lipase comercial implicaram, respectivamente, em atividades de lipase de 39,63 U/g e 52,02 U/g, as quais foram estatisticamente iguais (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade enzimática de lipase utilizando lipase de *frit* de laranja (LF) e lipase comercial (LC), biorremediação do OLUC mensurada pela determinação de atividade de lipase utilizando lipase de *frit* de laranja (LFO) e lipase comercial (LCO) e determinação das atividades antioxidante dos produtos reacionais.

	Atividade Enzimática (U/g)	Atividade Antioxidante (% DPPH reduzido)
LF	42,32 ± 0,64 B	34,29 ± 2,45 A
LC	664,5 ± 31,1 A	17,60 ± 1,98 B
LFO	39,63 ± 3,12 B	20,78 ± 2,15 B
LCO	52,02 ± 13,43 B	19,16 ± 0,75 B

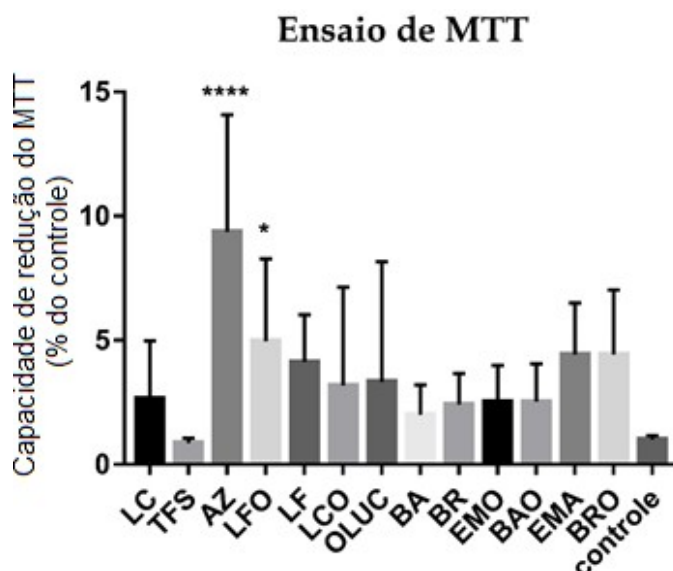
Médias seguidas de letra maiúscula verticalmente iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e $\pm$ Desvio padrão.

Comparando os resultados das atividades antioxidantes entre todas as combinações reacionais (Tabela 1) observa-se que os produtos de LC, LFO e LCO foram estatisticamente iguais, com destaque para o LF que apresentou a maior atividade antioxidante. Este resultado evidencia uma capacidade de biorremediação do OLUC independente da atividade enzimática, porém associada à atividade antioxidante a partir de uma lipase vegetal obtida pelo grupo de pesquisa. Pereira (2017) analisando a fração *frit* da laranja Pera obteve uma atividade antioxidante correspondente a aproximadamente 70% de redução do DPPH, a maior dentre as frações e variedades analisadas, sendo classificada como um extrato de fruta com forte capacidade antioxidante, segundo Melo et al. (2008). O resultado obtido no estudo relatado foi superior ao encontrado neste trabalho. Utilizando a mesma metodologia, o estudo de Francisco et al. (2019) obteve uma capacidade de redução do radical DPPH do produto reacional do azeite de oliva hidrolisado com *frit* de 69,5%, resultado também superior quando comparado ao deste trabalho.

Quanto à sua influência dos produtos reacionais no metabolismo celular dos fibroblastos, ilustrada na Figura 1, pode-se dizer que o azeite de oliva apresentou aumento do

metabolismo citado com maior significância. Já o produto reacional da atividade de lipase de *frit* utilizando OLUC como substrato de reação também apresentou um aumento do metabolismo celular, de menor significância quando comparado ao controle. Nenhuma outra amostra apresentou um estímulo ou inibição celular significativa quando comparados estatisticamente ao controle.

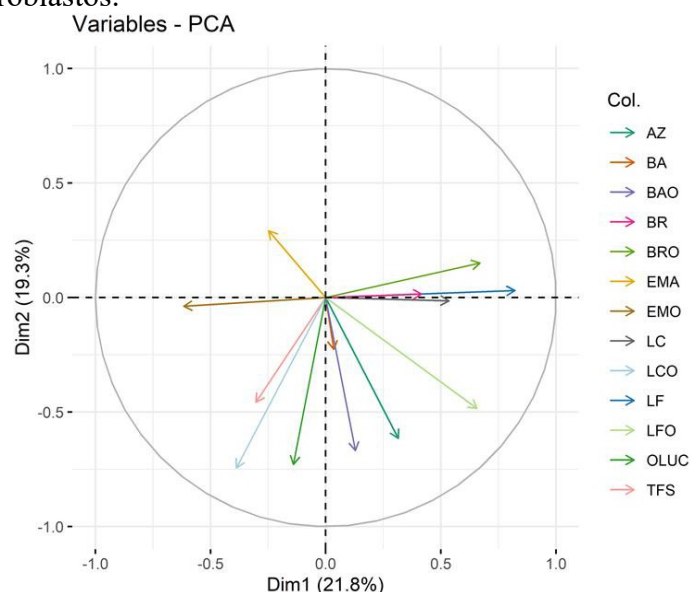
Figura 1: Influência dos componentes e produtos reacionais no metabolismo de fibroblastos pelo método do MTT.



Legenda: AZ Azeite; EMA Emulsão (goma arábica + azeite); EMO Emulsão OLUC (goma arábica + OLUC); BA Branco amostra sem reação (emulsão azeite + tampão + frit); BAO Branco amostra OLUC sem reação, (emulsão OLUC + tampão + frit); BR Branco reagentes com reação (emulsão azeite + tampão); BRO Branco reagentes OLUC com reação (emulsão OLUC + tampão); LC Atividade de Lipase Comercial utilizando azeite como substrato de reação; LCO Atividade Lipase Comercial utilizando OLUC como substrato de reação; LF Atividade de Lipase do Frit utilizando azeite como substrato de reação; LFO Atividade de Lipase de frit utilizando OLUC como substrato de reação; OLUC óleo lubrificante usado e/ou contaminado; TFS Tampão Fosfato de Sódio (pH 7 a 0,1M).

A Análise de Componentes Principais (PCA) dos resultados obtidos no ensaio de influência no metabolismo celular de fibroblastos expressou 41,4% da variância nos dois primeiros componentes principais, sendo PCA1 (Dim 1) responsável por descrever 21,8% e PCA2 (Dim 2) 19,3% da variância total (Figura 2). Os dados fornecidos pelo PCA permitiram correlacionar, positivamente e negativamente, as amostras utilizadas. A correlação positiva entre as amostras de azeite de oliva (AZ), atividade de lipase de *frit* utilizando OLUC como substrato (LFO), branco de amostra OLUC sem reação (BAO) e o branco de amostra sem reação (BA) indica que tais brancos reacionais também apresentaram um aumento do metabolismo celular. Já a emulsão de azeite de oliva (EMA), que apresentou correlação negativa com este agrupamento, demonstra um menor aumento ou comprometimento do crescimento celular. O tampão (TFS), atividade de lipase comercial utilizando OLUC como substrato (LCO) e OLUC puro (OLUC) representam outro agrupamento que apresentaram correlação positiva entre si, o que indica que o produto reacional da LCO e do OLUC não apresentaram aumento quanto ao metabolismo celular, uma vez que o TFS teve o resultado mais próximo do controle. Tais interpretações demonstram resultados de biorremediação, uma vez que o OLUC antes da hidrólise enzimática comprometeu o metabolismo celular, e, após a reação, possibilitou um aumento significativo deste.

Figura 2: Análise de componentes principais dos componentes e produtos reacionais no metabolismo de fibroblastos.



4 CONCLUSÃO

O presente trabalho, realizado de forma inédita na literatura até o momento, mostrou que lipases de resíduos de laranja apresentam grande potencial na biorremediação de resíduos petroquímicos, uma vez que apresentaram a mesma performance de lipase comercial, atividade antioxidante dos produtos reacionais e um aumento significativo do metabolismo celular de fibroblastos após a hidrólise do OLUC, quando este antes era citotóxico para a célula testada.

REFERÊNCIAS

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Panorama dos Óleos Básicos no Brasil: relatório técnico, Distrito Federal, 2016.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 19 de 18 de junho de 2009. Disponível em <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>>. Acesso em: 24 de agosto de 2020.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 20 de 18 de junho de 2009. Disponível em <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>>. Acesso em: 24 de agosto de 2020.

Brackett, M. G., Lewis, J. B., Kiouss, A. R., Messer, R. L., Lockwood, P. E., Brackett, W. W., & Wataha, J. C. (2012). Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(7), 1729- 1735.

Duarte, V. L. P. (1981). Atualidades Conselho Nacional do Petróleo. Farquharson, C., Whitehead, C. C., Rennie, J. S., & Loveridge, N. (1993). In vivo effect of 1, 25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(9), 1081-1088.

- Francisco, V. C. B., Okino-Delgado, C. H., Zanutto Elgui, M. R., Fernandes, C. J. D. C., Facanali, R., da Silva, R. A., Zambuzzi, W. F., Marques, M. O. M., & Fleuri, L. F. (2019). Plant oil bioconversion into increase biological activity through lipases derived from wastes. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1089-1099.
- Freire, G. D. M., & Castilho, F. L. (2008). Lipases em biocatálise. *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*, 1, 369-385.
- Macedo, G. A., Park, Y. K., & Pastore, G. M. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp.
- Melo, E. D. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. D., & Nascimento, R. J. D. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 193-201.
- Okino-Delgado, C. H. (2014). Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais – Utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco. 89f. Dissertação de Mestrado em Botânica - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Okino-Delgado, C. H., Prado, D. Z. D., Facanali, R., Marques, M. M. O., Nascimento, A. S., Fernandes, C. J. D. C., Zambuzzi, W. F., & Fleuri, L. F. (2017). Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. *PLoS One*, 12(10), e0186246.
- Pereira, M. S. (2017). Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos.
- Petróleo Brasileiro S.A.. Óleos Básicos Lubrificantes: Informações Técnicas de Dezembro de 2019. Disponível em <<http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/default.asp>>. Acesso em: 24 de agosto de 2020.
- Quelhas, A. D., Passos, C. N., LAGE, D., Abadie, E., Sousa, E. C. M., Cordeiro, F. G., & Pinto, P. R. C. (2011). Processamento de petróleo e gás. Rio de Janeiro. LTC, cap, 8, 118-121.
- Santos, K. C., Cassimiro, D. M., Avelar, M. H., Hirata, D. B., de Castro, H. F., Fernández-Lafuente, R., & Mendes, A. A. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial crops and products*, 49, 462-470.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., & Keen, C. L. (2002). Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6929-6934.