



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

***TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DE  
GORDURAS DOS RESÍDUOS GERADOS POR  
INDÚSTRIAS DE PRODUTOS AVÍCOLAS***

**Ernandes Benedito Pereira**

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Co-orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Fevereiro/2004

***TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DE  
GORDURAS DOS RESÍDUOS GERADOS POR  
INDÚSTRIAS DE PRODUTOS AVÍCOLAS***



## ***AGRADECIMENTOS***

Gostaria de expressar minha mais profunda amizade e gratidão:

À minha mãe Adelaide, a minha irmã Solange, a minha madrinha Maria e minha prima Marilucy, pelo amor, simpatia, paciência, estímulo e colaboração recebida em todos os momentos. Agradeço também ao meu cunhado Luiz Carlos Martinelli pelo apoio e colaboração durante a elaboração final da tese.

Aos meus orientadores Prof. Agenor Furigo Junior e Profa. Heizir Ferreira de Castro pelo incentivo, apoio e orientação competente durante a execução deste trabalho.

Aos professores do CPGENQ/UFSC, pelos ensinamentos que contribuíram na minha formação profissional.

Ao Secretário Edevilson, pela presteza, atenção e amizade.

À bolsista Cristiane Gallucci, pela amizade e colaboração durante a execução deste trabalho realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO).

À Denise e ao Murilo, pela amizade sincera, paciência, companheirismo e pelos bons papos, tenho certeza, que muito me ajudaram e contribuíram durante esse período a atingir esta etapa importante da minha vida. Obrigado mesmo. Vocês são especiais! Não poderia deixar de agradecer ao Murilo pela formatação final da tese.

Às minhas amigas Roberta, Luciane e Cíntia Marangoni, obrigado por tudo e pela amizade sincera. Vocês também fazem parte desta etapa.

Ao MSc. Adriano Aguiar Mendes (FAENQUIL) e a minha amiga Andréia pela amizade e agradável convivência.

Aos amigos Rogério, Marcus, Vanessa, Cláudia, Cristiane, Ricardo, pela simpatia e colaboração.

Aos coordenadores dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (UFSC) e Biocatálise (FAENQUIL), Profa. Gláucia e Profa. Heizir, pela infra-estrutura cedida para realização deste trabalho.

Também quero agradecer especialmente para o Fernando, uma pessoa que esteve comigo durante toda esta caminhada, transmitindo sempre segurança, apoio e simpatia, e acima de tudo uma pessoa sempre companheira em todos os momentos: na tristeza e na alegria. Muito obrigado.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq e a Fapesp pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Crise da Água: Uma Questão Atual</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. A Legislação Brasileira</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3. Tratamento de Efluentes</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4. Biotratamento</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5. Uso de Enzimas no Meio Ambiente</b> .....	<b>10</b>
<b>2.6. Indústria de Produtos Avícolas</b> .....	<b>12</b>
2.6.1. Importância Econômica do Setor.....	12
2.6.2. Qualidade da Água e sua utilização no Processamento Avícola.....	14
2.6.3. O Processamento como Fonte de Poluição da Água.....	15
2.6.4. Tratamento da Água utilizada no Abatedouro.....	18
2.6.5. Tratamento de Águas Residuárias.....	19
<b>2.7. Lipases no Tratamento de Efluentes com elevado Teor de Lipídeos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.8. Lipases</b> .....	<b>25</b>
2.8.1. Características e Propriedades.....	25
2.8.2. Reações Catalisadas pelas Lipases.....	26
2.8.3. Especificidade e Regiosseletividade.....	28
2.8.4. Aplicações Potenciais das Lipases.....	29
2.8.5. Hidrólise de Óleos e Gorduras por Lipases.....	32
2.8.6. Fatores que interferem no Processo de Hidrólise.....	33
2.8.7. Cinética Enzimática das Reações Lipolíticas.....	38
<b>2.9. Tipos de Reatores Anaeróbios para Tratamento de Efluentes</b> .....	<b>43</b>
2.9.1. Reator Anaeróbio de Contato.....	43
2.9.2. Filtro Anaeróbio.....	45
2.9.3. Reator Tubular de Leito Fixo.....	45
2.9.4. Reator de Leito Fluidizado.....	45
2.9.5. Reator de Fluxo Ascendente e Leito de Lodo (UASB).....	46
2.9.6. Reator Híbrido.....	46
<b>2.10. Aplicação do reator UASB no Tratamento de Efluentes com elevados Teores de Lipídeos</b> .....	<b>47</b>
<b>2.11. Tratamento de Efluentes por Processos Anaeróbios</b> .....	<b>48</b>
2.11.1. Digestão anaeróbia.....	48
2.11.2. Microbiologia do Processo Anaeróbio.....	49

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Materiais .....</b>	<b>52</b>
3.1.1. Enzimas .....	52
3.1.2. Substrato.....	53
3.1.3. Reagentes .....	53
<b>3.2. Equipamentos .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. Procedimentos Experimentais.....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Caracterização do Efluente.....	53
3.3.2. Testes de Seleção da Preparação de Lipase.....	54
3.3.3. Planejamento Estatístico.....	54
<b>3.4. Hidrólise do Efluente .....</b>	<b>55</b>
<b>3.5. Biodigestão do Efluente Pré-Tratado .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6. Análises .....</b>	<b>58</b>
3.6.1. Determinação da Concentração de Óleos e Graxas .....	58
3.6.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	59
3.6.3. Determinação da Alcalinidade Total .....	59
3.6.4. Determinação do Teor de Ácidos Graxo Livre.....	59
3.6.5. Determinação do Índice de Acidez Total .....	59
3.6.6. Determinação do Índice de Saponificação .....	60
3.6.7. Determinação da Concentração de Glicerol .....	60
3.6.8. Amônia.....	61
3.6.9. Fósforo e Fosfato Total .....	61
3.6.10. Composição em Ácidos Graxos .....	62
<b>3.7. Preparações Enzimáticas.....</b>	<b>62</b>
3.7.1. Determinação do Teor de Proteína .....	62
3.7.2. Determinação da Atividade Hidrolítica.....	63
<b>3.8. Propriedades Catalíticas das Preparações Enzimáticas .....</b>	<b>63</b>
3.8.1. Influência do pH na Atividade da Enzima.....	64
3.8.2. Influência da Temperatura na Atividade da Enzima .....	64
3.8.3. Estabilidade Térmica.....	64
3.8.4. Influência da Concentração Inicial de Substrato .....	64
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Propriedades Catalíticas das Preparações de Lipase.....</b>	<b>65</b>
4.1.1. Influência do pH na Atividade das Lipases .....	65
4.1.2. Influência da Temperatura.....	66
4.1.3. Estabilidade Térmica da Enzima .....	67
4.1.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos .....	69
<b>4.2. Caracterização Físico-Química do Efluente .....</b>	<b>71</b>
<b>4.3. Seleção da Preparação de Lipase.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4. Estudos da Otimização na Reação de Hidrólise do Efluente por Planejamento Experimental .....</b>	<b>77</b>
4.4.1. Avaliação dos Efeitos da Concentração de Enzima, Agente Emulsificante, Íons Cálcio e pH para a Enzima LCR.....	77
4.4.2. Avaliação da Influência Individual do ajuste do pH do Efluente com Solução Tampão sobre a Porcentagem de Hidrólise .....	80
4.4.3. Ajuste do pH do Efluente com Bicarbonato de Sódio ou Hidróxido de Sódio.....	83
4.4.4. Avaliação dos Efeitos da Concentração de Enzima, Agente Emulsificante, Íons Cálcio na Hidrólise do Efluente pela Enzima LKM.....	85
4.4.5. Influência do Ajuste do pH do Efluente com diferentes Soluções Alcalinizantes na Hidrólise empregando a Enzima LKM .....	89

<b>4.5. Composição em Ácidos Graxos do Efluente Hidrolisado pelas Enzimas LCR e LKM91</b>	
<b>4.6. Tratamento Anaeróbio do Efluente.....</b>	<b>96</b>
4.6.1. Operação com Efluente Bruto .....	96
4.6.2. Testes de Biodegradabilidade do Efluente Hidrolisado com a Enzima LCR .....	98
4.6.3. Testes de Biodegradabilidade do Efluente Hidrolisado com a Enzima LKM .....	101
<b>4.7. Comparação da Eficiência das Preparações de Lipases Testadas .....</b>	<b>103</b>
<b>4.8. Desempenho da Lipase Pancreatina LNU na Hidrólise e na Biodegradabilidade de Efluentes provenientes de Indústrias Avícolas .....</b>	<b>104</b>
<b>4.9. Avaliação Econômica .....</b>	<b>108</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>113</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>
<b>8. APÊNDICES .....</b>	<b>126</b>
<b>Apêndice 8.1. Propriedades e Características das Preparações Enzimáticas: Lipozyme e Lipolase .....</b>	<b>126</b>
<b>Apêndice 8.2: Curva de Calibração para Determinação de Proteína pelo Método de Bradford.....</b>	<b>127</b>
<b>Apêndice 8.3. Influência do pH e Temperatura nas Atividades das Lipases.....</b>	<b>128</b>
<b>Apêndice 8.4. Estabilidade Térmica das Lipases .....</b>	<b>129</b>
<b>Apêndice 8.5. Influência da Concentração de Substrato na Atividade Hidrolítica.....</b>	<b>130</b>
<b>Apêndice 8.6. Testes de Seleção das Preparações Enzimáticas.....</b>	<b>131</b>
<b>Apêndice 8.7. Planejamento Fatorial Fracionário .....</b>	<b>133</b>
<b>Apêndice 8.8. Planejamento fatorial completo (LCR).....</b>	<b>138</b>
<b>Apêndice 8.9. Planejamento fatorial fracionário pancreatina (LKM).....</b>	<b>142</b>
<b>Apêndice 8.10. Hidrólise do efluente com ajuste do pH por adição de diferentes soluções alcalinizantes (NaHCO<sub>3</sub> ou NaOH) empregando a LKM.....</b>	<b>147</b>
<b>Apêndice 8.11. Cinética de Biodegradação do Efluente Bruto.....</b>	<b>150</b>
<b>Apêndice 8.12. Cinética de Biodegradação do Efluente Tratado com LKM.....</b>	<b>151</b>
<b>Apêndice 8.12 (Continuação) .....</b>	<b>152</b>
<b>Apêndice 8.13. Lista de Divulgação dos Resultados.....</b>	<b>153</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Valores médios de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias.....	8
<b>Tabela 2.2.</b> Sistemas biológicos e funções específicas.....	9
<b>Tabela 2.3.</b> Aplicações potenciais de enzimas em biotecnologia ambiental.....	11
<b>Tabela 2.4.</b> Tipos de dejetos e subprodutos produzidos nas diferentes etapas do processamento avícola.....	16
<b>Tabela 2.5.</b> Estimativa do destino proporcional dos subprodutos do processamento avícola na Holanda....	19
<b>Tabela 2.6.</b> Características físico-químicas do efluente da Macedo Koerich S/A.....	20
<b>Tabela 2.7.</b> Aplicação de lipases no tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos.....	23
<b>Tabela 2.8.</b> Exemplos de lipases disponíveis comercialmente.....	26
<b>Tabela 2.9.</b> Aplicações potenciais das lipases.....	31
<b>Tabela 2.10.</b> Composição de ácidos graxos em diferentes óleos e gorduras.....	38
<b>Tabela 2.11.</b> Parâmetros cinéticos da lipase de <i>Candida rugosa</i> em diferentes substratos.....	42
<b>Tabela 2.12.</b> Vantagens e desvantagens dos processos anaeróbios.....	51
<b>Tabela 3.1.</b> Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do efluente.....	55
<b>Tabela 3.2.</b> Ensaios de biodegradabilidade (lodo anaeróbio).....	58
<b>Tabela 4.1.</b> Propriedades catalíticas das preparações de lipase testadas.....	65
<b>Tabela 4.2.</b> Constantes de inativação térmica das preparações LCR, LPP, LKM e LNU em meio aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0; 7,5 e 8,0), após 1h de incubação em diferentes temperaturas.....	69
<b>Tabela 4.3.</b> Parâmetros cinéticos para as preparações de lipases LCR, LPP, LKM e LNU.....	70
<b>Tabela 4.4.</b> Caracterização das preparações das lipases LCR, LPP, LKM e LNU.....	71
<b>Tabela 4.5.</b> Caracterização do efluente proveniente da Indústria Macedo Koerich.....	72
<b>Tabela 4.6.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente.....	72
<b>Tabela 4.7.</b> Desempenho das preparações de lipase na hidrólise do efluente de abate de frango.....	74
<b>Tabela 4.8.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{+1}$ ) para a lipase <i>Candida rugosa</i> empregando como substrato efluente da indústria de abate de frango.....	78
<b>Tabela 4.9.</b> Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise do efluente, de acordo com o planejamento fatorial $2^{+1}$ .....	79
<b>Tabela 4.10.</b> Análise de Variância do planejamento fatorial $2^{+1}$ proposto.....	79
<b>Tabela 4.11.</b> Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ para a lipase <i>Candida rugosa</i> em presença de tampão.....	80
<b>Tabela 4.12.</b> Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise do efluente, obtida nos ensaios realizados, de acordo com o planejamento fatorial completo $2^3$ proposto.....	82
<b>Tabela 4.13.</b> Análise de Variância do planejamento fatorial completo $2^3$ proposto.....	82
<b>Tabela 4.14.</b> Parâmetros de caracterização do efluente tratado com <i>Candida rugosa</i> .....	83
<b>Tabela 4.15.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{+1}$ ) para a lipase LKM empregando efluente da indústria de abate de frango.....	85
<b>Tabela 4.16.</b> Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise.....	87
<b>Tabela 4.17.</b> Análise de Variância para a porcentagem de hidrólise.....	88
<b>Tabela 4.18.</b> Ensaios complementares de hidrólise do efluente com pH ajustado por adição de diferentes soluções alcalizantes ( $\text{NaHCO}_3$ ou $\text{NaOH}$ ).....	89
<b>Tabela 4.19.</b> Caracterização da hidrólise de efluentes pela enzima LKM na presença e ausência de agente emulsificante.....	91
<b>Tabela 4.20.</b> Composição dos ácidos graxos liberados na hidrólise do efluente com as enzimas LCR e LKM.....	92
<b>Tabela 4.21.</b> Composição dos ácidos graxos livres liberados na hidrólise do efluente com a LKM com ajuste de pH: Influência do agente emulsificante e do íon cálcio.....	93
<b>Tabela 4.22.</b> Volume de metano produzido no teste de biodegradabilidade do efluente bruto e tratado enzimaticamente.....	103
<b>Tabela 4.23.</b> Caracterização do efluente hidrolisado pela enzima LNU na presença e ausência de agente emulsificante.....	105
<b>Tabela 4.24.</b> Tratamento anaeróbio do efluente pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU.....	105
<b>Tabela 4.25.</b> Comparação do desempenho das lipases LKM e LNU (0,2%) na hidrólise e biodigestão do efluente de indústria avícola.....	107



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> A ação catalítica de lipases. Um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) glicerol e ácidos graxos podem reagir para formar o triglicerídeo (JAEGER E REETZ, 1998).	25
<b>Figura 2.2.</b> Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (BALCÃO et al., 1996; VULFSON, 1994).	27
<b>Figura 2.3.</b> Reações envolvidas na hidrólise de óleos e gorduras por lipases (HARALDSSON, 1991).	34
<b>Figura 2.4.</b> Perfis de curvas cinéticas de lipases (MALCATA, 1995).	39
<b>Figura 2.5a.</b> Reator anaeróbio de contato.	44
<b>Figura 2.5b.</b> Filtro anaeróbio.	44
<b>Figura 2.5c.</b> Reator tubular de leito fixo	44
<b>Figura 2.5d.</b> Reator de leito fluidizado	44
<b>Figura 2.5e.</b> Reator de fluxo ascendente e leito de lodo (UASB).	44
<b>Figura 2.5f.</b> Reator híbrido.	44
<b>Figura 2.5.</b> Principais biodigestores (SPEECE, 1996).	44
<b>Figura 2.7.</b> Seqüência metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia (Salminen e Runtala, 2000).	50
<b>Figura 3.1.</b> Montagem experimental utilizada nos testes de biodegradabilidade.	56
<b>Figura 4.1.</b> Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases LCR, LPP e LKM, tomando como parâmetro referencial de 100% a atividade de 3400 U/mg para LCR, 5286 U/mg para a LPP, 4606 U/mg para a LKM e 3992 U/mg para a LNU. Ensaio realizado a 37 °C.	66
<b>Figura 4.2.</b> Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase LCR, LPP, LKM e LNU, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 3400 U/mg, 5286 U/mg, 4606 U/mg e 3992 U/mg, respectivamente.	67
<b>Figura 4.3.</b> Influência da temperatura de incubação na atividade residual da LCR (pH 7,0), LPP (pH 7,5), LKM (pH 8,0) e LNU (pH 8,0). Ensaio realizados a 37 °C, substrato azeite de oliva 50% (1 h).	68
<b>Figura 4.4.</b> Atividade hidrolítica das lipases em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37°C).	70
<b>Figura 4.5.</b> Cromatograma da composição em ácidos graxos presentes no efluente bruto	73
<b>Figura 4.6.</b> Desempenho das preparações de lipases na hidrólise dos lipídeos contidos no efluente 40 °C e agitação (200 rpm).	76
<b>Figura 4.7.</b> Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase <i>Candida rugosa</i> sob diferentes condições.	78
<b>Figura 4.8.</b> Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase <i>Candida rugosa</i> sob diferentes condições.	81
<b>Figura 4.9.</b> Superfície de resposta para a porcentagem de hidrólise do efluente catalisada pela lipase LCR, descrita pela equação 4.3.	83
<b>Figura 4.10.</b> Perfil da formação de ácidos graxos na hidrólise de efluente com ajuste de pH inicial empregando diferentes soluções: (a) tampão fosfato, (b) bicarbonato de sódio ou (c) hidróxido de sódio.	84
<b>Figura 4.11.</b> Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase pancreatina (LKM) sob diferentes condições	86
<b>Figura 4.12.</b> Curva de nível para a porcentagem de hidrólise do efluente catalisada pela lipase LKM, descrita pela equação 4.4.	88
<b>Figura 4.13.</b> Perfil de formação de ácidos graxos na hidrólise enzimática do efluente tratado com a lipase pancreatina (LKM) de acordo com o planejamento fatorial (40 °C, 200 rpm).	90
<b>Figura 4.14.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado com LCR (t = 0 h).	93
<b>Figura 4.15.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LCR (t = 12 h).	93
<b>Figura 4.16.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente, utilizando LKM (t = 0h).	94
<b>Figura 4.17.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM (t = 12 h).	94
<b>Figura 4.18.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na presença de cálcio e ausência de agente emulsificante (t = 0 h).	94
<b>Figura 4.19.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na presença de cálcio e ausência de agente emulsificante (t = 12 h).	95

<b>Figura 4.20.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na ausência de cálcio e presença de agente emulsificante ( $t= 0$ h). .....	95
<b>Figura 4.21.</b> Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na ausência de cálcio e presença de agente emulsificante ( $t=12$ h). .....	95
<b>Figura 4.22.</b> Cinética de produção de metano do efluente bruto em função do tempo (Lodo anaeróbio, 35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).....	97
<b>Figura 4.23.</b> Cinética de produção de metano do efluente bruto emulsificado e lodo anaeróbio em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm). .....	97
<b>Figura 4.24.</b> Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade (a) efluente bruto, (b) efluente emulsificado (Lodo anaeróbio, 35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm). .....	98
<b>Figura 4.25.</b> Cinética de produção de metano do efluente não emulsificado (a) e emulsificado (b) tratado com LCR em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm). .....	99
<b>Figura 4.26.</b> Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente emulsificado (a) e não emulsificado (b) tratado com LCR. (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).....	100
<b>Figura 4.27.</b> Cinética de produção de metano do efluente tratado com LKM - (a) efluente não emulsificado, (b) efluente emulsificado em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).....	102
<b>Figura 4.28.</b> Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente não emulsificado (a) e emulsificado (b) tratado com LKM (35 °C, 30 dias, agitação de 50 rpm). .....	103
<b>Figura 4.29.</b> Cinética de produção de metano do efluente hidrolisado com a lipase LNU (a) efluente não emulsificado e (b) emulsificado em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm). .....	106
<b>Figura 4.30.</b> Testes comparativos de biodegradabilidade utilizando as lipases LKM e LNU, numa concentração de 0,2% em função do tempo (Lodo anaeróbio, 35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).....	108

## ***NOMENCLATURA***

AG:	Ácidos Graxos
AGCL:	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGL:	Ácidos Graxos Livres
AGV:	Ácidos Graxos Voláteis
AOT:	bis (2-etilexilssulfosuccinato de sódio)
ATP:	Trifosfato de Adenosina
EPA:	Ácido Eicosapentaenóico
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DG:	Diglicerídeos
DHA:	Ácido Docosaexaenóico
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO:	Demanda Química de Oxigênio
EGSB:	Expanded Granular Sludge Bed
EDTA:	Etileno Diamino Acetato Dissódico
FAD:	Flavina Adenina Dinucleotídeo
LKM:	Lipase Kin Master
LNU:	Lipase Nuclear
LPP:	Lipase Sigma
Kd:	Constante de Desativação Térmica
Km:	Constante de Michaelis-Menten
MG:	Monoglicerídeos
NAD:	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NKT:	Nitrogênio Kjeldahl Total
OG:	Óleos e Gorduras
pNPP:	p-nitrofenilpalmitato
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acids
SST:	Sólidos Solúveis Totais
SSV:	Sólidos Solúveis Voláteis
Vmax:	Velocidade Máxima
TG:	Triglicerídeos
UASB:	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

## **RESUMO**

Efluentes com elevados teores de gorduras e proteínas, como os gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral, apresentam demanda química e biológica de oxigênio elevada. A digestão anaeróbia destes rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante à liberação de ácidos graxos pelos microrganismos específicos com atividade lipolítica. Além disso, as gorduras podem solidificar-se a temperaturas mais baixas, causando prejuízos de ordem operacional tais como, a formação de espuma pelas camadas de lipídeos e de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, levando à perda da eficiência e até mesmo ao colapso do reator. Para contornar estes problemas, faz-se necessário o emprego de dispositivos para retenção de gorduras, como separadores água-óleo e flotadores. Estas técnicas estão sujeitas às falhas constantes associadas à variação temporal da carga de gordura e outros fatores de ordem operacional. Deste modo, para solucionar estes problemas e evitar os inconvenientes anteriormente citados, um pré-tratamento destes efluentes por meio da adição da enzima lipase vem sendo considerado como uma técnica bastante promissora para reduzir o tempo de retenção destes efluentes na digestão anaeróbia com conseqüente redução dos impactos ambientais.

Objetivou-se neste trabalho, viabilizar tecnicamente a aplicação de um pré-tratamento enzimático para a remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases disponíveis comercialmente. O trabalho experimental foi realizado em três etapas.

Numa primeira etapa, o rejeito foi caracterizado segundo normas técnicas recomendadas, e os valores encontrados para os diversos componentes analisados, como índice de saponificação (IS) igual 188,60 mg KOH/g; teor de óleos e gorduras de 48,3 g/L e de demanda química de oxigênio de 3930 ppm, indicam que a composição química do efluente está dentro dos limites esperados.

Em seguida, o rejeito foi submetido à hidrólise enzimática empregando diferentes preparações de lipases comerciais visando selecionar a enzima mais adequada considerando-se os fatores custo e eficiência. Nessa etapa foram testadas cinco preparações de lipases comerciais, duas de origem animal (pâncreas de porco-LPP e pancreatina-LKM) e três de fonte microbiana (*Candida rugosa* - LCR, Lipolase e Lipozyme). Dentre as lipases testadas, o desempenho mais eficiente foi demonstrado pela Lipozyme (Hidrólise =

20,4%), entretanto devido ao seu elevado custo o emprego desta preparação fica comprometido para este tipo de tratamento. Desta forma, selecionou-se para testes posteriores a lipase microbiana de *Candida rugosa* (LCR) e a preparação de lipase pancreática-LKM que apresentaram comportamentos satisfatórios atingindo porcentagem de hidrólise de 13,2% e 18,8%, respectivamente.

Na segunda etapa, a metodologia de planejamento experimental foi utilizada para determinar os efeitos das seguintes variáveis: concentração de enzima ( $x_1$ ), concentração de agente emulsificante ( $x_2$ ), concentração de íons cálcio ( $x_3$ ) e ajuste do pH do efluente ( $x_4$ ), na porcentagem de hidrólise (Y) dos triglicerídeos presentes no efluente. Para cada preparação de lipase foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , sendo obtidos distintos comportamentos.

Para a lipase LCR foi verificada uma influência altamente significativa do ajuste do pH do meio reacional no valor ótimo de atuação dessa preparação enzimática (pH=7,0). Com base nesses resultados, um novo planejamento fatorial completo  $2^3$ , foi realizado para avaliar o efeito das variáveis  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  na hidrólise do efluente em meio tamponado com fosfato de sódio (0,1M; pH=7,00). A hidrólise foi maximizada (20,87%) empregando uma concentração de 0,4% m/v de enzima e 3% m/v do agente emulsificante, de acordo com o modelo matemático para a hidrólise dos lipídeos:  $Y = 50,91 + 4,70x_1 - 9,89x_2 + 4,04 x_1x_2$ . O ajuste do pH do efluente pela adição de soluções de NaOH ou NaHCO<sub>3</sub> em substituição a solução tampão e após 12 h de tratamento elevou a porcentagem de hidrólise dos lipídeos para 35%.

Para a lipase LKM foi utilizada a mesma matriz experimental e o ajuste do pH do meio reacional, neste caso, foi efetuado com adição de solução de bicarbonato de sódio. A análise estatística dos resultados revelou que as variáveis  $x_1$  (concentração de enzima) e  $x_4$  (bicarbonato de sódio) foram significativas ao nível de 95% de confiança. Enquanto o efeito da concentração de enzima foi positivo (26,33), a adição de solução de bicarbonato de sódio teve uma influência negativa (-17,77). Os valores preditos pelo modelo  $Y = 38,19 + 13,54 x_1 - 7,38 x_4$  indicam que a porcentagem de hidrólise foi maximizada (Y = 72,08%), no nível alto de concentração de lipase ( $x_1=1$ ) e ausência de bicarbonato de sódio ( $x_4 = -1$ ).

A eficiência do pré-tratamento enzimático nas condições estabelecidas pelos planejamentos foi verificada por meio de testes de biodegradabilidade e revelou uma redução no tempo de digestão anaeróbia da ordem de 33%.

Entre as preparações testadas a LKM ofereceu a melhor relação custo/benefício

para ser utilizada no pré-tratamento de efluentes gerados em indústrias avícolas, pois além de promover uma hidrólise eficiente dos lipídeos presentes no efluente, apresenta um custo estimado em US\$ 275,87/ kg.

Para facilitar a difusão do processo proposto no setor industrial, foi também verificada a possibilidade de utilizar uma preparação de lipase de menor custo, como a lipase pancreatina comercializada pela empresa Nuclear que apresenta um custo quatro vezes menor quando comparada com a LKM, ou seja, US\$ 68,75/ kg. Nos testes efetuados empregando essa preparação de enzima foram obtidos desempenhos similares ou até mesmo superior aos obtidos com a lipase LKM, viabilizando desta forma, em termos técnico e econômico o processo proposto.

Finalmente deve ser destacado que embora o efeito do pré-tratamento enzimático tenha sido avaliado somente em termos de remoção de matéria orgânica e produção de biogás, sabe-se que o mesmo melhora sensivelmente as condições operacionais dos reatores anaeróbios, bem como a qualidade do efluente tratado (menor teor de sólidos em suspensão e menor turbidez). Além disso, a porcentagem de metano no biogás indica que este pode ser aproveitado como insumo energético e que a hidrólise enzimática pode acelerar a formação do biogás, tendo em vista uma maior atividade das bactérias metanogênicas.

## ***ABSTRACT***

Effluents with high fat and protein contents such as those generated at slaughterhouses, dairy and food industries in general, contain high chemical and biological oxygen demand levels. Anaerobic digestion of these effluents is a slow process, and the limiting step is the release of fatty acids by specific microorganisms with lipolytic activity. In addition, fats may solidify at lower temperatures and cause operational damage such as the formation of fat lipids scum layers at the surface of the reactor, sludge bed preferential pathways as well as biomass wash out, leading to loss efficiency and even a reactor collapse. To avoid these problems, different methods are employed to remove the oil and grease, using devices such as grease boxes, oil/water separators and flotation systems. However, dissolved and/ or emulsified oil and grease are not retained in these units and enter into treatment system, bringing about considerable inconvenience. Alternatively, the addition of lipases prior to the anaerobic digestion is considered to be a very promising technique to minimize these problems.

The aim of this work was to turn feasible the application of an enzymatic pre-treatment to degrade fats in poultry's slaughterhouse wastewater. The focus was based on the utilization of lipase preparations commercially available. The experimental work was carried out in three steps.

In the first one, the wastewater was characterized according to standard procedures, and values found for the several analyzed components like saponification index (SI) = 188.60mgKOH/g; fat and oil contents = 48.3g/L and chemical oxygen demand = 3930 mg/L, indicated that the chemical composition of the effluent was in the range of the expected limits.

Next, the wastewater was subjected to enzymatic hydrolysis using different commercial lipase preparations, aiming to select the most suitable enzyme preparation considering both cost and efficiency. In this step, five commercial lipase preparations were evaluated, two from animal sources (porcine pancreas - LPP and LKM) and three from microbial sources (*Candida rugosa* - LCR, *Humicola lanuginosa* - Lipolase and *Mucor miehe* - Lipozyme). As expected, the most efficient performance was found for Lipozyme (Hydrolysis= 20.4%), however due to its high cost, its utilization is restricted for this type of treatment. Lipase preparations from microbial source (*Candida rugosa* - LCR) and porcine pancreas - LKM also showed satisfactory performance, attaining, respectively,

13.2% and 18.8% of hydrolysis, and were, then, selected for further tests.

In the second step, the methodology of experimental design was employed to determine the effect of the following variables: enzyme concentration ( $x_1$ ), emulsification agent concentration ( $x_2$ ), calcium ion concentration ( $x_3$ ) and effluent pH adjustment ( $x_4$ ), considering lipid hydrolysis percentage (Y%) as response variable. For both lipase preparations a fractional factorial experiment design  $2^{4-1}$  was carried out and distinct behaviors obtained.

For *Candida rugosa* lipase, a high significant influence of the effluent pH adjustment to the optimum value for this lipase preparation was verified (pH=7.0). Based on the results obtained, a new full factorial experiment design  $2^3$  was carried out to evaluate the effect of the variables  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  on the hydrolysis using effluent buffered with sodium phosphate solution (0.1M; pH=7.0). According to the mathematical model:  $Y = 50.91 + 4.70 x_1 - 9.89 x_2 + 4.04 x_1 x_2$ , the hydrolysis was maximized (20.87%) at both high levels of enzyme concentration (0.4% w/v) and emulsifier agent (3% w/v). Replacing the pH adjustment with the addition of phosphate buffer by either NaOH or NaHCO<sub>3</sub> solutions increased the hydrolysis percentage to 50% after 12h of treatment.

The same experimental matrix was used for the porcine pancreas lipase (LKM) but this time, sodium bicarbonate solution was used to adjust the effluent pH to the optimum for this lipase preparation (pH=8.0). Statistical analyses of the results showed that variables  $x_1$  (enzyme concentration) and  $x_4$  (sodium bicarbonate) were statistical significant at confidence level of 95%. While the effect of enzyme concentration was positive (26.33), the addition of sodium bicarbonate solution had a negative influence (-17.77). Values predicted by the mathematical model  $Y = 38.19 + 13.54 x_1 - 7.38 x_4$  indicated that the hydrolysis percentage was maximized (Y = 72.08%) at high level of lipase concentration ( $x_1=1$ ) and in the absence of sodium bicarbonate ( $x_4 = -1$ ).

The efficiency of the enzymatic pre-treatment under the conditions previously established for each enzyme preparation (LCR and LKM) was verified by running comparative biodegradability tests (raw and treated effluents) and for the treated effluent the formation of biogas (methane) was found to increase four fold.

Between the tested preparations, LKM showed the best cost/ benefit ratio to be used in the pre-treatment of effluents generated by poultry industries, since it gave an efficient hydrolysis of the lipids besides having an estimated cost of US\$ 275.87/ kg.

To facilitate the diffusion of the proposed process at industrial level, the possibility



of using a cheaper lipase preparation was also verified. In this way, tests were performed using a lipase preparation manufactured by Nuclear company (pancreatic lipase-LNU), which is four times cheaper than LKM (US\$ 68.75/ kg). Hydrolysis and biodegradability tests using such enzyme preparation showed similar or even better performance to that one obtained with the lipase LKM, indicating the feasibility of the developed process at both technical and economical levels.

It is also important to point out that, although the impact of enzymatic pre-treatment has been only evaluated in terms of organic matter removal and biogas production, it is recognized that such kind strategy can also considerably improve the anaerobic reactors operational conditions and effluent quality (lower content of suspended solids and less turbidity). Besides, the enzymatic hydrolysis can increase the biogas formation due to a higher activity of the methanogenic bacteria leading to higher methane level in the biogas, which can be utilized as a source of energy.

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas duas últimas décadas inúmeros melhoramentos no processo anaeróbio de tratamento de efluentes de indústrias alimentícias têm sido realizados, principalmente para tratamento de águas residuárias da produção de açúcar, amido e cerveja (HU *et al.*, 2002). Entretanto, para alguns efluentes contendo elevado teor de óleos e gorduras, como os provenientes de frigoríficos, abatedouros, laticínios, enlatados, entre outros, a operação do reator de digestão anaeróbia (UASB) apresenta diversos problemas operacionais devido à formação de espuma, colmatação de camadas de lipídeos, formação de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, levando à perda da eficiência e até mesmo ao colapso do reator (LEAL, 2000; HU *et al.*, 2002).

Técnicas para melhorar essa eficiência, incluem geralmente a instalação de caixas de gordura ou flutuadores, cujo desempenho está sujeito à falhas constantes associadas à variação temporal da carga de gordura e outros fatores de ordem operacional. Desta forma, os reatores anaeróbios situados à jusante de unidades fabris permanecem suscetíveis à alimentação de efluentes com teores de gordura acima dos recomendáveis, prejudicando o bom funcionamento dos mesmos. No caso específico dos reatores UASB recomenda-se que o teor de gordura no efluente não ultrapasse valores da ordem de 150 mg/L (LEAL, 2000).

Constata-se na área ambiental, um crescente interesse pela utilização de enzimas como coadjuvantes do tratamento de efluentes industriais. A transformação de muitas substâncias poluentes, de difícil degradação, em produtos mais facilmente degradáveis pode ser mediada pela ação de enzimas. A difusão da aplicação de enzimas no setor de tecnologia ambiental encontra como entrave, o custo dos biocatalisadores relativamente elevado. Entretanto, sabe-se que o custo de uma preparação enzimática está diretamente associado ao seu grau de purificação e desse modo, preparados enzimáticos não purificados poderiam contribuir para viabilizar o seu uso em sistemas de tratamento de resíduos.

As lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em acilgliceróis com conseqüente liberação de ácidos graxos e glicerol. Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente os óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura. Esse tipo de

tratamento apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não-geração de subprodutos tóxicos; condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de tecnologias inovativas de tratamento de resíduos industriais ricos em gorduras, vem sendo investigada por vários grupos de pesquisa no Brasil (COPPE/RJ, URI/Erechim-RS e ESC-USP/ São Carlos-SP). No que se refere aos estudos de hidrólise enzimática de rejeitos de indústria de abate de frangos, não foi encontrado nenhum dado específico deste tipo de aplicação na literatura especializada. Entretanto, dados referentes à utilização desse processo para tratamento de efluentes provenientes de frigoríficos de carnes suínas e bovinas revelam a viabilidade desta tecnologia para solucionar problemas de descarte de resíduos similares (MASSE *et al.*, 2001).

Cabe notar, entretanto, que na Universidade Federal de Santa Catarina, pesquisas iniciais nesta área foram conduzidas no âmbito de uma dissertação de mestrado (GROSS, 1996), na qual foi verificado o desempenho da enzima lipase SP 398 (Novozymes) na hidrólise enzimática de gorduras animais (sebo de boi, banha de porco e banha de frango). O estudo desenvolvido por GROSS (1996), visava aplicar, num segundo momento, essa concepção para efetuar pré-tratamento em águas residuárias de indústrias avícolas.

O presente trabalho de doutorado, portanto, dá seqüência às pesquisas iniciadas nessa Universidade, tendo como objetivo principal viabilizar tecnicamente a aplicação de um tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias avícolas. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases comerciais disponíveis no mercado. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas: i) Caracterização do efluente gerado em indústrias avícolas e seleção de preparações comerciais de lipases capazes de reduzir com eficiência a carga lipolítica do efluente; ii) Otimização das condições de hidrólise enzimática dos lipídeos presentes no efluente empregando preparações de lipase selecionadas com relação aos principais parâmetros (teor de gordura, concentração de enzima, concentração de agente de emulsão e pH) visando estabelecer um processo tecnicamente viável e iii) Avaliação do impacto do tratamento enzimático proposto por meio de testes de biodegradabilidade dos efluentes bruto e hidrolisado.

## ***2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

### **2.1. CRISE DA ÁGUA: UMA QUESTÃO ATUAL**

A água doce, indispensável à vida, é um recurso renovável, mas relativamente escasso em algumas regiões da Terra. A maior demanda (decorrente do crescimento acelerado da população humana), o desperdício e o uso inadequado podem esgotar ou degradar esse recurso. Problemas desse tipo já ocorrem em certas áreas ou regiões, e acredita-se que em médio prazo, mantidas as atuais formas de uso da água, poderão abranger todo o planeta, gerando uma crise global da água (BRANDIMARTE, 1999).

NOGUEIRA (1999) ressalta que 97,5% da água, disponível na terra é salgada e está em oceanos e mares, 2,493% é doce, mas se encontra em geleiras ou regiões subterrâneas de difícil acesso e somente 0,007% é doce encontrada em rios, lagos e na atmosfera, de fácil acesso para o consumo humano. Atualmente 29 países não possuem água doce para toda a população. Em 2025, segundo a ONU (Organização das Nações Unidas), serão 48 países e 2050 cerca de 50 países sem água em quantidade suficiente para toda a população (VASCONCELLOS, 2002).

Mesmo nos países que apresentam uma grande disponibilidade hídrica, como é o caso do Brasil, onde, de acordo com os dados apresentados pelo World Resources Institute (1997, 1998), encontram-se aproximadamente 14% de todos os recursos hídricos mundiais, começam a surgir problemas relacionados ao uso indiscriminado dos recursos hídricos. Esse problema é detectado, principalmente, nas grandes regiões urbanas do Brasil, onde há grande demanda no consumo de água devido ao crescimento populacional e, onde os recursos hídricos superficiais apresentam restrições de uso devido à poluição, acarretada, principalmente, pelo lançamento de esgotos domésticos e despejos industriais (MAIA NETO, 1997).

Neste sentido, os mais variados segmentos, tais como, universidades, órgãos de controle ambiental, ONG's e principalmente as indústrias têm dirigido seus esforços para obtenção de um ponto de equilíbrio entre a atividade produtiva e o respeito ao meio ambiente, o que se denomina desenvolvimento sustentável (MACÊDO, 2000). Grande parte das pesquisas é direcionada para o tratamento de efluentes industriais, no sentido de reduzir os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos, considerados como uma "commodity" ou seja, a água é uma mercadoria em função da sua disponibilidade atual.

## 2.2. A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No Brasil, além dos problemas de poluição dos reservatórios naturais e dos processos desordenados de urbanização e industrialização, a degradação da qualidade da água tem como causa o desperdício provocado por escoamento defeituoso nas tubulações e o desperdício doméstico. Falta uma maior eficiência política dos governos que estabeleça ações públicas e privadas para um melhor gerenciamento dos recursos hídricos. Baseado nisso, o Banco Mundial adotou alguns procedimentos em nível global para melhoria do gerenciamento da água, como os citados a seguir (MACEDO, 2000):

- ⇒ Incorporar as questões relacionadas com a política e o gerenciamento dos recursos hídricos nas conversações periódicas que mantém com cada país e na formulação estratégica de ajuda aos países onde as questões relacionadas com a água são significativas;
- ⇒ Apoiar as medidas para o uso mais eficiente da água; dar prioridade à proteção, melhoria e recuperação da qualidade da água e à redução da poluição das águas por meio de políticas "poluidor-pagador" (quem polui paga, na proporção do dano);
- ⇒ Apoiar os esforços governamentais para descentralizar a administração da água e encorajar a participação do setor privado, a participação das corporações públicas financeiramente autônomas e das associações comunitárias no abastecimento de água aos usuários, além de apoiar programas de treinamento para introduzir reformas nos sistemas de gerenciamento de água.

A Política Nacional de Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997, trata, entre outros pontos, da concessão de direitos de uso de recursos hídricos naturais para a realização de atividades econômicas que requeiram grandes volumes de água (MACEDO, 2000).

Uma questão importante também prevista nessa política é a cobrança pelo uso dos corpos d' água para o lançamento de efluentes (despejos líquidos). Para isso, a lei institui a figura do usuário pagador (por exemplo, indústrias e municípios que lancem seus despejos em rios ou lagos). O uso dos corpos d' água seria pago de acordo com o tipo e volume do efluente lançado e, além disso, os responsáveis pelos despejos teriam que obedecer às normas que garantem a preservação dos recursos hídricos nacionais. Tais normas estão associadas à classificação, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente

(CONAMA) em 1986, das águas doces, salobras e salinas do território brasileiro em nove classes, segundo seus usos preponderantes.

A instituição do usuário pagador depende da regulamentação da lei, em especial no que diz respeito ao domínio do curso da água, para evitar divergências entre estados ou entre um estado e o governo federal. Acredita-se que, a partir da entrada em vigor dessa cobrança, as entidades que lançam efluentes em corpos d'água passem a investir mais no tratamento de seus despejos e na reciclagem da água, levando tanto à redução do desperdício quanto à preservação das águas naturais. Essa lei poderá, sem dúvida, desempenhar papel importante no uso mais racional e responsável da água no Brasil (FURTADO, 2002).

A estimativa com a cobrança hídrica é que muitas indústrias acelerem projetos de reuso e reciclo de efluentes e de que as próprias companhias de saneamento e municipalidades deixem de descartar esgoto não tratado nos rios. Isso significa investimentos em equipamentos e sistemas para evitar ou minimizar a taxa incidente sobre a captação e o descarte (FURTADO, 2002).

Mesmo em indústrias onde, nessa primeira fase, a cobrança não deve impactar de forma preocupante suas finanças, os planos de racionalização da água e de reciclo de efluentes fazem parte da agenda. Muitas delas são incentivadas pelas políticas corporativas de suas matrizes estrangeiras ou movidas por aspectos circunstanciais, como a de abastecimento insuficiente ou o propósito de recuperar produtos químicos contidos em seus efluentes.

### **2.3. TRATAMENTO DE EFLUENTES**

O tratamento de efluentes é um compromisso assumido com o meio ambiente e com a vida. A poluição do meio ambiente tornou-se assunto de grande interesse mundial. Não apenas os países desenvolvidos vêm sendo afetados pelos problemas ambientais como também as nações em desenvolvimento começam a sofrer graves impactos da poluição (FREEDMAN, 1995). A proteção do meio ambiente contra os agentes poluidores de origem industrial é um problema complexo para os países em desenvolvimento. Existe um aumento da preocupação e conscientização das empresas em reduzir o impacto ambiental provocado por poluentes específicos gerados em seus processos industriais, devido às normas exigidas pelas instituições de proteção ambiental e órgãos de fiscalização. Algumas saídas para que se torne possível o controle da poluição, são: obtenção de informações

técnicas referentes aos melhores meios de que se dispõe para controlar a poluição; obtenção e emprego de técnicas de combate à poluição ambiental e de pessoal especializado na aplicação das mesmas.

A quantidade e concentração dos despejos de uma determinada indústria variam dentro de amplos limites, dependendo dos processos de fabricação empregados e dos métodos de controle dos despejos. Com isto, a caracterização de efluentes é uma tarefa básica para o equacionamento adequado do problema de tratamento dos mesmos. É a etapa de trabalho que gera informações quanto à composição e vazão da água residual, levando em conta as suas variações ao longo do tempo, em função das atividades responsáveis por sua geração. Com base nessas informações, podem ser adotados métodos físicos, químicos ou biológicos de tratamento de efluentes (GLAZER E NIKAIDO, 1995).

Os métodos físicos abrangem a remoção de sólidos flutuantes de dimensões relativamente grandes, de sólidos em suspensão, areias, óleos e gorduras. Para essa finalidade são utilizadas grades, peneiras simples ou rotativas, caixas de areia ou tanques de remoção de óleos e graxas, decantadores, filtros de areia. As grades destinam-se a reter sólidos grosseiros em suspensão e são utilizados para a proteção de bombas, válvulas e outros equipamentos contra obstrução. Peneiras são dispositivos destinados à retenção de partículas mais finas. As caixas de areia destinam-se à retenção de areia e outros detritos pesados inertes, em suspensão nas águas residuais. São usadas a fim de proteger bombas e tubulações contra abrasão e entupimento. A flotação é empregada no tratamento de alguns despejos industriais como, por exemplo, na recuperação de óleos emulsionados. Os tanques de decantação são empregados na separação dos sólidos sedimentáveis presentes em águas residuárias (VAZOLLER *et al.*, 1989).

Os métodos químicos podem ser utilizados para remover material coloidal, cor e turbidez, odor, ácidos, álcalis, metais pesados e óleos. A neutralização de despejos industriais pode ser necessária, não só para se evitar o lançamento de águas ácidas ou alcalinas no corpo de água receptor, mas também, como medida necessária para proteção.

Os processos biológicos dividem-se em aeróbios e anaeróbios (BRANCO E HESS, 1975).

Nos processos aeróbios a estabilização dos despejos é realizada por microrganismos aeróbios e facultativos; nos processos anaeróbios os microrganismos atuantes são os facultativos e anaeróbios. Os processos aeróbios podem ser: lodos ativados, filtro biológico e lagoa de estabilização aeróbia. Nos processos anaeróbios de tratamento

de despejos, a decomposição da matéria orgânica e/ou inorgânica é conseguida na ausência de oxigênio molecular. Esta degradação refere-se às reações que reduzem as dimensões de partículas, tornando-as solúveis ou, em nível molecular, quebram cadeias ou ligações triplas ou duplas existentes. Os produtos finais do processo são metano e compostos inorgânicos, incluindo o dióxido de carbono, ácido sulfídrico e amônia (MACCARTY, 1982).

Os principais microrganismos empregados no processo anaeróbio, comentados por MALINA (1992), são as bactérias. A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor um determinado substrato é específica, dependendo principalmente das enzimas que possui. As enzimas, responsáveis pelas reações do processo de decomposição, apresentam alto grau de especificidade. A eficiência global de conversão da matéria orgânica em produtos estabilizados depende da eficiência de cada reação e do equilíbrio entre as diversas espécies e entre os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (LEMA *et al.*, 1991).

#### **2.4. BIOTRATAMENTO**

A aplicação de tecnologias biológicas na prevenção, detecção e tratamento dos acidentes e alterações nefastas ao ambiente, têm sido ponto de agenda da OCDE desde 1991, quando o Comitê Científico e de Orientação Tecnológica criou um grupo governamental de técnicos em biotecnologia no campo da qualidade ambiental.

À medida que o tratamento de águas residuárias e de resíduos sólidos se torna uma indústria necessária e mais proeminente, muitas organizações empresariais e públicas, têm se dedicado à investigação e ao desenvolvimento de tecnologias alternativas de tratamento biológico dos mesmos. Das águas residuárias aos resíduos sólidos, há cada vez mais instituições interessadas no tratamento, impulsionando a adoção de tratamentos mais naturais e menos dispendiosos e agressivos ao ecossistema, como o uso de microrganismos e enzimas especializadas (WAKELIN E FORSTER, 1997).

Os sistemas biológicos de tratamento de resíduos devem atender alguns importantes aspectos: (1) - remoção da matéria orgânica, portanto redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) do resíduo a ser tratado; (2) - se possível, degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação (recalcitrantes); (3) - fornecimento de um efluente em condições que não afete o equilíbrio do sistema receptor final (rios, lagos, etc.). A Tabela 2.1 fornece alguns exemplos de águas residuárias potencialmente tratáveis por processos biológicos, bem como os valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio dos



rejeitos. Entre esses, exemplos graves em termos de agressão ambiental, estão na indústria agro-pecuária, nomeadamente nas suinoculturas, aviários, matadouros, vacarias, etc. A produção de resíduos líquidos e sólidos é elevada, além da poluição atmosférica com odores desagradáveis que prejudicam intrinsecamente e extrinsecamente as unidades industriais. Além disso, esses resíduos contêm elevados teores de DBO e DQO (Demanda Química de Oxigênio), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica (LIE E MOLIN, 1991).

**Tabela 2.1.** Valores médios de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) para diferentes tipos de águas residuárias

<b>Águas residuárias</b>	<b>DBO (mg/L)</b>
Esgotos sanitários	200-600
Efluente de enlatados – alimentos	500-2.000
Efluente de cervejarias	500-2.000
Efluente de processamento de óleo comestível	15.000-20.000
Efluente de destilaria de álcool (vinhaça)	15.000- 20.000
Percolado de aterros sanitários (chorume)	15.000- 20.000
Efluente de laticínios (sem recuperação de soro de queijo)	30.000
Efluente de matadouros (sem recuperação de resíduos)	30.000

Fonte: GLAZER E NIKAIDO (1995).

A Tabela 2.2 mostra que existem vários sistemas biológicos a serem adotados com a finalidade de estabilização da matéria poluente. O sucesso da aplicação de um deles está relacionado com o conhecimento prévio do efluente a ser tratado, e da eficiente operação dos reatores na manutenção da atividade microbiana e das reações de mineralização desejadas.

Os sistemas biológicos de tratamento desenvolvidos são operados, portanto, sob condições aeróbias ou anaeróbias, dependendo da natureza dos resíduos orgânicos a serem degradados, da dimensão dos reatores, além de outros requerimentos específicos. Além disso, nos processos biológicos que ocorrem dentro dos sistemas é possível observar mais de um metabolismo microbiano ativo, como pode ser observado nos Lodos Ativados, pela existência da respiração aeróbia e nitrificação por diferentes espécies bacterianas (MALINA, 1992).

Em geral, os diferentes tipos de microrganismos nos processos biológicos de tratamento atuam conjuntamente, formando uma verdadeira cadeia com interações

nutricionais facultativas e obrigatórias. Os microrganismos podem ser empregados em células livres, floculados, agregados ou formando biofilmes em materiais utilizados para enchimento de certos tipos de reatores, como por exemplo, os filtros biológicos aeróbios e anaeróbios (GRIFFITHS, 1992).

**Tabela 2.2.** *Sistemas biológicos e funções específicas*

<b>Sistemas biológicos</b>	<b>Funções</b>
Lagoas de estabilização	Fornecimento natural de oxigênio pelo desenvolvimento de algas em lagoas construídas para a degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes, e conversão a dióxido de carbono e água.
Lodos ativados, filtros biológicos, lagoas aeradas e valas de oxidação.	Degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes por meio do metabolismo aeróbio, facilitado pela disponibilidade artificial de oxigênio em reatores ou lagoas e conversão a dióxido de carbono e água.
Sistemas de nitrificação	Conversão de compostos orgânicos nitrogenados e amônia a nitratos.
Sistemas de desnitrificação	Conversão de nitratos a nitrogênio gasoso.
Sistema alternado anóxico e aeróbio para remoção de nutrientes	Remoção de nutrientes, particularmente de fosfatos.
Biodigestão anaeróbia	Degradação microbiana de compostos orgânicos a ácidos orgânicos, álcoois, hidrogênio, dióxido de carbono e metano.

Fonte: COOKSON JR. (1995)

Os microrganismos e as enzimas existem na natureza, nas águas residuais, nos resíduos sólidos, logo nos Sistemas de Tratamento de Águas Residuárias, mas normalmente, ou são em número muito reduzido ou estão ausentes determinadas estirpes para que consigam efetivamente transformar efluentes muito carregados de complexos resíduos orgânicos e químicos, num produto final aceitável pela legislação ambiental para diferentes setores como a indústria, a agro-pecuária, os municípios, entre outros.

Para minimizar a deficiência de microrganismos no efluente vem sendo utilizado a bioaugmentação que é definida como a suplementação de microrganismos externos de ocorrência natural, tais como bolores, leveduras, bactérias e enzimas isoladas na ETE (Estação de Tratamento de Efluentes) na unidade de tratamento biológico que permitirá adequar um efluente às exigências legais para seu lançamento em um recurso hídrico ou

até mesmo permitir o reuso do efluente tratado (ROSA, 1995). A baixa concentração de microrganismos (baixa atividade microbiana) ocasiona a exalação de odores desagradáveis, provenientes da digestão anaeróbia incompleta, elevada presença de sólidos não degradados e a formação de depósitos de gorduras nas ETE's.

## **2.5. USO DE ENZIMAS NO MEIO AMBIENTE**

A utilização de biocatalisadores no controle ambiental é uma área recente e importante da tecnologia enzimática e vem despertando grande interesse em muitos grupos de pesquisa, em função das diversas constatações apresentadas, entre as quais podem ser citadas (KARAM E NICELL, 1997):

- ⇒ A introdução no ambiente de poluentes orgânicos xenobióticos e recalcitrantes tem aumentado, o que diminui as possibilidades de se realizar um tratamento convencional biológico ou químico eficiente;
- ⇒ Há um crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos no tratamento;
- ⇒ Avanços recentes na biotecnologia permitiram a produção de algumas enzimas, técnica e economicamente viáveis devido ao desenvolvimento dos procedimentos de isolamento e de purificação de enzimas microbianas.

As enzimas, conhecidas industrialmente como biocatalisadores, são proteínas e estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Além disto, as enzimas participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples (AITKEN, 1993).

Em contraste com os catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque quantidades mínimas de produtos secundários são produzidas, o que representa benefícios econômicos e ambientais com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos e com redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais.

Entre várias possibilidades, os biocatalisadores podem ser usados no tratamento de efluentes gerados nas indústrias petrolífera, têxtil, papel, derivados de celulose e alimentícias em geral (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3.** Aplicações potenciais de enzimas em biotecnologia ambiental

<b>Enzima e fonte</b>	<b>Resíduos ou poluentes</b>
Celulase <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	Polpa de suco de beterraba Celulignina pré-tratada termoquimicamente
Cianadase ( <i>Alcaligenes xylooxidans</i> ) Cianídeo hidratase ( <i>Fusarium lateritium</i> )	Cianídeo
Lacase <i>Trametes versicolor</i>  <i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhizoctonia praticola</i>	Bromofenóis, clorofenóis, clorometilfenóis, fenóis, naftol, planta de branqueamento e resíduos da indústria de algodão. Clorofenóis e metilfenóis Bromofenóis, clorofenóis e metilfenóis
Nitrila hidratase ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	Acilonitrila
Peroxidasas Cloroperoxidase ( <i>Caldaromyces fumago</i> ) Hemoglobina ( <i>bovina</i> ) Peroxidase de rabanete  Lactoperoxidase Lignina peroxidase ( <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ) Manganês peroxidase	Aminas aromáticas, fenóis. Aminas aromáticas Efluente da indústria de algodão, efluente de cacau.  Tintas, fenóis. Efluente de planta de branqueamento
Polifenol oxidase ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Efluente da indústria de algodão

Fonte: AITKEN, 1993.

A indústria do petróleo é responsável pela geração de grandes quantidades de borras oleosas, as quais representa um considerável dano ambiental. Essas borras consistem de um sistema multifásico contendo óleo, água e sólidos em suspensão, sendo, portanto, de difícil degradação microbiana. A presença de hidrocarbonetos poliaromáticos aumenta a recalcitrância deste resíduo. Existem vários tipos de tratamentos, tais como, incineração, aterro, biotratamento, entre outros, mas em alguns casos, os microrganismos não são capazes de suportar a toxicidade presente no resíduo, sendo necessário um processo alternativo. Assim, a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode ser

realizada pelo uso de enzimas oxidativas, como as peroxidases e desidrogenases (BON E PEREIRA, 1999).

Na indústria de corantes sintéticos e herbicidas ocorre disseminação de hidrocarbonetos aromáticos, compostos fenólicos, corantes sintéticos e pesticidas, no meio ambiente provocando danos diretos à saúde humana devido à contaminação da água, do solo e indiretamente pela alteração dos ecossistemas (BON E PEREIRA, 1999).

Na indústria de papel e derivados de celulose, vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de viabilizar a utilização de microrganismos e enzimas ligninolíticas (xilanases, lignina-peroxidases e lacases) no tratamento de efluentes gerados na etapa de branqueamento, reduzindo consideravelmente o teor de compostos organoclorados das águas residuárias (D'ANNIBALE *et al.*, 1999). Similarmente, diversas propostas para tratamento de efluentes gerados na indústria têxtil empregando as enzimas lacases e catalases estão em fase avançada de estudos (COSTA, 2002).

Outro exemplo potencial é o uso da enzima tirosinase no tratamento de efluente fenólico como os obtidos em diversas atividades industriais: mineração de carvão, refino de petróleo, curtimento e acabamento de couro, entre outras (BEVILAQUA *et al.*, 2000).

Finalmente ressalta-se o emprego crescente da enzima lipase na prevenção ou limpeza de filmes gordurosos, na biodegradação de plásticos (JAEGER *et al.*, 1994) e pré-tratamento de efluentes contendo compostos gordurosos (CAMAROTA *et al.*, 2001; JAEGER E REETZ, 1998).

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante por sermos responsáveis pela preservação dos nossos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constitui em ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade brasileira no cenário mundial (BON E PEREIRA, 1999).

## **2.6. INDÚSTRIA DE PRODUTOS AVÍCOLAS**

### **2.6.1. Importância Econômica do Setor**

O Brasil é o segundo maior produtor de frangos de corte do mundo ocidental. Além disso, o mercado de aves está em ascensão devido às exportações e ao grande aumento no consumo interno. A produção de aves no Brasil em 2002 foi de 7,2 milhões de toneladas;

números 9% maiores que os de 2001. As exportações ficaram na marca de 1,4 milhão de toneladas. O mercado interno deve consumir as 5,8 milhões de toneladas restantes (ICEPA, 2002).

A prova de que o mercado de aves está em expansão no Brasil é a possibilidade de, pela primeira vez, a produção ficar acima de carne bovina. Em análise recente (2002), o ICEPA, Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, destaca a inovação tecnológica, o perfil gerencial da cadeia produtiva, a qualidade do produto, a forte inserção no mercado internacional e, principalmente, os preços mais competitivos de frango no varejo como os principais fatores para esta mudança. O aumento do consumo de carne de frango é uma tendência mundial.

A cadeia de produção de aves movimentava anualmente cerca de R\$ 2,0 bilhões na economia estadual (Santa Catarina), empregando diretamente em torno de 32 mil e indiretamente mais de 35 mil pessoas (BARROS *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da indústria avícola reflete-se também pelo surgimento de mega-companhias, nacionais ou internacionais, as quais controlam a criação e o processamento de vários milhões de aves, quer seja diretamente como também por meio de seus parceiros. Por suas peculiaridades regionais, é comum constatar a existência de variados graus de especialização, intensificação e tecnologia ainda hoje convivendo, nem sempre harmonicamente, dentro do universo da avicultura (BARROS *et al.*, 2000).

O fato de movimentar a transformação de animais vivos em alimentos em uma escala gigantesca, o processamento de aves e seus subprodutos resultantes geram grandes quantidades de dejetos líquidos, semi-sólidos e sólidos altamente poluentes, os quais devem ser adequadamente separados e tratados antes de serem despejados no meio-ambiente. A quantidade de subprodutos gerados no processamento tem aumentado, devido às exigências dos consumidores por partes de frango, ao invés das carcaças inteiras. Sangue, penas, intestinos, cabeças, pés, pescoços, peles, gordura abdominal e coluna vertebral, entre outros, representam 50 a 60% do peso vivo dos frangos, sendo que alguns destes são destinados para produzir matéria-prima para a produção de alimento para animais de estimação, sendo, no entanto, a maioria processada para ser reciclada como farinhas para rações para animais de interesse econômico. O reaproveitamento destes subprodutos é de extrema importância, contribuindo na redução do volume de dejetos e propiciando a produção de materiais que possam ser usados na alimentação de animais ou na fertilização do solo (NUNES, 1998).

O controle da poluição ambiental gerada pelas plantas de processamento avícola depende grandemente dos níveis estabelecidos como aceitáveis pelas legislações dos diferentes países. Nos países mais desenvolvidos, especialmente nos grandes aglomerados urbanos, os padrões determinados podem ser bastante rígidos, com penalizações severas e crescentes sendo aplicadas em casos de descumprimento das exigências legais. Normalmente, estes parâmetros de controle são baseados naqueles recomendados para o tratamento de dejetos de origem humana, respeitadas as peculiaridades de cada tipo de material. Há inclusive a expectativa por parte de alguns autores de que o tratamento biológico da água utilizada no processamento venha a tornar-se o processo mais importante dentro da industrialização do produto avícola (NUNES, 1998).

### **2.6.2. Qualidade da Água e sua utilização no Processamento Avícola**

Diversas etapas do processo de abate e industrialização realizados nas plantas de processamento requerem o uso de água, especialmente durante a escalda, o depenamento, a evisceração, a lavagem e o resfriamento das carcaças. A legislação internacional, por sua vez, exige o uso exclusivo de água potável nas indústrias de alimentos. No entanto, em que pese a realização de controles de qualidade nas plantas de tratamento, as águas liberadas pelos abatedouros podem representar um risco em potencial, inclusive pela possibilidade da presença de bactérias lesionadas pelo processo, mas ainda assim viáveis e capazes de causar danos à saúde. Da mesma forma, o fenômeno da aderência de bactérias às superfícies (canos, torneiras, entre outros) causa a formação de um biofilme, a partir do qual estas mesmas bactérias são regularmente liberadas na água que por ali passa, conseqüentemente contaminando carcaças e outros produtos. Infelizmente, não são conhecidos todos os fatores envolvidos no processo de limpeza das carcaças de aves (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Fatores como força necessária para o desprendimento dos microrganismos da superfície das carcaças, a temperatura e volume de água ideal, bem como configuração dos equipamentos, são de vital importância, não sendo possível reduzir a questão em simplesmente avaliar a quantidade de água utilizada no processo, na crença de que quanto mais água, melhor será o processo. A análise microbiológica desta água utilizada no processamento deve constituir-se em um importante elemento para o controle da qualidade microbiológica dos produtos finais produzidos no local (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

### **2.6.3. O Processamento como Fonte de Poluição da Água**

Os subprodutos da produção e do processamento animal podem conter materiais sob a forma de carboidratos, gorduras e proteínas. Quando este tipo de material ingressa em um curso d'água, microrganismos presentes multiplicam-se rapidamente e, durante este processo, utiliza oxigênio dissolvido nesta água, o que pode ter como consequência à morte de peixes, além de outros efeitos indesejáveis. A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é uma grandeza relacionada ao poder poluente potencial dos diferentes materiais eliminados. A título de ilustração, a excreta animal comumente possui uma DBO de 20.000 mg/L, em comparação com 350 mg/L para esgoto não-tratado e 5 mg/L para uma água de rio limpa (RIBEIRO, 1995).

Os tipos de dejetos e subprodutos produzidos nos diferentes estágios do processamento são mostrados na Tabela 2.4, e incluem a manutenção das aves nos caminhões para que descansem até que chegue seu momento de seguir para o abate, quando então ocorre a recepção dos animais na plataforma. A quantidade de dejetos e volume de água gerados nestes momentos dependerá da defecação e perda de penas que estes animais produzirem no local. A lavagem destas áreas, além das caixas de transporte e dos próprios caminhões, demanda normalmente uma grande quantidade de água, a qual contribuirá com o volume total de efluentes a serem tratados na planta. Somente para a limpeza das caixas de transporte dos frangos em um abatedouro de tamanho médio, há um dispêndio estimado de 12,7 m<sup>3</sup> de água por dia, com uma concentração de 900 mg/L de DBO (RIBEIRO, 1995).

Em seguida, ocorre o sacrifício e o sangramento dos animais, operação que envolve a separação do sangue, pelo seu alto valor como subproduto. Seu volume é estimado em 6-8% do peso dos animais, sendo o sangue considerado como tendo o mais alto nível de DBO dentre todos os tipos de dejetos avícolas, com um valor maior que 90000 mg/L. Por força de ser o sangue um elemento altamente poluente, sua adequada remoção diminuirá grandemente o total de dejetos produzidos pela planta, sem, no entanto, ser possível evitar alguma perda de sangue nos processos posteriores, além de haver a necessidade de lavagem dos locais e equipamentos periodicamente. Um bom procedimento de recuperação do sangue na planta pode representar até 40% a menos de carga poluente nos efluentes (RIBEIRO, 1995).



**Tabela 2.4.** *Tipos de dejetos e subprodutos produzidos nas diferentes etapas do processamento avícola.*

<b>Etapa do processamento</b>	<b>Tipo de dejetos ou subproduto</b>
Recepção	Fezes, penas, água de limpeza
Sacrifício	Sangue, água de limpeza
Escalda/ Depenamento	Penas, sangue/gordura, água de limpeza
Evisceração	Vísceras, sangue, gordura, pequenos pedaços de carne, água de limpeza
Resfriamento	Sangue, gordura, pequenos pedaços de carne, água
Classificação e empacotamento	Água de limpeza
Limpeza da planta	Água de limpeza

Na escalda e no depenamento, há a necessidade de renovação em torno de 5-8 L de água por ave, enquanto seu conteúdo poluente varia em torno de 1000-1500 mg/L DBO, dependendo da qualidade dos processos anteriores. As penas, que representam 3-5% do peso vivo dos frangos, são retiradas e lavadas pela água até os coletores, nos quais chegam com quase 80% de água no seu conteúdo, com uma DBO estimada entre 1000 e 1800 mg/L (RIBEIRO, 1995).

Posteriormente, há a evisceração e a lavagem das carcaças, etapas nas quais o coração, moela e fígado são retirados e levados por corrente de água até depósitos, para serem posteriormente separados e processados. Paralelamente, os intestinos também sofrem semelhante processo de separação, tendo outra destinação. Evidentemente, a possibilidade sempre presente de rompimento de intestinos durante o processo pode representar um significativo aumento na quantidade de microrganismos liberados nos efluentes da planta. A evisceração é responsável por cerca de 1/3 de toda a carga poluente liberada, já que mesmo após a filtragem a água poderá conter pequenos pedaços de tecido, gordura, areia e resíduos de sangue. Isto equivaleria a uma DBO de 1700 a 2600 mg/L para os efluentes gerados pelo processamento das vísceras. Estima-se a necessidade de pelo menos 2L de água por ave, neste processo (RIBEIRO, 1995).

Finalmente, há o resfriamento, o qual servirá para retardar o crescimento bacteriano no produto, tanto aquele responsável pela diminuição do tempo de prateleira do produto

quanto àquele referente a microrganismos patogênicos como a *Salmonella sp.* A legislação da União Européia exige a utilização de uma quantidade de até 6L de água por ave nesta etapa do processamento. Durante esta etapa, a qual pode facilitar a contaminação cruzada entre as carcaças, quantidades de matéria orgânica, gordura e pequenos pedaços de pele continuam a ser lavados e misturados à água dos resfriadores (chillers), o que pode representar até 8% da DBO total do abate, com valores que vão desde cerca de 1000 mg/L no pré-resfriador a 750 mg/L no resfriador.

O processamento posterior dos produtos, com cozimento e preparação de alimentos prontos para comer e com maior valor agregado, significam uma maior demanda por água, tanto para sua preparação como para a limpeza dos utensílios e do equipamento, processos que geram consideráveis quantidades de pedaços de carne e gordura bastante pequenos, comprometendo ainda mais a carga dos efluentes a serem tratados (NUNES, 1998).

A limpeza da planta propriamente dita é também de enorme importância, podendo haver grande variação devido a peculiaridades de cada abatedouro. Deve-se destacar a importância da utilização de detergentes e produtos de limpeza que sejam biodegradáveis e que não interfiram com o tratamento dos efluentes. Os hipocloritos e alguns derivados da amônia quaternária reagem com a matéria orgânica, formando substâncias inativas. Estima-se que a água utilizada para a lavagem das instalações represente uma DBO de cerca de 2500 mg/L. A quantidade total de água utilizada no processamento industrial de frangos de corte permite um elevado grau de variação entre as estimativas, em grande parte pela não especificação da extensão da reciclagem desta mesma água dentro da planta (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Entretanto, é possível estabelecer valores que vão desde 10 até 55L de água por ave. No Brasil, segundo NASCIMENTO *et al.*, 2000, os abatedouros de aves utilizam, em média, cerca de 15L de água por ave processada, sendo este valor quase a metade da quantidade média utilizada, por exemplo, nos EUA (26 L/ave).

Em uma planta que abata cerca de 10.000 aves por dia, no Brasil, isto ainda assim representaria a necessidade de um suprimento diário de 40.000 m<sup>3</sup> de água potável. A legislação brasileira (Regulamento Técnico de Inspeção da Carne de Aves, do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAA, 1997) prevê o uso de 30 L/ave, permitindo, no entanto, o uso de volumes inferiores, desde que aprovados pelo DIPOA.

#### **2.6.4. Tratamento da Água utilizada no Abatedouro**

Os métodos para tratamento da água utilizada no abate e também o projeto dos equipamentos destinados ao uso industrial têm tido uma evolução muito rápida, sendo que muitos deles já estão em uso em plantas avícolas. O tratamento poderá ser bastante simples ou complexo, dependendo da consciência ambiental da empresa e também especialmente da legislação existente. Problemas adicionais podem ser os períodos de pico de produção e a diferença na composição da água produzida durante a produção e durante os períodos de limpeza da planta. Por outro lado, a possibilidade de uso adequado dos subprodutos (penas, sangue e vísceras) para alimentação animal por parte da indústria pode tornar-se difícil no futuro, já que a opinião pública nos países industrializados está se voltando contra o uso destes subprodutos para este fim, mesmo após o tratamento por calor, até agora o principal método utilizado para a reciclagem destes materiais. Esta prática diminuiu consideravelmente a quantidade de dejetos que seriam misturados aos efluentes, sendo hoje um dos principais fatores que contribuem para manter limpo o meio-ambiente. Basta lembrar que somente nos EUA, a indústria recicla aproximadamente 20 milhões de toneladas de subprodutos do abate e processamento de animais (bovinos, suínos e aves) (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Uma estimativa do destino dos subprodutos do processamento avícola na Holanda é mostrada na Tabela 2.5. Frequentemente, o problema se coloca em termos de administrar a necessidade de cumprir a lei e de evitar, por seu descumprimento, um possível fechamento da planta, a partir de ações cada vez mais comuns por parte das comunidades locais, mas não descuidando da preservação da competitividade econômica da empresa, sem a qual a mesma se vê limitada na sua capacidade de buscar ativamente soluções tecnológicas para o problema, além de restringir seus mercados (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Quanto ao tratamento da água utilizada na planta, este tem o objetivo de possibilitar a introdução dos efluentes tratados no ambiente, sem levar à poluição do mesmo, sendo este processo realizado a um custo que seja compatível e não inviabilize a operação lucrativa da planta de processamento. Os efluentes deverão ser, normalmente, peneirados para remoção de pedaços de carne, penas e vísceras que foram lavados no processo. Posteriormente, usam-se retentores de gordura em tanques, onde a mesma sobe para a superfície e é então removida e reprocessada (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

**Tabela 2.5.** Estimativa do destino proporcional dos subprodutos do processamento avícola na Holanda.

Subproduto	Consumo humano (%)	Alimentos para animais (%)	Desossa (%)	Transformação em farinhas (%)
Sangue	0	0	0	100
Penas	0	0	0	100
Cabeças	0	60	0	40
Pés	0	60	0	40
Intestinos	0	40	0	60
Moelas	30	50	0	20
Fígados	80	20	0	0
Corações	40	40	0	20
Pescoços	20	0	80	0
Pele	80	0	0	20
Gordura animal	60	0	0	40
Coluna vertebral	30	0	70	0
Todos os subprodutos	28	20	14	38

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2000.

Finalmente, lagoas ou tanques de sedimentação auxiliam na remoção de sólidos, os quais ficam no fundo e devem ser removidos periodicamente. Uma filtração final para retirar partículas finas em suspensão e um tratamento químico e/ou biológico posterior visam reduzir a quantidade de elementos indesejáveis, como os nitratos, e também reduzir os níveis de DBO da água e a presença de microrganismos para dentro de limites aceitáveis para a descarga no sistema de tratamento público, ou mesmo para possibilitar o reaproveitamento da água pela própria planta. Estes tratamentos incluem a aeração para ativar as bactérias, na qual agitação mecânica dos efluentes tem lugar em grandes reservatórios, ou por filtração, onde as bactérias também agem sobre os dejetos. Possíveis tratamentos químicos incluem a adição de cal, formalina, persulfato de amônia ou ácido fórmico, entre outros. Ao final, uma cloração desta água pode ser realizada para eliminar os microrganismos patogênicos como coliformes fecais e as espécies *Salmonelas* sp (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

### 2.6.5 Tratamento de Águas Residuárias

Conforme descrito anteriormente, o processo de abate e industrialização de frangos gera subprodutos que podem se constituir em potenciais poluentes ambientais, se mal destinados ou processados incorretamente. Do processo de abate de 10.000 frangos/dia

resultam cerca de 40.000m<sup>3</sup> de água com restos alimentares, conteúdo intestinal acidentalmente exposto, sangue, gordura, vísceras não comestíveis, penas, carcaças e partes de carcaças descartadas na inspeção sanitária, bactérias, além de inúmeros outros possíveis contaminantes (FERNANDES, 2000).

Esses resíduos líquidos são ricos, especialmente em proteínas e lipídeos (AMANTE *et al.*, 1999), os quais são os principais responsáveis pelas alterações dos parâmetros de controle ambientais como pH, sólidos totais, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), entre outros.

A Tabela 2.6 apresenta a composição típica do efluente proveniente do processo industrial de escaldagem e depenagem, da lavagem do frango, das vísceras, dos equipamentos, dos pisos e outros.

**Tabela 2.6.** Características físico-químicas do efluente da Macedo Koerich S/A

	Análises				Limite máximo permitido
	ELG 1	ELG 2	ELG 3	SLG3	
pH	6,66	6,51	7,16	7,03	Entre 6 e 9
DBO (mg/L)	1206	301,8	150,9	261,3	No máximo 60 mg/L
DQO (mg/L)	2232	1071	464,3	428,5	No máximo 72 mg/L
Óleos e graxas (mg/L)	163	17,4	ND	ND	Óleos minerais até 20 mg/L Óleos vegetais e gorduras animais até 30 mg/L
Surfactantes (mg/L)	ND	0,8	1,1	ND	2,0 mg/L
Nitrogênio total (mg/L)	174,8	139,8	47,3	137,6	10,0 mg/L
Fósforo total (mg/L)	0,31	0,28	0,29	0,16	1,0 mg/L

Observações: Os limites máximos permitidos são segundo Legislação Ambiental Básica do Estado de Santa Catarina de maio de 1995,

Lei N° 5.795, Decreto N° 14.250, que dispõe de padrões de emissão de efluentes líquidos no Art. 19°.

ND: não detectado.

ELG (1, 2, 3): Estação de Lagoa de Tratamento – SLG: Lagoa de estabilização anaeróbia.

Dados fornecidos pela Indústria Macedo Koerich, 2001.

O elevado teor de lipídeos (gordura) presente nesses efluentes, além de representar uma perda industrial importante, interfere negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes. Quando biológicos, dificultam a sedimentação do lodo e demandam maior tempo de retenção e aeração e quando físico-químicos, demanda maior quantidade de

produtos floculantes com significativo aumento na geração do lodo (LIE E MOLIN, 1991). Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga orgânica de efluentes são de extremo interesse para a indústria. A aplicação de um pré-tratamento visando a hidrólise dos sólidos solúveis, especialmente gorduras, pode melhorar a digestão aeróbia de efluentes gerados em indústrias de processamento de aves e animais.

SAYED *et al.* (1988 a, b) investigaram o efeito de concentrações elevadas de sólidos no tratamento anaeróbio de efluentes da indústria pecuária. Os resultados obtidos mostraram que o fator que controla esse processo é a liquefação dos colóides adsorvidos na bactéria e o curso da hidrólise de sólidos solúveis no leito de biomassa. Além disso, os autores concluíram que os lipídeos representam uma fração limitante no tratamento dos sólidos solúveis.

RAJAN *et al.* (1989) efetuaram um pré-tratamento em um resíduo do lodo ativado (RLA) contendo 1% de sólidos insolúveis com  $10 \pm 40$  meq NaOH/L. A razão de solúveis para DQO total aumentou para  $13 \pm 4,2\%$ . O pré-tratamento desse mesmo efluente com 20 meq NaOH/L por 24h aumentou significativamente o teor de sólidos voláteis durante a digestão anaeróbia e permitiu a redução no tempo de residência de 20 para 7,5 dias (RAY *et al.*, 1990). Resultados similares foram descritos por KNEZEVIC *et al.* (1995), LIN *et al.* (1997).

KARLSSON (1990) testou vários agentes químicos (NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> e HCl) na hidrólise de efluentes de matadouros. As condições experimentais e procedimentos não foram especificados, sendo avaliada apenas a eficiência dos tratamentos pelo decréscimo nas frações de carboidratos, proteína e lipídeos na fase do lodo. O pré-tratamento com soda decresceu o teor de carboidrato na fase do lodo em 26%. Os pré-tratamentos com ácido clorídrico e soda reduziram a concentração de proteínas em 40% e 73%, respectivamente. Para lipídeos, os pré-tratamentos ácido e alcalino reduziram em 28% o teor de gordura na fase lodo. Este experimento também revelou que a porção lipídeo do efluente é a fração orgânica mais difícil de hidrolisar usando agentes químicos na etapa de pré-tratamento.

Portanto, existe a necessidade de pesquisa nos tratamentos de hidrólise de efluentes contendo elevados teores de gorduras, como aqueles encontrados nas indústrias de alimentos, para promover a redução do tamanho de partículas e solubilização dos sólidos.

O processo alternativo de redução da carga de matéria orgânica e aceleração da biodegradação de óleos de gorduras em compostos mais simples consiste em utilizar lipases para promover a reação de hidrólise por via seqüencial dos grupos acila no

glicerídeo (HARALDSSON, 1991). A aplicação desta técnica permite a redução do tempo de residência hidráulico e conseqüentemente do volume do reator, pois acelera a velocidade de hidrólise de gorduras, além de evitar problema de colmatação e entupimento do leito de lodo em reatores anaeróbios do tipo de fluxo ascendente.

## **2.7. LIPASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE LIPÍDEOS**

A aplicação de lipases na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral, pode ser considerada como uma tecnologia altamente promissora no contexto atual, devido à maior exigência legal que instituiu a cobrança da taxa de água. Portanto, a gestão financeira das empresas deverá interpretar as novas tecnologias para tratamento e reuso de efluentes como componente do custo final da produção e nunca posteriormente como encargo suplementar, ou seja, o tratamento enzimático tende a se tornar parte integrante do processo produtivo (LEAL *et al.*, 2002).

Exemplos de tratamentos de efluentes ricos em gorduras provenientes de indústrias diversas são listados na Tabela 2.7, empregando lipases isoladas ou complexo enzimático constituído por lipases e outras hidrolases (amilases e proteases).

DHARMSTHITI E KUHASUNTISUK (1998) estudaram a aplicação da lipase no tratamento de efluentes obtidos em restaurantes. A lipase foi produzida pelo cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de uma amostra desse mesmo efluente em meio sintético à base de 1% p/v de glicose como fonte de carbono. A enzima foi adicionada, no efluente contendo 98 mg lipídeos/ L, e incubada em agitador com agitação numa temperatura de 37°C. O teor de lipídeos foi reduzido em 70% nas primeiras 24h, não sendo detectados lipídeos após 48h. Num experimento conduzido sob as mesmas condições, mas sem adição da enzima (controle), apenas 4% de redução do teor de lipídeos foi observado após 48 horas.

Um pré-tratamento enzimático de efluente de matadouro foi feito com a enzima lipase de origem animal (lipase pancreática – PL 250) para avaliar a redução da DQO e do tamanho de partículas de gordura (MASSE *et al.*, 2001).

**Tabela 2.7.** Aplicação de lipases no tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos

<b>Efluente</b>	<b>Lipase e fonte</b>	<b>Condições experimentais</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
Restaurante	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Teor de lipídeos de 98mg/L, hidrólise realizada em shaker a 37°C por 48h.	Degradação total de lipídeos (100%) foi alcançada em 48 horas	DHARMSTHITI E KUHASUNTISUK, 1998
Matadouro	Lipase pancreática – PL250	Teor de lipídeos de 2,5 g/L, num tempo de 4h.	Redução do tamanho das partículas de lipídeos.	MASSE <i>et al.</i> , 2001
Extração de óleo de oliva	<i>Penicillium</i> P4	Tempo de incubação 20 dias, a 28°C.	60 % de redução da DQO	ROBLES <i>et al.</i> , 2000
Laticínios	<i>Penicillium restrictum</i>	Teor de lipídeos de 1,3g/L.	Remoção de DQO 4 vezes superior ao controle	LEAL, 2000
Gorduras de origem animal (boi, porco e frango).	Lipase SP 398 (Novo Nordisk)	Processo em regime de batelada, agitação de 200 rpm, temperatura de 40°C, pH 7,2, tempo de 3h.	A hidrólise das gorduras animais atingiu percentuais superiores a 90%, para um tempo de reação compatível com os processos industriais (80 minutos).	GROSS, 1996
Avícolas	Lipase de <i>Candida rugosa</i> e pancreática	Hidrólise de lipídeos, a 40°C, agitação 200 rpm, pH 7,0, 4 h.	O percentual de hidrólise alcançado foi maior que 70%, dependendo da preparação de lipase usada.	PEREIRA <i>et al.</i> , 2002



O tamanho médio das partículas no efluente de matadouro contendo 2,5g/L de gordura foi consistentemente reduzido após o pré-tratamento com PL250 por 4 horas. O diâmetro inicial das partículas da gordura variou de 0,71 com 25 mg/L de PL250, a 0,32 com 250 mg/L de PL 250. Entretanto, não foi observada uma redução significativa da DQO em decorrência do pré-tratamento, o que indicou que a DQO pode não ser um bom indicador da eficiência da hidrólise enzimática. Os autores atribuíram esse fato à adsorção/dessorção da lipase na superfície das partículas de gordura.

Uma linhagem da espécie *Penicillium* P4, isolada do efluente gerado na extração de azeite de oliva, foi usada na biodegradação desse mesmo efluente contendo 114,0 g/L de DQO (ROBLES *et al.*, 2000). Após 20 dias de incubação a 28°C, foi observada uma redução de 61% na DQO inicial do efluente. DE FELICE *et al.*, 1997 descreveram um processo altamente eficiente para a degradação de efluentes provenientes do processamento de azeite de oliva contendo 146,0g/L de DQO e 16g/L de gorduras empregando células de *Yarrowia lipolytica*. Após 24 horas de cultivo, foi verificada uma redução no valor da DQO de 80%, bem como obtido um meio fermentado rico em atividade lipolítica e produzidos 22,5 g/L de biomassa celular (Single Cell Protein).

LEAL (2000) estudou a utilização de hidrolases produzidas pelo fungo *Penicillium restrictum* em efluentes ricos em gorduras provenientes da indústria de produtos lácteos, obtendo um aumento entre 1,3 a 4,2 vezes na remoção de DQO num tratamento anaeróbio de um efluente com 1,3 g/L de gordura.

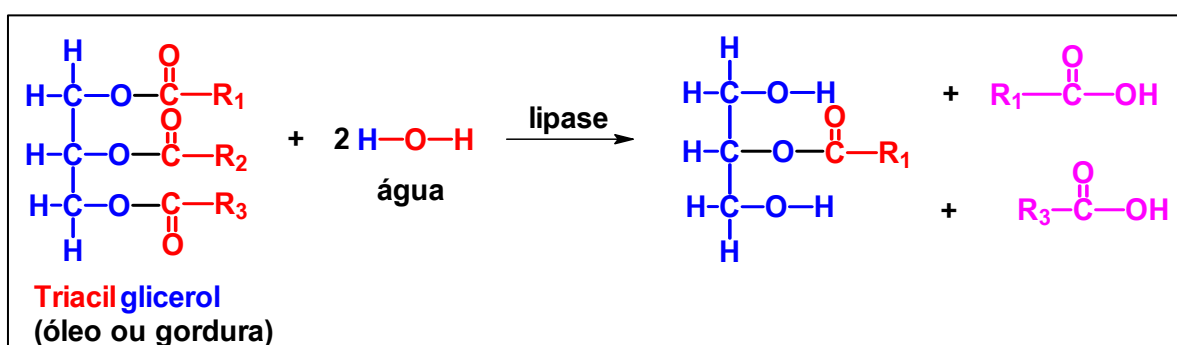
Desta forma, pode-se afirmar que a enzima lipase tem uma grande potencialidade para o tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista a sua capacidade de hidrolisar as gorduras presentes nestes efluentes.

Para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. É necessário conhecer detalhadamente os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes (variações ao longo do dia, semana, etc, os insumos empregados, regime de descarga dos efluentes, procedimento para a limpeza das instalações, frequência e produtos utilizados para esse fim, entre outros), enfim os parâmetros operacionais que influem na qualidade dos efluentes. É necessário também fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise (LEAL, 2000).

## 2.8. LIPASES

### 2.8.1. Características e Propriedades

As lipases (EC 3.1.1.3) catalisam ambas as reações: hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas (Figura 2.1). Essas reações usualmente são processadas com alta regio e/ou enantiosseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalisadores no setor óleoquímico. As razões para o enorme potencial das lipases incluem fatos relacionados com: 1) não requererem a presença de co-fatores e 2) possuem uma larga especificidade pelo substrato (JAEGER E REETZ, 1998).



**Figura 2.1.** A ação catalítica de lipases. Um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) glicerol e ácidos graxos podem reagir para formar o triglicerídeo (JAEGER E REETZ, 1998).

Um grande número de lipases tem sido produzido comercialmente, sendo a maioria de origem de fungos e bactérias. Uma publicação recente sobre a disponibilidade comercial de lipases triacilgliceróis listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (JAEGER E REETZ, 1998); a Tabela 2.8, apresenta as lipases que parecem ser as mais usadas em biotecnologia. Nota-se que existe uma confusão considerável sobre a origem de algumas lipases em particular, resultando em mudanças nos nomes sistemáticos de cepas fúngicas e bacterianas que produzem estas enzimas: *Candida rugosa* era formalmente denominada de *Candida cylindracea*; *Thermomyces lanuginosus* era denominada de *Humicola lanuginosa*; *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas cepacia* foram renomeadas como *Burkholderia glumae* e *Burkholderia cepacia*, respectivamente. Além disso, a lipase *B. glumae* é idêntica à *Chromobacterium viscosum*. O interesse crescente em lipases pode ser constatado pelo aumento no número de excelentes

monografias e artigos de revisão cobrindo aspectos referentes à biologia molecular, propriedades bioquímicas e em particular, às aplicações biotecnológicas destas enzimas (CASTRO E ANDERSON, 1995; BALCÃO *et al.*, 1996; GANDHI, 1997; YAHYA *et al.*, 1998).

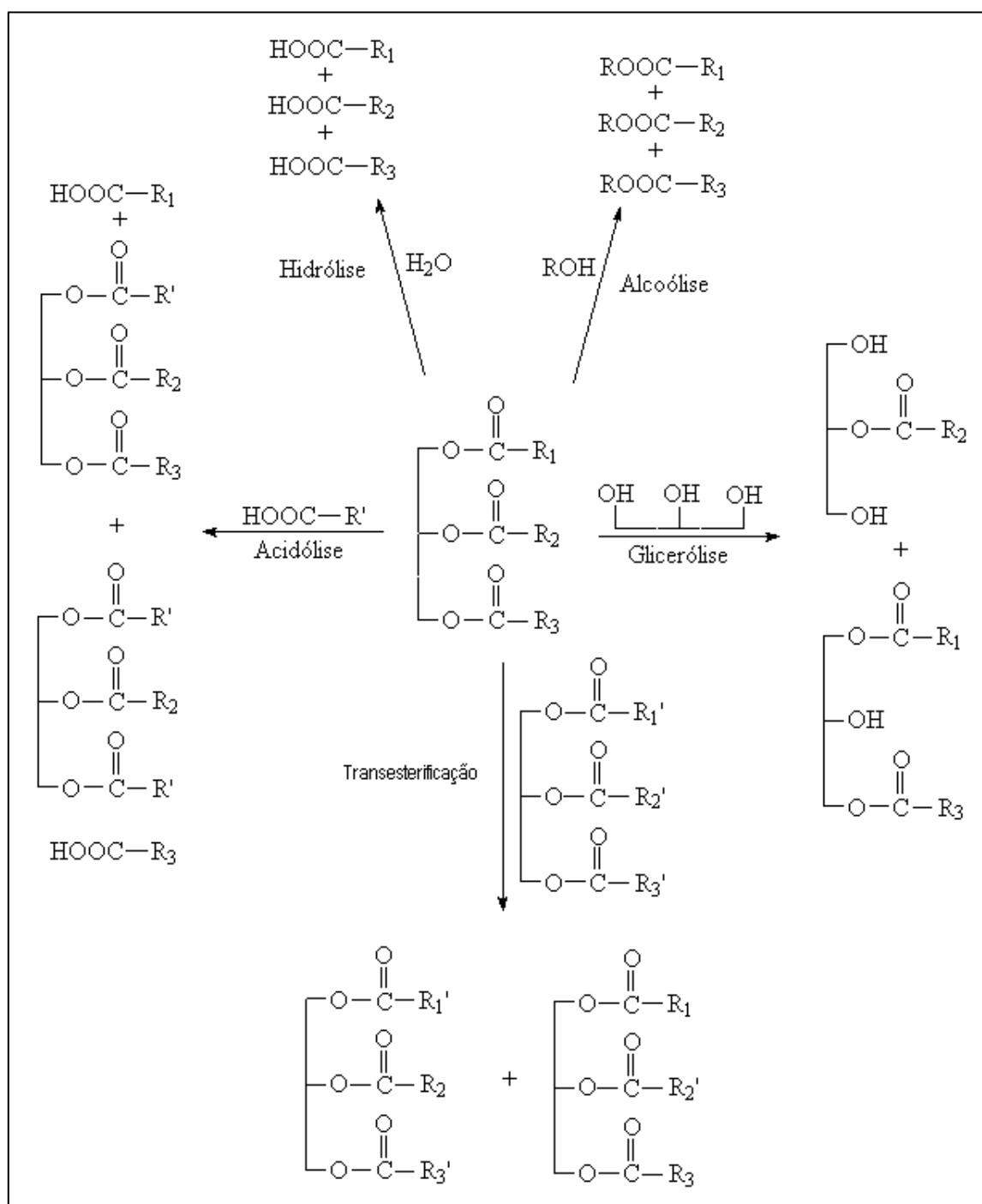
Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular entre 20 a 75 kDa e serem ativas na faixa de pH 4 a 9. São usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente sendo que, a maioria apresenta uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE E HAMMOND, 1985).

**Tabela 2.8.** Exemplos de lipases disponíveis comercialmente

<b>Organismo produtor</b>	<b>Aplicação principal</b>	<b>Firmas que comercializam</b>
<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Biocatalysts, Fluka, Genzyme, Sigma
<i>Candida antarctica A/B</i>		Novozymes, Boehringer Mannheim
<i>Chromobacterium viscosum</i>		Asahi, Biocatalysts
<i>Burkholderia cepacia</i>		Boehringer Mannheim, Fluka, Amano.
<i>Rhizomucor mieihei</i>	Processamento de alimentos	Biocatalysts, Amano, Novozymes.
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase™)	Aditivo para detergentes	Novozymes, Boehringer Mannheim
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas mendocina</i>		Genencor

### 2.8.2. Reações Catalisadas pelas Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. De fato, embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster a partir de álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 2.2, BALCÃO *et al.*, 1996; VULFSON, 1994).



**Figura 2.2.** Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (BALCÃO et al., 1996; VULFSON, 1994).

### 2.8.3. Especificidade e Regiosseletividade

Quatro classes de especificidade podem ser definidas. A primeira refere-se à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoglicerídeos, éster de glicerol, metiléster, entre outros.

A segunda é a regioespecificidade que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula, e classifica as lipases em dois grandes grupos (MACRAE, 1983). Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa do triglicerídeo em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diglicerídeos como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida rugosa*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* pertencem a esse grupo. Entre essas, a lipase de *Candida rugosa* é a priori uma das mais atraentes preparações disponíveis comercialmente para efetuar uma completa hidrólise de triglicerídeos devido sua habilidade para liberar todos os tipos de cadeias do grupo acila, independente de sua posição no triglicerídeo.

Na presença de lipases 1,3 específicas, os triglicerídeos são hidrolisados nas ligações dos C<sub>1</sub> e C<sub>3</sub> do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoglicerídeos e 1,2 ou 2,3 diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil para produzir 1,3 diglicerídeos e 1 ou 3 monoglicerídeos. Pertencem a este grupo as lipases *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar*, entre outras. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triglicerídeos, utilizando lipases regioesletivas, é uma das características mais interessantes da lipase para sua aplicação no setor industrial. Lipases com especificidade 1,3 são particularmente úteis para alcoólise de óleo de fígado de bacalhau (ZUYI E WARD, 1993) e acidólise de óleo de sardinha (ADACHI *et al.*, 1993). A especificidade das lipases pode ser explorada para produzir misturas específicas dos triglicerídeos como, por exemplo, na produção de substitutos da manteiga de cacau a partir de óleos vegetais de menor valor comercial (CHANG *et al.*, 1994).

O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica ao comprimento da cadeia ou a presença da dupla ligação na cadeia do resíduo de ácido graxo (JENSEN *et al.*, 1990). Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum* usada na alcoólise de óleos selecionados para produtos específicos.

Finalmente merece referência a estereoespecificidade, ou seja, a propriedade que algumas lipases possuem em discriminar os enantiomêros de uma mistura racêmica. A

especificidade estrutural ou regioseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. Um exemplo de aplicação é a separação do R-isômero do aspartame de gosto doce enquanto o S-isômero tem gosto amargo. A enantioespecificidade das lipases pode mudar com o substrato (CASTRO E ANDERSON, 1995).

#### **2.8.4. Aplicações Potenciais das Lipases**

A versatilidade das lipases tem sido explorada tanto para substituir processos existentes ou para produzir uma série de produtos originalmente considerados como praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. Esta habilidade catalítica proporciona a estas enzimas uma aplicação de fronteiras. Elas podem ser empregadas tanto em meio aquoso como orgânico na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de gorduras e tratamento de couros, conforme ilustrado na Tabela 2.9.

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta conversão enzimática tem sido usada, por exemplo, na síntese de triglicerídeos de cadeia média, a partir da hidrólise de óleos vegetais. Lipases podem ser também empregadas como biossensores para a detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (PANDEY *et al.*, 1999). Na indústria de couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para a remoção de gordura subcutânea e pelos (PANDEY *et al.*, 1999). Na indústria de polpa e papel, triglicerídeos e ceras contidas na madeira, que dificultam o processo de produção de papel podem ser removidos por meio do emprego de lipases.

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. A indústria de cosméticos e de perfumes pode empregar lipases para a produção de aromas e de surfactantes, ou de emolientes usados em cremes para a pele e cremes bronzeadores (SAXENA *et al.*, 1999). A utilização de lipases em meio orgânico não será abordada nessa revisão. Revisões amplas sobre este específico tema podem ser encontradas nos trabalhos publicados por CASTRO E ANDERSON, 1995; YAHYA *et al.*, 1998; GANDHI, 1997.



**Tabela 2.9. Aplicações potenciais das lipases**

<b>Aplicação</b>	<b>Comentários</b>	<b>Referência</b>
<b>Meio aquoso</b>		
- Hidrólise de triacilgliceróis	Métodos convencionais empregam temperatura e pressão elevadas para obtenção de ácidos graxos como emulsificantes. O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos.	GANDHI, 1997.
- Maturação e fermentação	Responsável pelo aroma distinto de produtos, como por exemplo, os obtidos na hidrólise seletiva de lipídeos do leite durante a manufatura de queijos. Hidrólise enzimática da gordura do leite tem sido também usada na indústria de laticínios para produzir substitutos da manteiga de cacau, aromas de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos.	BALCÃO E MALCATA, 1998.
- Controle enzimático do “pitch”	Problemas com “pitch” são comuns em fábricas de papel. Os motivos são os extrativos que estão presentes na remoção mecânica de celulose assim que ela entra na máquina de papel. Glóbulos de “pitch” tendem a perfurar os equipamentos em diversas partes tais como as caixas de válvulas, filtros e cilindros. As partes perfuradas podem resultar em buracos no papel, que terá então de ser reciclado ou terá uma qualidade inferior. Na pior das hipóteses, o rolo de papel pode se romper causando dispendiosas paradas na produção. Lipase tem demonstrado ser capaz de reduzir significativamente os depósitos de pitch sobre os cilindros e outros equipamentos.	NOVO NORDISK, 1995.
- Curtumes	Couros crus e peles contêm proteínas e gorduras entre as fibras de colágeno. Antes dos couros e peles serem curtidos, estas substâncias devem ser parcialmente ou totalmente removidas. O uso de lipases para dissolver e remover a gordura (desengraxe) está em fase de desenvolvimento como alternativa aos tensoativos solventes. As lipases hidrolisam não apenas a gordura de superfície dos couros crus e peles, mas também a gordura interna da estrutura do couro. O processo baseado em lipases é também muito mais aceitável do ponto de vista ambiental em comparação com os métodos tradicionais.	GANDHI, 1997.
- Tratamento de efluentes	Usada no tratamento de efluentes de indústrias alimentícias. Exemplo típico é o tratamento de efluentes ricos em gorduras provenientes da indústria de sorvete. Lipase tem sido usada juntamente com outras enzimas (coquetel microbiano) designado como Combize-Biocatalyst na Windsor Creameriers, com desempenho bastante satisfatório.	GILBERT <i>et al.</i> , 1993
- Formulação de detergentes	Usada geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulasas) é responsável pela remoção de manchas de gordura tais como batom, frituras, manteiga, azeite, molhos e as difíceis manchas em colarinhos e punhos. Lipolase ( <i>Humicola lanuginosa</i> lipase-Novo Nordisk) é empregada na formulação de um grande número de marcas importantes de detergentes em todo mundo, há mais de dez anos. Uma Lipolase de segunda geração denominada LIPOLASE ULTRA, com melhor desempenho de lavagem foi lançada em 1994.	NOVO NORDISK, 1995.
<b>Meio Orgânico</b>		
- Síntese de ésteres	Usado para produzir ésteres como uma alternativa para síntese química. Além de serem utilizados na produção de essências e fragrâncias, os ésteres também são usados como surfactantes em produtos cosméticos, tais como umectantes e xampus. No caso destes produtos finais, a pureza é de vital importância. A especificidade da reação enzimática da lipase produz ésteres com praticamente nenhum subproduto não desejado.	VULFSON, 1994.
- Modificação da composição triglicéridica de óleos e gorduras	Usado predominantemente para valorizar óleos de baixo custo, pela substituição regioesletiva de resíduos de ácidos graxos em meio aquoso, visando a obtenção de equivalentes de manteiga de cacau. Estudos estão sendo realizados, principalmente, com a fração intermediária do óleo de palma e com gorduras de frutos exóticos da Índia (sal, mahua, Kakum) e do Brasil (piqui, dendê, babaçu).	FACIOLLI E GONÇALVES, 1998
- Especialidades químicas/ separação enantiosseletivas	Explora as propriedades de esteroseletividade de muitas lipases em meio aquoso ou orgânico para obter compostos opticamente puros. Exemplos incluem: antiinflamatórios (Naproxen, Isobufurin), $\beta$ -bloqueadores (propanolol).	JESUS <i>et al.</i> , 1997.



### 2.8.5. Hidrólise de Óleos e Gorduras por Lipases

O procedimento usual de hidrólise é realizado em reatores agitados, contendo gordura na fase líquida e solução aquosa da enzima. A duração global do processo é de aproximadamente 72h, sendo alcançadas taxas de conversão variando entre 90-95% e concentrações finais de glicerol na fase aquosa entre 10-20%. Este grau de hidrólise, só é aceitável para utilização dos ácidos graxos na manufatura de sabões, tendo em vista que, para esse tipo particular de produto, baixos teores de glicerídeos são tolerados (BRADY *et al.*, 1986). A empresa japonesa Miyoshi Oil and Fat Co adota esse processo em escala industrial para produção de sabão, utilizando lipase microbiana de *Candida rugosa*.

Do ponto de vista comercial, a reação de hidrólise de gordura catalisada por lipase, é aparentemente menos econômica que a técnica convencional. Entretanto, considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de alto valor agregado, como por exemplo, ácidos graxos polinsaturados do tipo ômega-3 e ômega-6, a partir da hidrólise de óleos marinhos por lipases não específicas, este tipo de processo pode tornar-se viável economicamente. Os mais importantes ácidos, contidos nos óleos marinhos, são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que apresentam aplicações terapêuticas no tratamento de enfermidades inflamatórias auto-imunes e doenças cardiovasculares, e não podem ser obtidos por métodos convencionais de aquecimento, sem sofrer uma decomposição substancial. Da mesma forma, o ácido  $\gamma$ -linoléico, um importante produto nutricional encontrado em sementes oleaginosas, pode ser obtido pela hidrólise catalisada por lipases sob condições moderadas de temperatura (SYED RAHMATULLAH *et al.*, 1994 a,b).

A hidrólise seletiva da gordura do leite é um outro exemplo de aplicação potencial de lipases. Segundo BALCÃO E MALCATA (1998) o declínio do consumo per capita de gordura de leite em diversos países e a demanda por leite e derivados com menor teor de gordura tem aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o uso desta gordura. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo Cheddar e para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos.

A hidrólise de óleos vegetais tem sido também amplamente investigada. BILYK *et al.* (1991) estudaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais e animais por lipases de

*Candida rugosa*, de *Rhizomucor michei*, e de pâncreas suíno, em sistemas contendo hexano como solvente. O sistema adotado permitiu a recuperação da enzima por filtração e sua reutilização no processo hidrolítico, não sendo verificado perda significativa de atividade nos ciclos consecutivos.

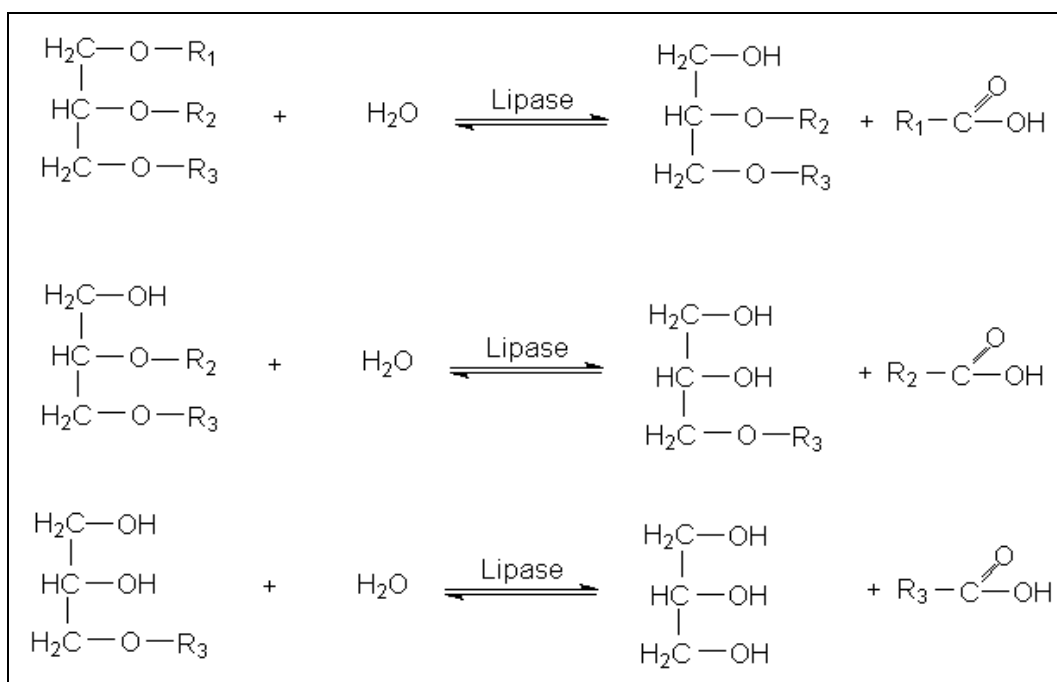
FU *et al.* (1995) estudaram a hidrólise do óleo de oliva, óleo de soja, óleo de palma, óleo de coco e óleos hidrogenados com lipase de *Aspergillus* sp. A lipase tinha alta atividade específica (60000 U/g) e não mostrava especificidade por posição dos ácidos graxos. A lipase provou ser mais efetiva na catálise que a Lipolase de *Aspergillus oryzae*, com ótima atividade a 37°C e pH 6,5 a 7,0. A enzima foi ativada por íons cálcio, mas inativada por solventes orgânicos como o isopropanol e propanona.

GHOSH E BHATTACHARYYA (1995) estudaram a hidrólise enzimática de óleos comerciais de alta acidez como de coco, soja, mostarda, girassol e arroz com a intenção de produzir ácidos graxos. Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez foram hidrolisados por lipase de *Candida rugosa* quase completamente num período máximo de 48h. O óleo de coco (com acidez inicial de 69,2% em ácido láurico) foi hidrolisado numa temperatura de 35°C por 48 h, atingindo acidez final de 80%.

A hidrólise do óleo de soja com diferentes lipases foi estudada por PARK *et al.* (1988) tendo como principal objetivo a comparação das atividades dessas enzimas em sistemas isolados e combinados. Após 10h de reação, foi verificado que os sistemas combinados de lipases microbianas, tais como *Penicillium* sp e *Rhizopus niveous* ou *Penicillium* sp e *Rhizopus delemar* forneceram rendimentos mais elevados (98,0 e 99,5% de hidrólise) que os obtidos em sistemas contendo apenas uma lipase (7,2 e 44,4% de hidrólise).

#### **2.8.6. Fatores que interferem no Processo de Hidrólise**

A hidrólise de ésteres de triglicerídeos ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (HARALDSSON, 1991), conforme mostrado na Figura 2.3. Todas essas reações são reversíveis.



**Figura 2.3.** Reações envolvidas na hidrólise de óleos e gorduras por lipases (HARALDSSON, 1991).

As lipases requerem uma ativação interfacial para sua total atividade catalítica, mecanismo este, originalmente estabelecido por SARDA E DESNUELLE (1958). A interface é considerada como uma superfície imaginária que separa duas fases fisicamente distintas, a qual corresponde em nível molecular a um grupo de duas camadas adjacentes de moléculas ordenadas: uma de natureza mais hidrofóbica e outra mais hidrofílica.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação nas interfaces, incluindo: i) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa (isso é explicado pelo fato de que nos sítios ativos de adsorção na interface, a lipase assume uma nova conformação espacial); ii) uma maior concentração do substrato local; iii) uma orientação mais favorável do substrato; iv) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeos representa uma proteção às ligações éster.

O requerimento de uma interface (independente de sua natureza) é crítico, mesmo em presença de solventes hidrofóbicos existe uma pequena quantidade de água ao redor da estrutura da enzima e essa camada de hidratação no sítio ativo fornece a interface necessária local para a ativação da lipase. É importante ressaltar que, a atividade catalítica das lipases é sensivelmente reduzida na ausência de uma interface, o que é evidenciado

pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas catalisadas.

Portanto, uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo da lipólise é devido ao fato da atividade das lipases depender fortemente de como os substratos lipofílicos são apresentados à enzima, isto é, das propriedades físicas da emulsão que é necessário estabelecer (BROCKMAN, 1984).

Geralmente, a reação de hidrólise de triglicerídeos, é a reação padrão comumente usada na determinação da atividade lipolítica por meio da quantificação dos ácidos graxos livres liberados. Os métodos mais usados para monitorar esta reação são a titulação (PELED E KRENZ, 1981) e a colorimetria com sais de cobre (LOWRY E TINSLEY, 1976). Esta última metodologia pode também ser usada com sistemas micelares, embora uma especial atenção deva ser dada ao efeito do tensoativo (caso do AOT) no estabelecimento das curvas de calibração (ROCHA E GARCIA, 1992).

Quando não é utilizado um agente tensoativo, a determinação da atividade lipolítica é muito demorada. O uso de substratos solúveis em água, tais como o p-nitrofenil palmitato (pNPP), cuja hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente, não é, contudo, o mais adequado para a determinação da verdadeira atividade da lipase, porque eles também são hidrolisados pelas esterases (ERDMANN *et al.*, 1990). Tendo em conta esta limitação, o método mais usado para determinar a atividade das lipases é o que envolve a titulação dos ácidos graxos livres liberados a partir de um triglicerídeo (em geral, a trioleína), produzido numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo.

Desta forma, 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. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas.

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 de óleos e gorduras usando lipases como catalisadores. Alguns aspectos estudados são (BUHLER E WANDREY, 1987):

- ⇒ Relação fase aquosa/ fase oleosa,
- ⇒ Eventual ação inibitória dos produtos formados,
- ⇒ Efeito do íon cálcio nas velocidades de reação,
- ⇒ Influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo,
- ⇒ Efeito da agitação na velocidade de reação.

A concentração inicial de reagentes determina a extensão de uma reação. Com relação à dependência da velocidade de hidrólise na quantidade de água os resultados descritos por ROONEY E WEATHERLEY (2001) indicam que o equilíbrio da conversão de emulsões de óleo: água nas proporções de 3:1 e 8:1 foram 90 e 72%, respectivamente. Portanto, quanto menor a razão óleo: água, maior será a extensão da hidrólise. Uma outra forma de aumentar o grau de hidrólise é a remoção do glicerol formado no processo (ROONEY E WEATHERLEY, 2001).

Com relação à influência dos íons cálcio, nos trabalhos pioneiros, BENZONANA E DESNUELLE (1958), relativos a hidrólise enzimática de óleos, estudaram o efeito de íons sobre a velocidade de reação. Em pesquisas mais recentes (JAEGER *et al.*, 1998) alguns aspectos importantes sobre esse tema foram elucidados, comprovando a importância do papel de íons como o cálcio sobre a atuação no centro catalítico de alguns tipos de lipases (WANG *et al.*, 1988). O íon cálcio pode estimular a catálise hidrolítica por lipases pelos seguintes mecanismos: i) pela ativação da lipase por meio da alteração da conformação da enzima; ii) pelo aumento da adsorção da lipase na interface óleo/ água, iii) pela remoção de ácidos graxos da interface óleo/ água de tal forma que a lipase pode agir em outras moléculas de água. Entretanto, dados descritos na literatura são contraditórios. Enquanto alguns trabalhos descrevem o íon cálcio como agente estimulante outros relatam sua ação inibitória. Essa inconsistência pode resultar das diferentes condições testadas como pH e teor de cálcio, principalmente quando goma arábica é usada como agente tensoativo (cálcio é um possível contaminante de algumas preparações comerciais de goma arábica). Para concentrações de íons cálcio entre 0 e 5mM, o efeito estimulante do íon cálcio foi mais significativo para reações conduzidas em pH 7 quando comparadas com reações realizadas em pH 5 (WANG *et al.*, 1988).

Quanto ao efeito dos emulsificantes nas lipases deve se ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo, como da sua concentração (MOZAFFAR *et al.*, 1994). Entre os tensoativos, a goma arábica e o Triton X-100 são os emulsificantes mais usados nas análises da ação lipolítica sobre triglicerídeos (GRAY *et al.*, 1990; ROCHA, 2000). Os tensoativos iônicos não são convenientes porque podem deslocar o equilíbrio iônico. Entre os tensoativos não iônicos, alguns deles como é o caso do "Tween" e do "Span", também não são adequados à determinação de atividades lipolítica porque, em virtude de possuírem ligações éster nas suas moléculas, podem sofrer ataque por parte da lipase.

Desta forma, as atividades enzimáticas só são comparáveis quando se usa o mesmo tensoativo, na mesma concentração, em todos os ensaios (ROCHA, 2000). O efeito (ativação ou inibição) dos tensoativos sobre a atividade hidrolítica das lipases é particularmente importante na indústria dos detergentes, onde as lipases são usadas para facilitar a remoção de gorduras, principalmente em baixas temperaturas (XIA *et al.*, 1996).

O uso de solventes no meio reacional também tem sido descrito como um fator responsável no aumento das taxas de hidrólise dos triacilgliceróis. MUKATAKA *et al.* (1985) testaram diferentes solventes no processo de hidrólise de óleos em sistema emulsificados, verificando que o isoctano foi o mais adequado.

WANG *et al.* (1988) analisaram a hidrólise do óleo de oliva catalisada pela lipase de *Candida rugosa* em um sistema emulsificado apenas por agitação mecânica, tendo sido verificado taxas de hidrólise similares nos sistemas reacionais na presença e ausência de emulsificante.

O tipo de triglicerídeo também pode interferir na atividade de uma preparação de lipase, de acordo com sua especificidade e definido por JENSEN *et al.*, 1983, como uma diferença comparativa nas taxas de catálises de certas reações. Por exemplo, se um substrato contém três diferentes ácidos graxos A, B e C, eles podem ser hidrolisados em três diferentes taxas. O monitoramento da taxa de desaparecimento de A, B e C, permite determinar a taxa aparente de A, B e C, tendo como vantagem verificar a habilidade da enzima em discriminar entre os diferentes ácidos graxos. Se A é hidrolisado mais rápido do que B, e B é hidrolisado mais rápido do que C, então o produto da reação de hidrólise será uma mistura de fração de ácidos graxos, contendo principalmente A e B, uma quantidade mínima de C e uma fração de glicerídeos enriquecido em C. Um destes ácidos pode ser separado em duas frações com o objetivo de produzir o ácido graxo C, quando este for de interesse.

Na Tabela 2.10 apresenta-se a composição em ácidos graxos de diferentes óleos e gorduras. Observa-se que, a gordura de frango possui uma composição em ácidos graxos similar à encontrada no azeite de oliva, possibilitando a utilização desse material como substrato referencial nas hidrólises de lipídeos presentes no efluente proveniente de indústria avícolas.

**Tabela 2.10.** Composição de ácidos graxos em diferentes óleos e gorduras

Ácido Graxo	Óleo Vegetal						Gordura animal		
	Oliva	Soja	Babaçu	Mamona	Palma	Arroz	Boi	Porco	Frango*
Octanóico	0	0	3,5	0	0	0	0	0	0
Decanóico	0	0	4,5	0	0	0	0	0	0
Láurico	0	0	44,7	0	0,1	0	0	0	0
Mirístico	0	0,1	17,5	0	1,2	0	3,7	3,1	0
Palmítico	<b>16,9</b>	10,5	9,7	1,2	46,8	17,5	25,1	29,1	<b>25,2</b>
Esteárico	<b>2,7</b>	3,2	3,1	1,0	3,8	1,3	22,7	18,9	<b>5,9</b>
Oléico	<b>61,9</b>	22,3	15,2	3,3	37,6	39,9	39,8	44	<b>40,5</b>
Linoléico	<b>14,8</b>	54,5	1,8	3,6	10,0	39,1	2,6	0,3	<b>18,4</b>
Linolênico	0,6	8,3	0	0,2	0	0,3	0	0	0,7
Ricinoleico	0	0	0	89,2	0	0	0	0	0
Dihidroesteárico	0	0	0	1,4	0	0	0	0	0
Eicosenóico	0,4	0,2	0	0,3	0,5	1,8	1,4	0	0,5

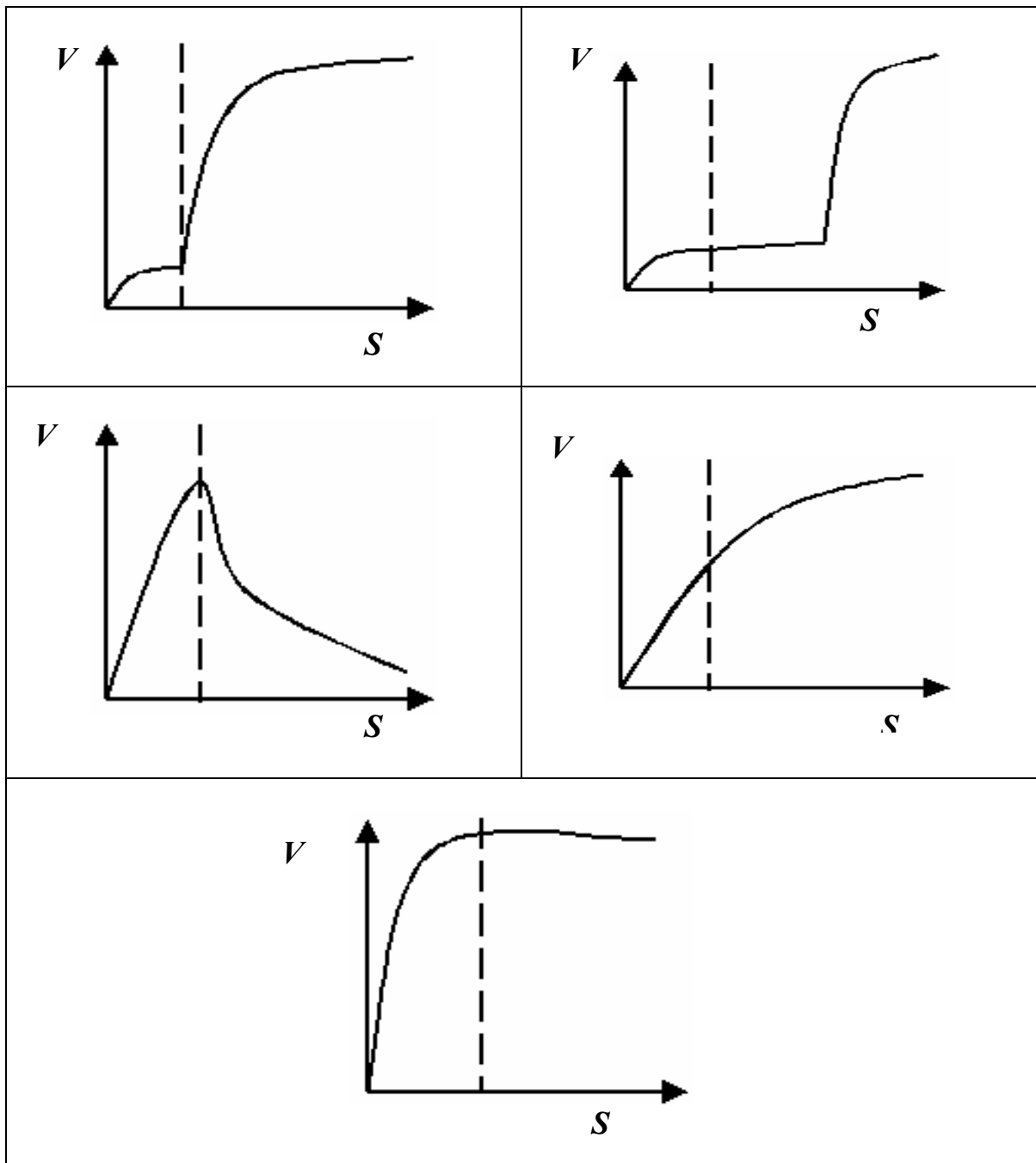
\*Fonte: LEE E FOGLIA, 2000.

### 2.8.7. Cinética Enzimática das Reações Lipolíticas

Em termos cinéticos, SARDA E DESNUELLE (1958) definiram lipases como carboxilesterases que especificamente hidrolisam triacilgliceróis, baseado no fenômeno de “ativação interfacial”. Esta característica não é verificada entre as enzimas classificadas como esterases, que agem somente nas moléculas de ésteres carboxílicos solúveis em água. O fenômeno “ativação interfacial” relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis que formam uma emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são então definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados. Esta característica foi usada por um longo tempo para distinguir as lipases de esterases.

Uma mudança conceitual foi proposta, entretanto, relacionando o significado da “ativação interfacial” com uma mudança conformacional hipotética, que ocorre em função da adsorção interfacial (GAN *et al.*, 2000). Algumas vezes, a ativação interfacial tem sido, erroneamente, relacionada como causa do aumento da atividade catalítica de uma enzima no substrato triacilglicerol na presença de um agente tensoativo.

Os resultados de pesquisas recentes sobre lipases, todavia têm mostrado que é necessário ter prudência na extrapolação de algumas características cinéticas e estruturas observadas para todas as lipases em geral. A atividade catalítica de muitas enzimas lipolíticas medida em ésteres carboxílicos, os quais são parcialmente solúveis em água, apresenta diferentes perfis cinéticos, conforme pode ser observado na Figura 2.4.

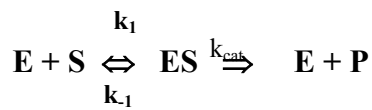


*Figura 2.4. Perfis de curvas cinéticas de lipases (MALCATA, 1995).*



Apesar da descrição teórica desse processo ter sido desenvolvido há mais de quatro décadas (SARDA E DESNUELLE, 1958), este ainda permanece incompleto (GAN *et al.*, 2000). No entanto, vários mecanismos cinéticos de adsorção e catálise da lipase em sistema de emulsão heterogêneo óleo/ água têm sido propostos, relacionando a atividade da lipase tanto em medidas interfaciais qualitativa (área interfacial por unidade de volume) como quantitativa (características físico-químicas da interface).

O modelo cinético mais simples é baseado no clássico mecanismo de Michaelis-Menten aplicado a sistemas emulsificados óleo/água (GAN *et al.*, 2000; MALCATA *et al.*, 1990). As etapas cinéticas podem ser representadas esquematicamente como:



Em que:

E representa a enzima,

S o substrato (triglicerídeo),

ES o complexo enzima glicerídeo,

P os produtos (ácidos graxos e glicerol), e

$k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{cat}$  são as constantes das velocidades de reação.

A velocidade de formação de produto por unidade de volume do fluido reagente  $r_v$  pode ser representada em termos deste mecanismo, como:

$$r_v = \frac{[S]}{K_m + [S]} V_{max}$$

$$k_{cat}[E]_{total} = V_{max}$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

em que:  $V_{max}$  é a taxa observada quando a lipase é saturada com o substrato (mM/g.min) e  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten, definida como indicação da afinidade da enzima pelo substrato (mM).

A atribuição de um valor numérico para  $K_m$  para um substrato emulsificado é sujeito, entretanto, a questionamentos de seu significado físico. Por meio de certos parâmetros físicos da emulsão, tais como o tamanho da gota de emulsão, verifica a forte influência no valor de  $K_m$ . BENZONANA E DESNUELLE (1958) compararam as taxas de lipólise de emulsões mais densas e menos densas e verificaram que as constantes de Michaelis-Menten diferem e não se relacionam com as proporções massa/volume do substrato. No entanto, quando a concentração do substrato foi expressa em área/volume, as curvas de Lineweaver-Burk para as diferentes emulsões do mesmo substrato coincidiram, e um simples valor de  $K_m$  foi obtido independente do grau de dispersão do substrato.

A importância da determinação de um  $K_m$  interfacial tendo como dimensões área/volume ao invés de massa/volume foi, por outro lado, questionada por GAN *et al.* (2000), argumentando que a orientação da molécula éster na interface óleo/água e a especificidade da enzima para o substrato são os fatores principais na determinação da velocidade de hidrólise. Isto torna claro para ambos os argumentos que o valor interfacial de  $K_m$  não tem significado se a interface lipídeo/água comportar-se como uma superfície não específica. Essa situação é muito mais complexa se for considerado que a quantidade de enzima lipolítica absorvida varia com as diferentes interfaces lipídeo/água.

NURRY *et al.* (1987) investigaram a dependência do tempo na tensão interfacial óleo/água durante a hidrólise enzimática utilizando o método gota de óleo e Teflon-Plunger. Pelo significado destas técnicas qualitativas, valiosas informações foram obtidas sobre a influência na densidade do substrato na adsorção da lipase, na catálise e na estereosseletividade.

MUKATAKA *et al.* (1985) propuseram um modelo cinético para reações lipolíticas em um sistema de duas fases considerando os valores da área interfacial e a fração da fase lipídea. WANG *et al.* (1988) estudaram a cinética da hidrólise de óleo pela lipase de *Candida rugosa*, usando uma célula de Lewis que fornece uma área interfacial constante.

Complicações adicionais ocorrem a partir da mudança dinâmica da área interfacial e durante o curso da reação lipolítica, devido, por exemplo, à formação de ácidos graxos. Conseqüentemente, as características físico-químicas do sistema emulsificado variam em função do tempo resultando numa mudança da disponibilidade da interface pela enzima e os novos substratos. Devido a estas complexidades mencionadas, a verdadeira cinética da lipase num sistema bifásico dinâmico ainda não está completamente entendida.

Mesmo com as limitações apontadas e considerando que o meio reacional é

heterogêneo, e que em alguns casos a interface água lipídeo pode impedir que as cinéticas de reações lipolíticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, esse modelo cinético é o mais adotado para descrever tais reações. A metodologia utilizada é baseada na velocidade de reação, expressa em velocidade de formação de ácido graxo por unidade de volume do fluido reagente medida em diferentes razões de óleo/água. A forma de graficar a relação entre a velocidade de reação no início de cada reação e razão molar óleo/água é usando a curva linearizada de Lineaweaver-Burk e os dados são analisados para obter valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ .

Entretanto, um cuidado rigoroso deve ser tomado na aquisição desses dados cinéticos, tendo em vista que a adição de qualquer componente no sistema emulsificado é responsável, por efeitos qualitativos e quantitativos na interface. Por exemplo, alguns ésteres parcialmente solúveis em água, formam algumas vezes adsorção monomolecular em filmes na superfície das bolhas de ar que podem ser formadas pela agitação da mistura reacional. Este fenômeno é responsável pela grande discrepância nas medidas de velocidades iniciais, dependendo do tipo de agitação usada (mecânica ou magnética). Em termos de tensão na superfície, este é um dos parâmetros mais decisivos em trabalhos com enzimas lipolíticas. Isto significa que uma comparação válida só pode ser feita entre dados obtidos sob condições experimentais idênticas e preferencialmente no mesmo laboratório. Para ilustrar esse fato, valores para  $V_{max}$  e  $K_m$  reportados na literatura para lipase de *Candida rugosa* são mostrados na Tabela 2.11.

**Tabela 2.11.** Parâmetros cinéticos da lipase de *Candida rugosa* em diferentes substratos

Substrato	$K_m$	$V_{max}$	Referências
<b>Óleo vegetal</b>			
Azeite de oliva	11,9 mg gordura/mL	24 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995
	0,42 mM	38,5 $\mu$ M/mg.min	PEREIRA <i>et al.</i> , 2001
	41 mM	99,5 $\mu$ mol/mg.h	TANTRAKULSIRI <i>et al.</i> , 1997
Óleo de dendê	8,2 mM	1,3 U/mg.min	KNEZEVICK <i>et al.</i> , 1998
Óleo de girassol	0,00 46 g/L	1,11 g/L.h	GAN <i>et al.</i> , 2000
<b>Gordura animal</b>			
Sebo de boi	6,9 mg gordura/mL	146 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995
Sebo de porco	7,7 mg gordura/mL	174 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995

## **2.9. Tipos de Reatores Anaeróbios para Tratamento de Efluentes**

De acordo com VAZOLLER (1989), a concepção dos reatores anaeróbios avançados iniciou como uma resposta à necessidade de tratamento das águas residuárias com elevada DQO. Na Europa, durante o início dos anos 80, a biodigestão anaeróbia tornou-se então atraente, pois possibilitou o tratamento de diferentes tipos de águas residuárias de origem industrial. Particularmente no Brasil, as pesquisas realizadas com biorreatores como os filtros anaeróbios e o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, permitiram a adoção com sucesso desses sistemas não somente para as águas residuárias de origem industrial, como para os esgotos sanitários.

Diversos digestores de alto desempenho, para tratamento de águas residuárias têm sido propostos. Será feita uma breve discussão sobre os tipos de biodigestores mais utilizados atualmente, sendo apresentado na Figura 2.6, as configurações destes reatores.

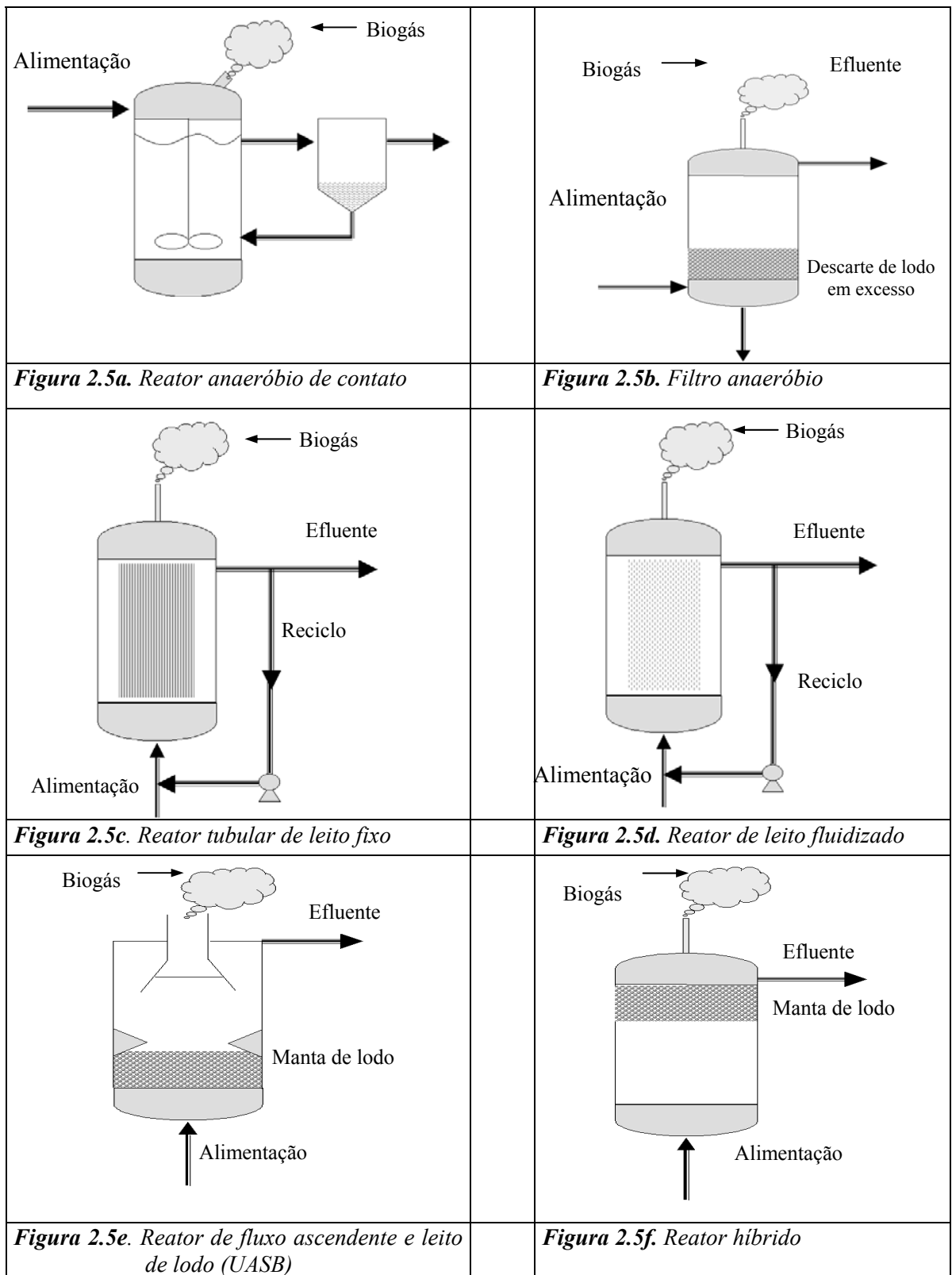
### **2.9.1. Reator Anaeróbio de Contato**

Este tipo de reator é constituído de dois tanques, no qual no primeiro, que requer a agitação por meio externo, ocorre a formação de um lodo floculante e a produção de metano (reator anaeróbio) e no segundo, a separação dos sólidos em suspensão (Figura 2.5a).

No caso de tratamento de esgoto bruto este é misturado com o lodo anaeróbio ativo de retorno no reator de mistura completa. Após a decomposição anaeróbia da matéria orgânica, a mistura é separada no decantador ou flotador, onde ocorre a separação dos sólidos, sendo o efluente, ainda com alta carga poluidora, encaminhado para tratamento posterior (FLORÊNCIO, 1999).

Segundo SOARES (1990), uma das principais desvantagens desse tipo de reator é referente à sedimentabilidade dos sólidos do efluente no decantador secundário, devido às bolhas de gás que ficam aderidas às partículas. Outra desvantagem é quanto à energia necessária para promover a agitação nesses sistemas.

Em relação a outros reatores de alta eficiência, o sistema de contato tem como vantagem, a possibilidade de tratar águas residuárias contendo concentrações relativamente elevadas de sólidos em suspensão (CRAVEIRO, 1994).



**Figura 2.5.** Principais biodigestores (SPEECE, 1996).

### **2.9.2. Filtro Anaeróbio**

Os filtros anaeróbios consistem de tanques preenchidos com materiais inertes (pedra, plástico, entre outros), também denominados leitos, que permanecem estacionários, nos quais os microrganismos crescem tanto nos espaços vazios quanto aderidos ao meio fixo, formando uma película de biofilme na sua superfície e propiciando, desta forma uma alta retenção de biomassa no reator (Figura 2.5b). É desejável que o material inerte tenha uma grande área superficial por unidade de volume, favorecendo uma maior quantidade de biomassa aderida e que resulte, conseqüentemente, numa maior capacidade de tratamento (FLORÊNCIO, 1999). Além disso, o material de enchimento deve ter baixa densidade e custo reduzido (SOARES, 1990).

### **2.9.3. Reator Tubular de Leito Fixo**

Este tipo de reator utiliza como suporte tubos ou placas dispostas de tal modo que se criam canais verticais (CRAVEIRO, 1994). O material pode ser cerâmica, PVC, mantas de poliéster, entre outros. O reator normalmente é de fluxo ascendente e parte do mesmo princípio do filtro anaeróbio, no qual os microrganismos crescem aderidos ao suporte, formando uma película de biofilme na sua superfície (Figura 2.5c).

### **2.9.4. Reator de Leito Fluidizado**

Consiste de um tanque vertical, em geral cilíndrico e de fluxo ascendente, no qual os microrganismos crescem aderidos a um fino material inerte de suporte, com área superficial muito grande, que permanece suspenso no reator. Para promover a expansão do leito pode ser necessária a recirculação do efluente tratado (Figura 2.5d). Dependendo do grau de expansão do leito o reator é denominado de leito expandido ou fluidizado (FLORÊNCIO, 1999). A diferença entre estes sistemas e os filtros anaeróbios é o tipo de material utilizado como suporte dos microrganismos e a aplicação de elevadas taxas de recirculação do efluente tratado para fluidizar o material nele contido. Geralmente, usa-se areia como suporte ou materiais de dimensões semelhantes, que sejam menos densos, para que a energia necessária para fluidificar este material seja minimizada (SOARES, 1990).

Segundo Craveiro (1994), as desvantagens desses reatores são referentes ao custo de energia para promover a fluidificação, a necessidade de grande homogeneidade das dimensões das partículas do leito e a dificuldade de controle da espessura do biofilme.

### **2.9.5. Reator de Fluxo Ascendente e Leito de Lodo (UASB)**

As diversas características favoráveis dos processos anaeróbios, como o baixo custo, simplicidade operacional e baixa produção de sólidos, aliadas às condições ambientais do Brasil, onde há predominância de elevadas temperaturas, tem contribuído para a colocação dos sistemas anaeróbios em posição de destaque. Praticamente todas as análises de alternativas de tratamento incluem esses reatores como uma das principais opções. A aceitação e disseminação da tecnologia anaeróbia para o tratamento de efluentes, notadamente dos reatores do tipo UASB ou de fluxo ascendente e manta de lodo, vem crescendo a cada dia (CHERNICHARO, 1997).

O reator UASB é considerado um dos sistemas de tratamento mais promissores devido à sua baixa exigência de terreno, à sua simples operação e aos baixos custos de construção, operação e manutenção (LEAL, 2000). É um sistema no qual a biomassa tem um crescimento disperso, consistindo de um fluxo ascendente de água residuária por meio de um leito de lodo denso e de elevada atividade microbiana.

O reator UASB consiste, basicamente, em um tanque em cuja parte inferior está localizada a zona de digestão e na parte superior a zona de decantação e separação do gás (SAYED *et al.*, 1988). O efluente a ser tratado é uniformemente distribuído na base do reator e passa por meio da camada de lodo biológico, a qual transforma a matéria orgânica presente no efluente, principalmente em metano e gás carbônico.

Nos reatores de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente, é importante a agregação de bactérias. A formação de agregados pode ser realizada por floculação microbiana e/ou granulação (LIU *et al.*, 2003). A floculação tem sido a mais estudada, porque é o fenômeno mais comum nos reatores biológicos em geral.

### **2.9.6. Reator Híbrido**

Um reator híbrido é qualquer reator resultante da combinação de duas ou mais concepções de reatores, todavia esta designação acabou ficando particularizada para ao tipo de reator que combina UASB e o filtro anaeróbio (Figura 2.5f).

O reator híbrido possui entre 20-30% de seu volume preenchido com materiais estacionários ou em movimento, como espuma de poliuretano, esferas de polímero, anéis plásticos dispostos ao acaso, etc., para reter partículas finas de biomassa eventualmente

dispersas. Assim, o reator híbrido é uma combinação do UASB na parte inferior e filtro anaeróbio na parte superior. Este tipo de reator aplica-se em particular à situação quando a taxa de lodo granulado é baixa e há uma necessidade de acelerar a partida do reator (TUR E HUANG, 1997).

Enquanto o reator UASB depende da disponibilidade (ou cultivo) e manutenção de lodo granulado no reator e permite trabalhar-se com elevadas cargas orgânicas, o filtro anaeróbio opera com cargas menores, tendo como ônus o custo do enchimento, todavia é mais seguro operacionalmente, pois não depende de grânulos e da taxa de sedimentação do lodo. Dessa maneira, esse reator é capaz de acumular na câmara inferior elevadas concentrações de lodo, eventualmente granulado, que permanece no reator pela existência de uma camada de enchimento colocada na parte superior do mesmo. A zona empacotada na parte superior atua como separador gás-sólido-líquido e além de ajudar na retenção do lodo proporciona uma zona de polimento do efluente, aumentando a estabilidade do processo sob condições de operação transiente.

Segundo CRAVEIRO (1994), a concepção do reator híbrido procura combinar as vantagens e minimizar as desvantagens do UASB e FA. Uma desvantagem é referente à localização do enchimento no reator na parte superior resultando na passagem de todo gás através do enchimento e gerando turbulência, conduzindo a uma captura de biomassa menos eficiente.

## **2.10. APLICAÇÃO DO REATOR UASB NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ELEVADOS TEORES DE LIPÍDEOS**

O emprego dos reatores USAB no tratamento de efluentes com elevados teores de gordura, como os provenientes das indústrias alimentícias, é ainda incipiente devido aos problemas operacionais decorrentes da presença de gorduras, apresentando também efeitos inibitórios dos ácidos graxos superiores na ação dos microrganismos anaeróbios (HWU *et al.*, 1997). Para uma operação satisfatória dos reatores UASB, a carga de óleos e graxas deve ser reduzida na indústria por meio de gerenciamento apropriado, de modo que os níveis desses poluentes sejam reduzidos convenientemente para alimentar os sistemas de pré-tratamento, tais como, tanques de separação de gordura ou flotadores. É recomendada a redução da concentração de óleos e graxas para valores inferiores a 150 mg/L, para evitar problemas de colmatação da manta de lodo e inibição da atividade metanogênica, com conseqüente redução da eficiência do reator (SPEECE, 1996; PERLE *et al.*, 1995).



## **2.11. TRATAMENTO DE EFLUENTES POR PROCESSOS ANAERÓBIOS**

### **2.11.1. Digestão anaeróbia**

No processo de conversão da matéria orgânica na ausência de oxigênio, são utilizados aceptores de elétrons inorgânicos como  $\text{NO}_3$  (redução de nitrato),  $\text{SO}_4$  (redução de sulfato), ou  $\text{CH}_4$  (formação de metano). A formação de metano não ocorre em ambientes, nos quais o oxigênio, nitrato ou sulfato encontram-se prontamente disponíveis como aceptores de elétrons. A produção de metano ocorre em diferentes ambientes naturais tais como pântanos, solos, sedimentos de rios, lagos e mares, assim como nos órgãos digestivos de animais ruminantes. Estima-se que a digestão anaeróbia com formação de metano seja responsável pela completa mineralização de 5 a 10% de toda a matéria orgânica disponível na terra. A digestão anaeróbia representa um sistema ecológico delicadamente balanceado, no qual cada microrganismo tem uma função essencial.

As bactérias metanogênicas desempenham duas funções primordiais: produção de gás insolúvel (metano) possibilitando a remoção do carbono orgânico do ambiente anaeróbio, além de utilizarem o hidrogênio, favorecendo o ambiente para que as bactérias acidogênicas fermentem compostos orgânicos com a produção de ácido acético, o qual é convertido em metano.

A digestão anaeróbia de compostos orgânicos é normalmente considerada um processo de dois estágios. No primeiro estágio, um grupo de bactérias facultativas e anaeróbias, denominadas formadoras de ácidos ou fermentativas, converte os orgânicos complexos em outros compostos. Compostos orgânicos complexos como carboidratos, proteínas e lipídeos são hidrolisados, fermentados e biologicamente convertidos em materiais orgânicos mais simples, principalmente ácidos voláteis.

No segundo estágio ocorre a conversão dos ácidos orgânicos, gás carbônico e hidrogênio em produtos finais gasosos, o metano e o gás carbônico. Esta conversão é efetuada por um grupo especial de bactérias, denominadas formadoras de metano, as quais são estritamente anaeróbias. As bactérias metanogênicas dependem do substrato fornecido pelas acidogênicas, configurando, portanto uma interação comensal. Considerando que as bactérias metanogênicas são responsáveis por grande parte da degradação do resíduo, a sua baixa taxa de crescimento e de utilização dos ácidos orgânicos normalmente representa o fator limitante do processo de digestão como um todo.

### 2.11.2. Microbiologia do Processo Anaeróbio

O processo anaeróbio baseia-se na utilização de microrganismos na ausência de oxigênio livre, para a degradação de matéria orgânica. Esta degradação refere-se às reações que reduzem as dimensões de partículas, tornando-as solúveis ou, ao nível molecular, clivam cadeias ou ligações triplas ou duplas existentes. Os produtos finais do processo anaeróbio são metano e compostos inorgânicos, incluindo o dióxido de carbono e amônia (MCCARTY, 1982).

O número de espécies de microrganismos que coexistem em sistemas anaeróbios é bem elevado. SOUBES (1994) cita que, em um biodigestor alimentado com polímeros naturais, mais de 130 espécies microbianas diferentes foram identificadas, entre bactérias e fungos.

A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor um determinado substrato é específica, dependendo principalmente das enzimas que possui. As enzimas, responsáveis pelas reações do processo de decomposição, apresentam alto grau de especificidade (MALINA, 1992).

A eficiência global de conversão da matéria orgânica em produtos estabilizados depende da eficiência de cada reação e do equilíbrio entre as diversas espécies e entre os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (LEMA *et al.*, 1991). A velocidade de cada reação influi na velocidade do processo, e as reações mais lentas, denominadas etapas limitantes, irão determinar a velocidade da reação global (PAVLOSTATHIS E GIRALDO-GOMEZ, 1991).

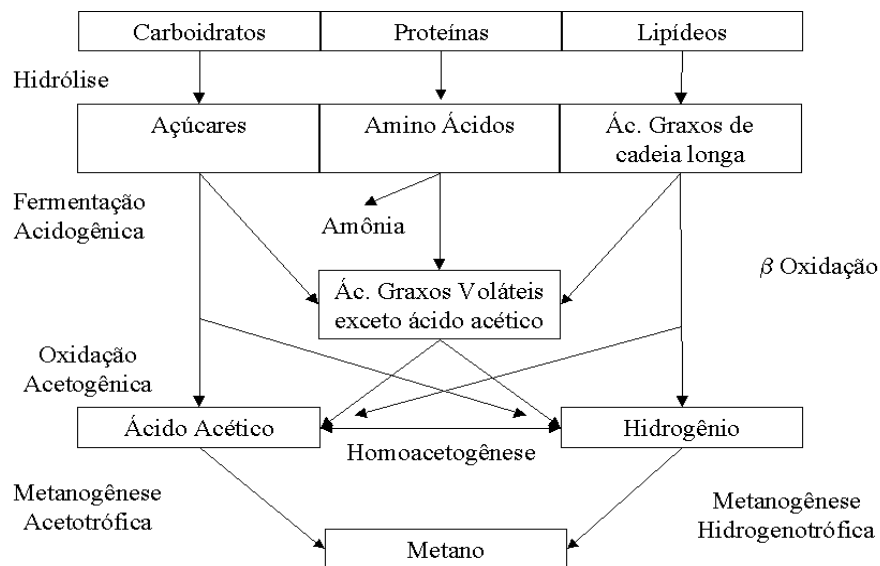
A seqüência de reações do processo anaeróbio sugere sua divisão em etapas que, segundo SOUBES (1994), é conveniente para a sua compreensão, mas a realidade biológica é mais complexa. Entre os microrganismos existem interações tão estreitas que, por exemplo, a atividade dos microrganismos metanogênicos influi decididamente nos produtos de outras etapas, inclusive sobre a hidrólise.

ZEIKUS (1982) e VAZOLLER (1996) citam a digestão anaeróbia ocorrendo a partir de quatro grupos de bactérias:

- a) Grupo I: bactérias hidrolíticas, as quais convertem uma variedade de moléculas orgânicas complexas (polissacarídeos, lipídeos e proteínas) num amplo espectro de produtos finais (ácido acético, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, compostos de um único carbono, ácidos orgânicos maior que ácido acético e compostos neutros maiores que metanol);

- b) Grupo II: bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio. Estes grupos de bactérias podem converter ácidos orgânicos maiores que ácido acético (butirato, propionato, etc) e compostos neutros maiores que o metanol (etanol, propanol, entre outros) a hidrogênio e acetato;
- c) Grupo III: bactérias homoacetogênicas, as quais podem converter um espectro muito amplo de compostos orgânicos de vários ou mesmo de um único carbono a ácido acético;
- d) Grupo IV: bactérias metanogênicas, as quais convertem H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, compostos de um carbono (metano, CO<sub>2</sub>, metilaminas) e acetato em metano.

Segundo CHERNICHARO (1997), os microrganismos responsáveis pelo processo anaeróbio podem ser divididos em três importantes grupos de bactérias, com comportamentos fisiológicos distintos: bactérias fermentativas, bactérias acetogênicas e bactérias metanogênicas. Uma representação esquemática das fases e dos grupos bacterianos envolvidos na digestão anaeróbia é mostrada na Figura 2.7. As vantagens e desvantagens do processo anaeróbio são apresentadas na Tabela 2.12.



**Figura 2.7.** Sequência metabólica e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia (Salminen e Runtala, 2000).

**Tabela 2.12.** *Vantagens e desvantagens dos processos anaeróbios*

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Baixa produção de sólidos, cerca de 5 a 10 vezes inferior à que ocorre nos processos aeróbios.	As bactérias anaeróbias são susceptíveis à inibição por um grande número de compostos
Baixa demanda de área	A partida do processo pode ser lenta na ausência de lodo adaptado
Produção de metano, um gás combustível de elevado teor calorífico.	Alguma forma de pós-tratamento é usualmente necessária
Possibilidade de preservação da biomassa, sem alimentação do reator, por vários meses.	A bioquímica e a microbiologia da digestão anaeróbia são complexas e ainda precisam ser estudadas
Tolerância a elevadas cargas orgânicas	Possibilidade de geração de maus odores, porém controláveis.
Aplicabilidade em pequena e grande escala	Possibilidade de geração de efluente com aspecto desagradável.
Baixo consumo de nutrientes	Remoção de nitrogênio, fósforo e patogênicos insatisfatórios.

Fonte: CHERNICHARO (1997); STARKENBURG (1997).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAIS**

##### **3.1.1. Enzimas**

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de origem animal (pâncreas de porco adquirida da empresa Sigma Co (EUA) e pancreatina gentilmente fornecida pela empresa Kin Master/ RS) e microbiana (*Candida rugosa* - tipo VII, adquirida da empresa Sigma Co, EUA; Lipozyme (*Mucor miehei*) e Lipolase<sup>TM</sup> (*Humicola lanuginosa*) gentilmente doadas pela Novozymes (Paraná). Foi ainda testada a preparação de lipase pancreatina adquirida da empresa Nuclear (São Paulo).

Lipozyme e Lipolase fabricadas pela Novozymes são enzimas microbianas produzidas pelos fungos *Mucor miehei* e *Humicola lanuginosa*, respectivamente (NOVO NORDISK, 1990; NOVOZYMES, 2001). As principais características dessas preparações enzimáticas são apresentadas no Apêndice 8.1.

Amostras comerciais de lipase de *Candida rugosa* (LCR) contêm cerca de 2-11% de proteína e o restante em açúcares e aditivos inertes. A LCR é classificada como regioinespecífica e tem habilidade de liberar todos os tipos de ácidos graxos (tanto de cadeias médias e quanto longas) independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 1997). A técnica de eletroforese em gel mostra uma proteína única com uma massa de 63KDa para LCR fornecida pela Sigma (RKAZLAUKAS E BORNSCHEUER, 1998).

Lipases pancreáticas têm uma massa molecular de aproximadamente 50 KDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais (porco). Por esta razão, são preparações geralmente impuras, contendo diversas outras hidrolases, como esterases, tripsina, proteases, entre outras. A lipase pancreática comercializada pela Sigma (LPP) contém cerca de 8-20% de proteína e de acordo com informações de literatura (RKAZLAUKAS E BORNSCHEUER, 1998) apresenta como proteínas contaminantes  $\alpha$ -quimotripsina, carboxipeptidase B, proteases, fosfolipases e colesterol esterases. Entre as hidrolases contaminantes, apenas a  $\alpha$ -quimotripsina e a colesterol esterase são consideradas como inibidores potenciais da reação de hidrólise de ésteres (FABER, 1997). Portanto, resultados obtidos com a LPP devem ser analisados com cautela. Por outro lado, a lipase pancreática fornecida pela empresa Kin Master (LKM), segundo informações do fabricante é um complexo enzimático contendo carboxihidrolases e proteases como proteínas contaminantes (BOLETIM INFORMATIVO KIN MASTER, 2000).

### **3.1.2. Substrato**

Foram usados como substratos o azeite de oliva (controle) e efluente da indústria frigorífica de abate de frangos (Indústria Macedo Koerich, Florianópolis-SC). O efluente foi coletado em um único ponto antes de ser conduzido à Estação de Tratamento (entrada do flotor), ou seja, proveniente do processo industrial de escaldagem e depenagem, da lavagem do frango, das vísceras, dos equipamentos, dos pisos e outros. O efluente foi guardado em recipientes plásticos de 5L limpos não esterilizados e armazenados em freezer a 0°C, para conservação das suas características.

### **3.1.3. Reagentes**

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona, álcool etílico); sais (cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de sódio, fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio); emulsificante (goma arábica); bases (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio); reagentes específicos (albumina sérica bovina e Coomassie Brilliant Blue G-250, ambos adquiridos da Sigma Co - EUA). Os reagentes utilizados foram de grau analítico, adquiridos da Synth ou Reagen.

## **3.2. EQUIPAMENTOS**

Foram utilizados: para medida de pH – pHmetro modelo TEC2 (Tecnal); para ensaios colorimétricos – Espectrofotômetro modelo B295II (Micronal); as dosagens de atividade enzimática foram efetuadas em banho termostático com agitação, modelo 145 (Marconi); as reações de hidrólise foram realizadas em balões de fundo redondo com agitação magnética.

## **3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **3.3.1. Caracterização do Efluente**

Alíquotas foram separadas e caracterizadas quanto aos parâmetros de interesse para o processo: pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), alcalinidade total, óleos e graxas, segundo normas recomendadas por métodos oficiais (APHA, 1995).

### 3.3.2. Testes de Seleção da Preparação de Lipase

O método consistiu no monitoramento da reação de hidrólise empregando as diversas preparações de lipase, medindo-se a produção de ácidos graxos, em intervalos de tempo definidos. O substrato foi preparado pela adição direta do agente emulsificante (goma arábica) ao efluente (3% m/v). Em balões de fundo redondo de 125mL foram adicionados 50g do efluente e relação fixa das diversas preparações de lipase (atividade da enzima/g de efluente), baseadas nas atividades medidas (3.7.2). Os balões foram incubados por um período máximo de 4h numa temperatura de 40°C, com agitação magnética (200 rpm). Periodicamente foram retiradas amostras de 2mL do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,02 N.

A conversão foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos formados durante a reação de hidrólise dos triglicerídeos presentes no substrato, de acordo com a equação 3.1 (ROONEY *et al.*, 2001).

$$\% \text{Hidrólise} = \frac{(V_a - V_b) * N * 10^{-3} * M}{m * f} * 100 \quad (3.1)$$

em que:  $V_a$  = volume de KOH da amostra (mL);

$V_b$  = volume de KOH do controle (mL);

$N$  = normalidade do KOH;

$M$  = massa molecular média dos ácidos graxos no efluente ( $MM_m = 318,3$ );

$m$  = massa da amostra;

$f$  = fração de óleo usada

### 3.3.3. Planejamento Estatístico

Com base nos resultados obtidos, foi proposto um estudo detalhado do efeito das variáveis principais do processo, tais como: concentração da enzima, concentração do agente emulsificante, concentração de íons cálcio e ajuste do pH do meio reacional. O objetivo deste conjunto de testes foi determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). Um planejamento fatorial fracionário foi utilizado para melhor entendimento da influência individual dessas variáveis e de suas interações na porcentagem de hidrólise enzimática do efluente. Na Tabela 3.1 estão

apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central.

As reações de hidrólise foram realizadas em um balão de 2 bocas de 100mL contendo quantidades apropriadas de gordura, agente emulsificante, CaCl<sub>2</sub> e solução para o ajuste do pH do meio (solução tampão fosfato (0,1M; pH 7,0), bicarbonato de sódio (30 g/L) ou hidróxido de sódio (1M). As misturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm e a temperatura do sistema foi mantida constante em 40°C por aquecimento em banho de silicone. A enzima foi adicionada ao meio e em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para acompanhamento da evolução da reação. Como variável resposta foi considerado o porcentual máximo de hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statgraphics versão 6.0.

**Tabela 3.1.** Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do efluente

Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)
Concentração de lipase [E] (% m/v)	0,1	0,25	0,40
Concentração de agente emulsificante [AE] (%)	0	1,5	3
Concentração de CaCl <sub>2</sub> (M)	0	0,01	0,02
Ajuste do pH	Ausente	-	Presente

### 3.4. HIDRÓLISE DO EFLUENTE

As reações de hidrólise do efluente bruto empregando as preparações de lipase selecionadas nas condições previstas pelos testes estatísticos foram realizadas em reatores de bancada (capacidade de 350mL), visando a obtenção de maiores volumes de hidrolisado enzimático para posterior avaliação do grau de biodegradabilidade do efluente tratado em relação ao efluente bruto. Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras, para acompanhamento da evolução da reação. A temperatura do sistema foi mantida por aquecimento em banho de silicone. Foi determinada a porcentagem de hidrólise (%H), os teores de glicerol e de ácidos graxos livres (mM) e a DQO.



### 3.5. BIODIGESTÃO DO EFLUENTE PRÉ-TRATADO

Com a finalidade de avaliar a eficiência do pré-tratamento enzimático, foi efetuado o ensaio de atividade de biodegradabilidade anaeróbia do efluente bruto e tratado enzimaticamente, adotando a metodologia proposta por SOARES E HIRATA (1997). As concentrações de biomassa e substrato foram de acordo com as recomendadas por MONTEGGIA E BEAL (1994).

Os experimentos foram conduzidos em frascos vedados de vidro tipo soro, com volume útil de 500mL, aos quais foram adicionados o lodo anaeróbio (50mL) e o efluente bruto ou pré-tratado enzimaticamente (250mL). Cada frasco foi conectado por meio de tubo plástico a um frasco Duran (500mL) invertido contendo solução alcalina (5% NaOH) que permitia medir a produção de metano pelo deslocamento do líquido.

O frasco controle foi alimentado com efluente bruto, permitindo desta forma uma comparação da eficiência de remoção nos dois reatores, avaliando-se somente o efeito do pré-tratamento enzimático (hidrólise das gorduras no efluente). Este ensaio foi também realizado para descontar eventuais interferências, pois permite conhecer a contribuição da produção de gás do próprio lodo. Antes do início dos ensaios, foi aplicado nitrogênio durante 15min para garantir condições de anaerobiose.

Os frascos foram colocados imediatamente em um *shaker* numa temperatura de 35° C e agitação ajustada em 150rpm. O metano foi medido por deslocamento de líquido, usando-se NaOH a 5% para remoção do CO<sub>2</sub>, como mostrado na Figura 3.1.



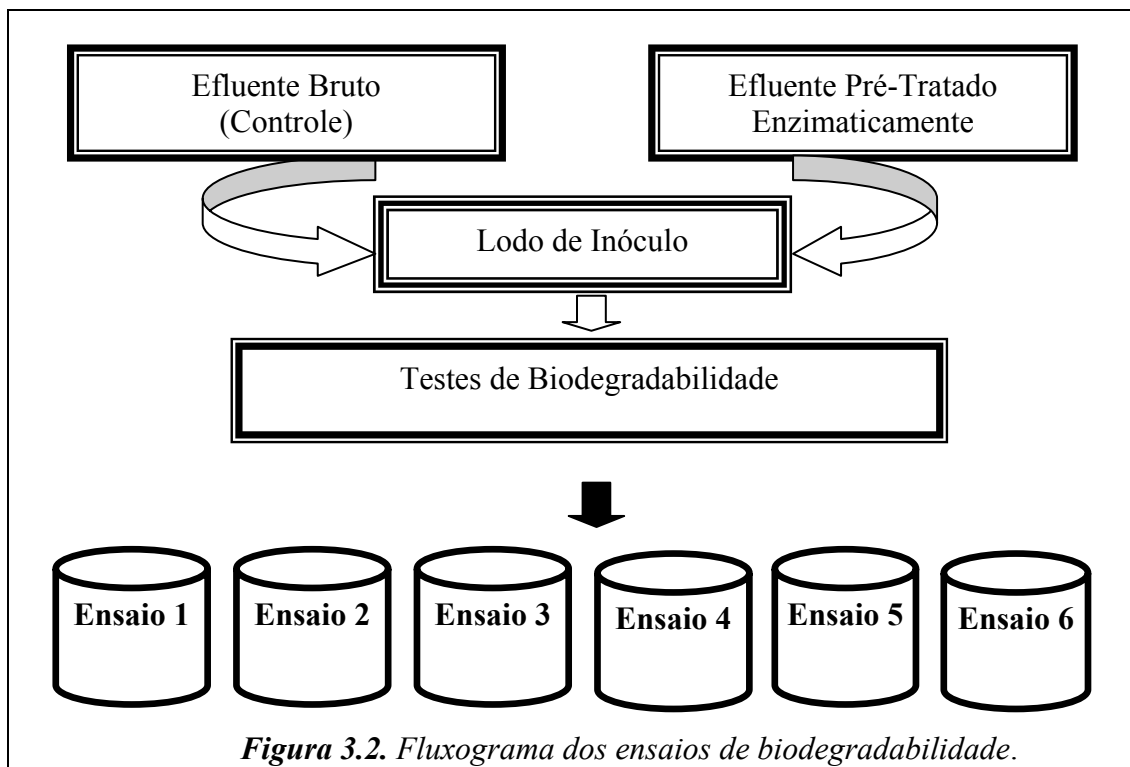
**Figura 3.1.** Montagem experimental utilizada nos testes de biodegradabilidade.

Nos tempos inicial e final de cada ensaio foram quantificados os seguintes parâmetros: demanda química de oxigênio (DQO), pH e o teor de proteína. A comparação do perfil cinético de remoção da matéria orgânica (quantificada como DQO) permitiu avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático ao efluente, comparando com o efluente bruto. A biodegradabilidade é a porcentagem de DQO biodegradada calculada pela reação entre a DQO solúvel final e a DQO solúvel inicial. A DQO biodegradada (DQO-BD) é a diferença entre a DQO solúvel inicial e final.

$$DQO - BD = \left( \frac{C_{DQO.i} - C_{DQO.f}}{C_{DQO.i}} \right) \cdot 100 \quad (3.2)$$

Em que:  $C_{DQO.i}$  = Concentração DQO no início do teste ( $\text{mg.L}^{-1}$ )  
 $C_{DQO.f}$  = Concentração DQO no final do teste ( $\text{mg.L}^{-1}$ )  
DQO - BD = % de DQO biodegradada

Cada bateria de testes possuía 6 frascos em duplicata, e foi estabelecida a partir de combinações de lodo e efluente. O esquema dos ensaios é apresentado na Figura 3.2 e na Tabela 3.2 são listadas as condições utilizadas em cada ensaio.



**Tabela 3.2.** *Ensaio de biodegradabilidade (lodo anaeróbio)*

Ensaio	Condições
1	Efluente bruto (pH 5-6) + lodo
2	Efluente emulsificado com goma arábica + lodo
3	Efluente tratado com LCR (pH= 7,0; com NaOH) + lodo
4	Efluente emulsificado tratado com LCR + lodo
5	Efluente tratado com LKM (pH = 8,0; com NaOH) + lodo
6	Efluente emulsificado tratado com LKM +lodo

LCR = *Candida rugosa*, LKM = *Pancreatina Kin Máster*

### 3.6. ANÁLISES

#### 3.6.1. Determinação da Concentração de Óleos e Graxas

O teor de óleos e graxas no efluente foi determinado por extração em Soxhlet com hexano como solvente segundo procedimento padrão (APHA, 1995). Um determinado volume de amostra (50-300mL) foi acidificado com HCl concentrado (5mL/L) e filtrado em um disco de tecido sobre o qual se colocava um disco de papel de filtro Whatman nº 4 e uma camada de diatomita, obtida pela filtração de uma suspensão aquosa de terra diatomácea a 5% p/v. O papel de filtro e a torta de diatomita contendo as gorduras retidas foram introduzidos em cartucho de extração previamente descontaminado pela extração com hexano por, no mínimo, 2h, e todo o conjunto foi seco em estufa a 105°C, por 30min. Após resfriar, o cartucho era colocado no extrator e iniciava-se a extração com hexano, a uma velocidade de 20 ciclos por minuto durante 4h. Em seguida, o solvente foi evaporado em rotoevaporador e o balão de destilação contendo o resíduo gorduroso foi seco em estufa a 105°C até peso constante e então novamente pesado. A diferença de peso obtida (balão vazio e balão contendo gorduras) foi dividida pelo volume amostrado, obtendo-se a concentração de óleos e graxas presentes na amostra. O teor de óleos e graxas foi calculado pela equação 3.3.

$$\text{Óleos e graxas (mg/mL)} = \frac{(P_2 - P_1)}{V_a} \quad (3.3)$$

em que:  $P_1$  = massa do balão vazio (mg);

$P_2$  = massa do balão e resíduo gorduroso (mg);

$V_a$  = volume da amostra filtrada (mL)

### 3.6.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio do efluente foi medida pelo Método Padrão Colorimétrico de Refluxo Fechado, com  $K_2Cr_2O_7$  em meio ácido, contendo  $Ag_2SO_4$  como catalisador e  $HgSO_4$  para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. As amostras foram diluídas adequadamente, preparadas e digeridas a  $150^\circ C$  por 2h. Resfriavam-se os tubos e a leitura foi feita diretamente em espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi preparada utilizando biftalato de potássio como substância padrão (APHA, 1995).

### 3.6.3. Determinação da Alcalinidade Total

A alcalinidade do efluente foi medida por titulação potenciométrica (pH). Uma amostra de efluente foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min, 10 mL do sobrenadante foram medidos e introduzidos em becker de 400 mL. Adicionavam-se 190 mL de água destilada e, então, sob agitação, os 200 mL foram titulados com  $H_2SO_4$  0,02 N até pH 3,7. Para o branco utilizava-se somente 200mL de água destilada. A alcalinidade total (AT) do efluente foi calculada pela equação 3.4.

$$A.T. (mg CaCO_3/mL) = [(A*100) - (B*5)] * f \quad (3.4)$$

em que: A = volume de  $H_2SO_4$  0,02 N gastos na amostra (mL);

B = volume de  $H_2SO_4$  0,02 N gastos no branco (mL);

f = fator de correção da normalidade do  $H_2SO_4$

### 3.6.4. Determinação do Teor de Ácidos Graxo Livre

A concentração de ácido graxo livre foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol p.a., empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02M.

### 3.6.5. Determinação do Índice de Acidez Total

A acidez foi determinada por via titulométrica, utilizando-se solução de KOH 0,1N, necessários para neutralizar os ácidos livres de uma grama da amostra. O índice de acidez foi calculado pela equação 3.5.

$$IAT = \frac{(V_t - V_b) * N * 56,11}{P} \quad (3.5)$$

em que:  $V_t$  = volume de KOH gastos na amostra (mL);  
 $V_b$  = volume de KOH gastos no branco (mL);  
 $N$  = concentração normal da solução alcoólica de KOH 0,1 N;  
 $P$  = massa do substrato (g);

### 3.6.6. Determinação do Índice de Saponificação

O índice de saponificação foi calculado a partir da composição em ácidos graxos, que corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos resultantes da hidrólise de 1g da amostra, e é inversamente proporcional ao peso molecular dos ácidos graxos dos glicerídeos presentes (MORETTO, 1998), utilizando a equação 3.6.

$$IS = \frac{56000}{MM_{\text{médio}}} + 12,67 \quad (3.6)$$

em que:  $MM_{\text{médio}}$  = massa molar média dos ácidos graxos

### 3.6.7. Determinação da Concentração de Glicerol

A determinação da concentração de glicerol consistiu da reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico, este último foi utilizado como medida do glicerol (COCKS E VAN REDE, 1966). A amostra contendo entre 1 a 2g de massa era previamente diluída em 50mL de água destilada, sendo a mesma acidificada com ácido sulfúrico 0,2N, utilizando bromotimol como indicador. A solução era, então, neutralizada com NaOH 0,05N até coloração azul. Paralelamente, uma solução em branco era preparada contendo 50mL de água destilada, sem a presença de glicerol e o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada deve ser aplicado ao branco. Em seguida, 100mL de solução de periodato de sódio (60g/L) eram adicionados à amostra e ao branco e mantidas no escuro por 30 min. Após este período, 10mL de solução de etileno glicol (1:1) eram adicionados à mistura, a

qual era deixada à temperatura ambiente, no escuro, por mais 20 min. As amostras eram, então, diluídas a 300mL com água destilada e tituladas com solução de NaOH 0,125N, usando pHmetro para determinar o ponto final, pH de 6,5 para o branco e 8,1 para a amostra. A percentagem de glicerol contida na amostra era determinada pela equação 3.7.

$$\text{Glicerol (\% p/p)} = \frac{9,209 * N * (V_1 - V_2)}{MA} \quad (3.7)$$

em que: N = normalidade da solução de NaOH;  
V<sub>1</sub> = volume da solução de NaOH gasto na amostra (mL);  
V<sub>2</sub> = volume da solução de NaOH gasto no branco (mL);  
MA = massa de amostra utilizada (g).

Em alguns experimentos a porcentagem de hidrólise dos triglicerídeos foi baseada na concentração de glicerol, calculada pela razão entre a concentração inicial (C) e a concentração no intervalo de tempo estabelecido (Ct), como descrito na equação 3.8.

$$H(\%) = C/Ct \quad (3.8)$$

### **3.6.8. Amônia**

A determinação de amônia foi realizada segundo o método de Nessler, descrito por VOGEL (1981). Este método consiste da adição do reagente de Nessler na solução problema numa proporção de 1mL do reagente para 50mL de amostra. Após 10min, efetua-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525nm. Com o valor de absorbância, a concentração de amônia foi calculada por meio de uma curva de calibração previamente construída empregando uma solução de cloreto de amônio. Foi utilizado o espectrofotômetro da marca CELM modelo E-225D para a determinação da absorbância das amostras.

### **3.6.9. Fósforo e Fosfato Total**

A determinação do fósforo e do fosfato foi efetuada pelo método de fotocolorimetria no espectrofotômetro da CELM modelo E-225 D, cuja absorbância foi medida em 650nm e 660nm, respectivamente.

### **3.6.10. Composição em Ácidos Graxos**

As análises de composição e quantificação dos ácidos graxos presentes nos efluentes bruto e tratado enzimaticamente foram feitas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando um cromatógrafo da marca SHIMADZU, Modelo CG 17A com detector de ionização de chama, nas seguintes condições de operação:

- Coluna: DB-1 (30m x 0,25mm de diâmetro interno versus 0,25 $\mu$ m de espessura).
- Temperatura do Injetor e Detector: 280°C
- Gás de arraste: nitrogênio com fluxo de 2mL/min

As amostras do efluente bruto e do pré-tratado enzimaticamente foram previamente metiladas utilizando o método descrito por METCALFE *et al.* (1966) e em seguida levadas para o desenvolvimento da análise cromatográfica. A metilação dos ácidos graxos foi realizada pelo Laboratório de Análises – LABCAL, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), localizado no Centro de Ciências Agrárias, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### **3.7. PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS**

As preparações das lipases foram caracterizadas de acordo com metodologia descrita por PEREIRA (1999).

#### **3.7.1. Determinação do Teor de Proteína**

O teor de proteína das amostras de preparações enzimáticas comerciais foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Este método foi o selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos presentes em algumas das amostras de enzimas. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para preparar uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,1 mg/mL, como apresentado no Apêndice 8.2.

### 3.7.2. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia adotada por PEREIRA (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50mL de azeite de oliva e 50mL de goma arábica a 7% (p/v). Em frascos Erlenmeyer de 125mL foram adicionados: 5mL de substrato, 4mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1mL da solução enzimática (5 mg/mL). Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostático com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 3.9 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade, foi realizado um branco utilizando água destilada. As atividades foram expressas em µmoles/mg.min (U).

$$U (\mu\text{moles/ mg. min}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D \times 10^6}{t \times m} \quad (3.9)$$

em que:  $D$  = diluição da amostra;  
 $m$  = massa de enzima (mg);  
 $M$  = concentração da solução de KOH (M);  
 $t$  = tempo de reação (minutos);  
 $V_a$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra;  
 $V_b$  = volume do KOH gasto na titulação do branco

### 3.8. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

As lipases *Candida rugosa* (LCR), pancreática (LPP) e pancreatina (LKM) foram caracterizadas quanto à sua atividade específica em função do pH e da temperatura, bem como à sua estabilidade térmica quando incubada em presença de solução-tampão. Também foram realizados ensaios para verificar a influência da concentração da enzima e de substrato sobre a velocidade de reação.



### **3.8.1. Influência do pH na Atividade da Enzima**

As atividades das lipases foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 5,0 a 9,0 com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada a mesma metodologia descrita no item 3.7.2 variando o pH do tampão fosfato de sódio (0,1M) utilizado na temperatura de 37°C (PEREIRA, 1999).

### **3.8.2. Influência da Temperatura na Atividade da Enzima**

Foi verificada a influência da temperatura na atividade enzimática das lipases empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.7.2, nas temperaturas de 30 a 60°C, no pH ótimo de cada preparação de lipase (PEREIRA, 1999).

### **3.8.3. Estabilidade Térmica**

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi determinado por meio da incubação de diversas amostras das preparações de lipase (1 mL, 5 mg/mL) numa faixa de temperatura de 37-60°C em 2mL de solução tampão fosfato 0,1M durante 120 min. Em intervalos de 60 minutos, as amostras foram retiradas do shaker e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 37°C, pela adição de 5 mL de substrato preparado como descrito na seção 3.7.2. As constantes de desativação ( $k_d$ ,  $h^{-1}$ ), foram calculadas pela equação 3.10.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (3.10)$$

em que:

$A_0$  = atividade enzimática inicial

$A$  = atividade residual após tratamento térmico durante um período de incubação ( $t$ ).

### **3.8.4. Influência da Concentração Inicial de Substrato**

A influência da concentração inicial do substrato na velocidade de reação e a ocorrência de algum tipo de inibição da enzima foram estudadas de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.7.2 e 3.8, utilizando as enzimas LPP, LCR e LKM e variando a porcentagem do azeite de oliva na emulsão óleo: água entre 10% a 70% (v/v). Os ensaios foram conduzidos em pH 7,0 para a LCR, pH 7,5 para a LPP e pH 8,0 para a LKM.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES DE LIPASE

Neste trabalho foram utilizadas 6 diferentes amostras de lipases comerciais fornecidas por quatro produtoras, duas estrangeiras (Novozymes e Sigma) e duas brasileiras (Kin Master e Nuclear). A caracterização das propriedades catalíticas dessas preparações enzimáticas foi uma etapa preliminar necessária tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos diversos fabricantes foram determinados por diferentes metodologias.

Na Tabela 4.1 são apresentadas as atividades lipolíticas dessas preparações empregando o método de hidrólise do azeite de oliva, conforme procedimento descrito na seção 3.7.2. A Tabela 4.1, também inclui os teores de proteína e atividade específica dessas preparações. Nesta seção são ainda apresentados e discutidos os resultados obtidos quanto à influência do pH e temperatura na atividade das lipases de *Candida rugosa* (LCR), pancreática (LPP), pancreatina Kin Master (LKM) e pancreatina Nuclear (LNU) bem como os valores determinados para as constantes de inativação térmica e parâmetros cinéticos.

**Tabela 4.1.** Propriedades catalíticas das preparações de lipase testadas

Lipase	Atividade (U/mg de amostra)	Proteína (mg/g de amostra)	Atividade específica (U/ mg proteína)
Lipozyme (Novozymes)	210	-	-
Lipolase (Novozymes)	3519	29,8	11780
<i>Candida rugosa</i> (Sigma) - LCR	3400	58,9	41500
Pâncreas de porco (Sigma) - LPP	3573	130,8	27400
Pancreatina (Kin Master) - LKM	3357	c	23500
Pancreatina (Nuclear) - LNU	1771	127,3	13900

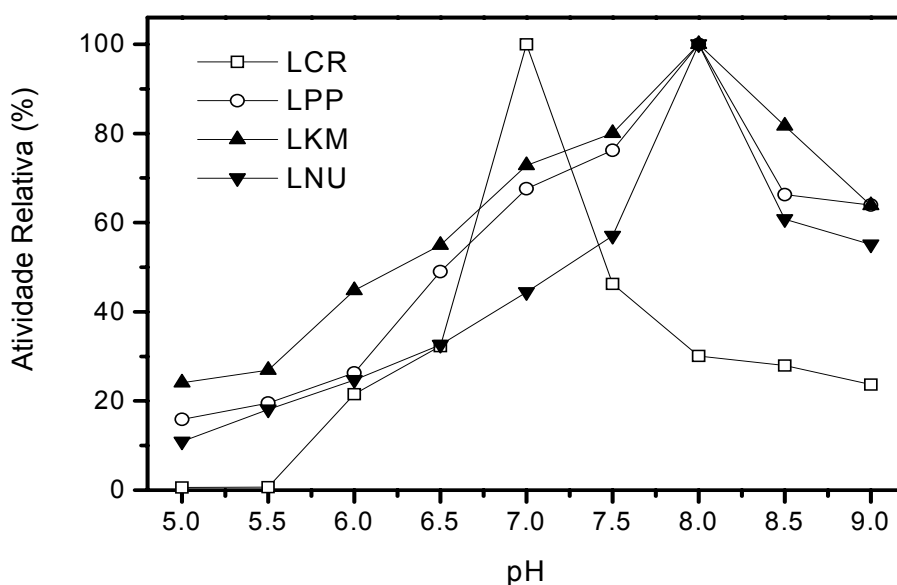
#### 4.1.1. Influência do pH na Atividade das Lipases

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH característico em que sua atividade é máxima. A inter-relação da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende do comportamento ácido-básico e do substrato, bem como de muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente.

Lipases de diversas fontes apresentam valores diferentes de pH ótimo. Para investigar a influência do pH no desempenho catalítico das preparações comerciais de lipases (LCR, LPP, LKM e LNU) na reação de hidrólise do óleo de oliva, variou-se o pH

de incubação na faixa de 5,0 a 9,0, numa temperatura fixa de 37°C.

Os resultados mostrados na Figura 4.1, cujo detalhamento é apresentado no Apêndice 8.3, mostram que a lipase LCR atingiu a atividade máxima de 3400 U/mg em pH igual a 7,0. As lipases pancreáticas apresentaram valores de pH ótimos em faixas mais alcalinas, a LPP, LKM e LNU alcançaram atividades máximas de 5286 U/mg, 4606 U/mg e 3992 U/mg em pH 8,0.

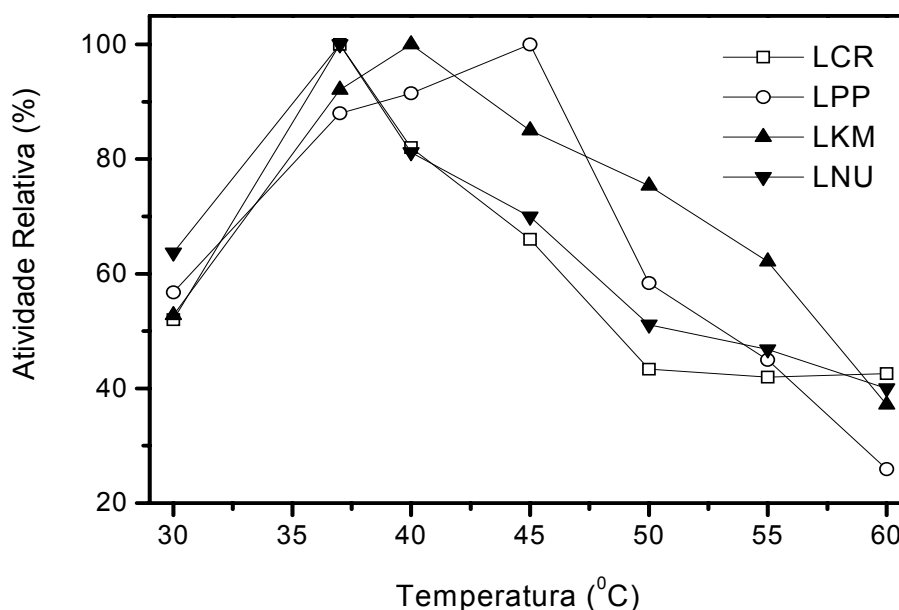


**Figura 4.1.** Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases LCR, LPP e LKM, tomando como parâmetro referencial de 100% a atividade de 3400 U/mg para LCR, 5286 U/mg para a LPP, 4606 U/mg para a LKM e 3992 U/mg para a LNU. Ensaio realizado a 37°C.

#### 4.1.2. Influência da Temperatura

Para a determinação da temperatura ótima das preparações enzimáticas das lipases (LCR, LPP, LKM e LNU) variou-se a temperatura de incubação entre 40 a 60°C em seus respectivos valores de pH ótimos de atuação, empregando a metodologia descrita por PEREIRA, 1999. As atividades relativas das enzimas são mostradas na Figura 4.2 (Apêndice 8.3).

Na faixa estudada observa-se que a lipase LCR e LNU apresentaram uma atividade máxima na temperatura 37°C, pH 7,0, enquanto as preparações LPP e LKM apresentaram uma temperatura ótima a 45°C, pH 8,0 e 40°C, pH 8,0, respectivamente.



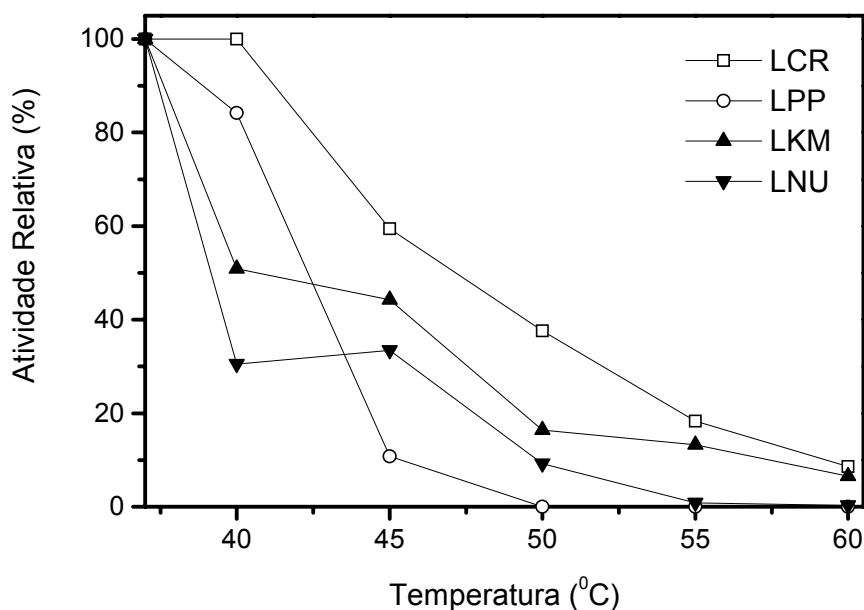
**Figura 4.2.** Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase LCR, LPP, LKM e LNU, tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 3400 U/mg, 5286 U/mg, 4606 U/mg e 3992 U/mg, respectivamente.

#### 4.1.3. Estabilidade Térmica da Enzima

Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na velocidade de reação por unidade de enzima. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na velocidade de desnaturação térmica da lipase, reduzindo, portanto, a velocidade de formação de produto. A estabilidade térmica foi verificada por meio da determinação das atividades residuais após a incubação numa faixa de temperatura entre 37-60°C em meio aquoso (tampão fosfato de sódio 0,1M) no pH ótimo de cada preparação enzimática por um período de 1h. As atividades residuais foram determinadas a 37°C por 5 min, de acordo com a metodologia descrita por PEREIRA (1999) e os resultados obtidos são apresentados no Apêndice 8.4.

As atividades residuais das enzimas LCR, LPP, LKM e LNU, após tratamento térmico por 1h, mostradas na Figura 4.3 indicam que todas as preparações de lipases testadas são termicamente instáveis acima de 40°C.

A partir desses resultados, calculou-se a constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima.



**Figura 4.3.** Influência da temperatura de incubação na atividade residual da LCR (pH 7,0), LPP (pH 7,5), LKM (pH 8,0) e LNU (pH 8,0). Ensaios realizados a 37 °C, substrato azeite de oliva 50% (1 h).

A constante de inativação ( $k_d$ ) foi calculada pela equação 4.1 e o tempo de meia-vida pela equação 4.2. Estes resultados são mostrados na Tabela 4.2.

$$A = A_{in_0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \quad (4.1)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-k_d} \quad (4.2)$$

Em que:  $A_{in}$  = Atividade enzimática residual no período de incubação;  $A_{in_0}$  = Atividade enzimática inicial.

Entre as três preparações uma menor velocidade de desnaturação térmica foi observada para a lipase LCR, que manteve 80% de sua atividade original após 1h de tratamento a 50°C, revelando um tempo de meia-vida 0,71 h ( $k_d = 0,98 \text{ h}^{-1}$ ). Com relação às preparações de origem animal, o tratamento na  $T = 45^\circ\text{C}$  por 1 h de incubação, provocou uma desativação bem acentuada para ambas preparações enzimáticas evidenciada pelos valores de  $k_d$  igual a 2,23, 0,81 e  $1,10 \text{ h}^{-1}$ , para LPP, LKM e LNU, respectivamente. Esses valores demonstram que a LCR apresenta comparativamente a maior estabilidade térmica.

**Tabela 4.2.** Constantes de inativação térmica das preparações LCR, LPP, LKM e LNU em meio aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0; 7,5 e 8,0), após 1h de incubação em diferentes temperaturas.

T (°C)	Constante de inativação ( $k_d$ ) ( $h^{-1}$ )				Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) (h)			
	LCR	LPP	LKM	LNU	LCR	LPP	LKM	LNU
40	0	0,17	0,67	1,18	Estável	0,38	1,03	0,59
45	0,52	2,23	0,81	1,10	1,33	0,31	0,86	0,63
50	0,98	CD	1,81	2,38	0,71	0	0,39	0,29
55	1,69	CD	2,02	4,76	0,41	0	0,34	0,14
60	2,45	CD	2,72	5,80	0,28	0	0,25	0,12

CD: completamente desnaturada

#### 4.1.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das lipases LCR, LPP, LKM e a LNU, a porcentagem do azeite de oliva na emulsão foi variada na faixa de 10% a 50% (v/v). Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo para cada preparação de lipase e na temperatura de 37°C, conforme descrito anteriormente (3.7.2).

Por meio desses ensaios, foi possível deduzir um mecanismo cinético da reação, isto é, a ordem na qual os substratos se ligam e os produtos se liberam da enzima e se esta ordem é obrigatória. Na Figura 4.4 são apresentadas as atividades enzimáticas em função da concentração do substrato preparado nas proporções apresentadas no Apêndice 8.5.

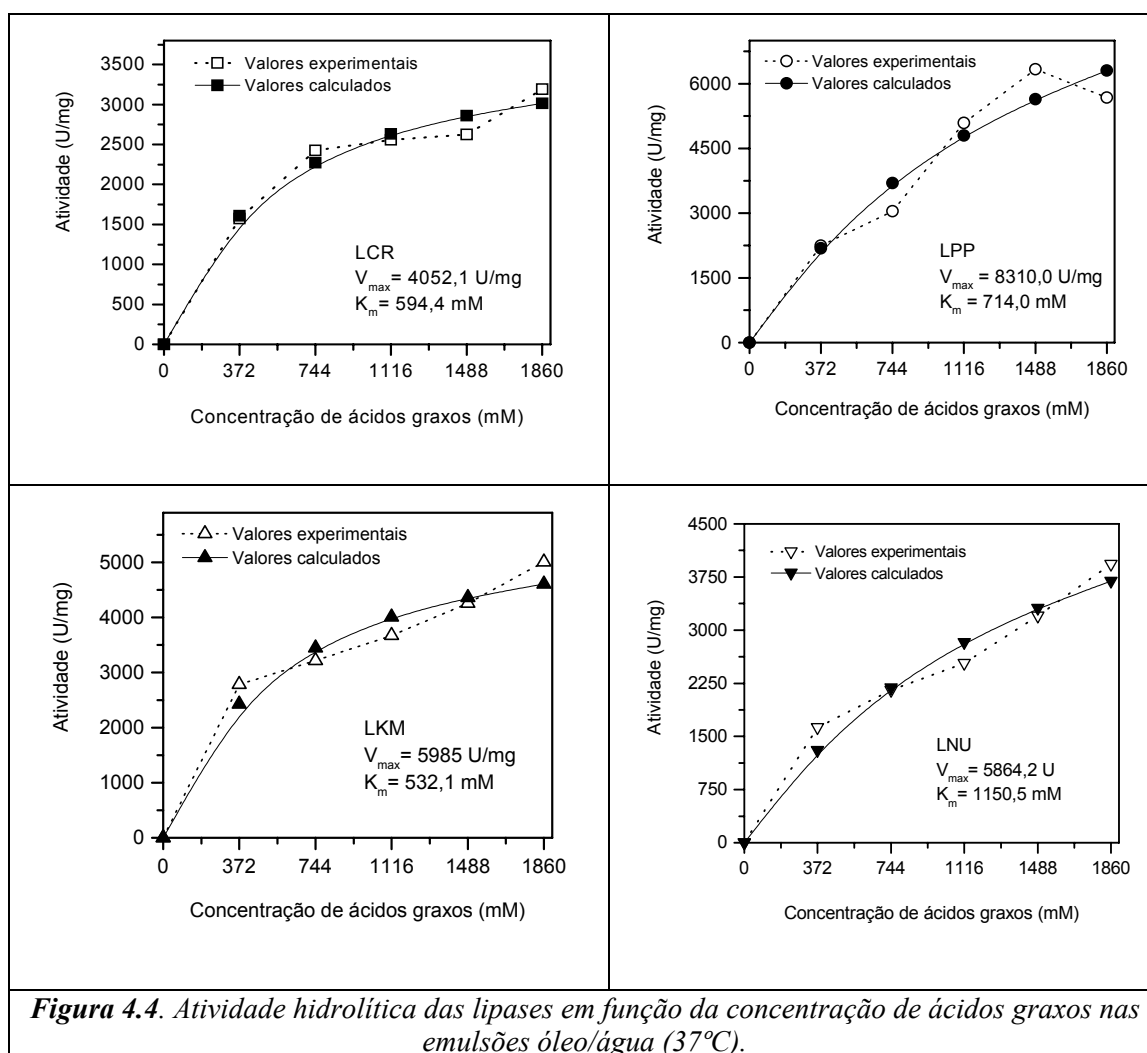
Os resultados mostrados na Figura 4.4 sugerem que as atividades das preparações de lipases (LCR, LPP, LKM e LNU) em função da concentração de ácidos graxos seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada, e no tempo de reação hidrolítica (5 min), não se detectou uma possível inibição por produtos de reação ou pela ausência de água.

Utilizando o Programa Enzfitter foram calculadas as constantes de afinidade ( $K_{map}$ ) e as velocidades máximas de reação ( $V_{maxap}$ ). O ajuste das curvas experimentais pelo modelo proposto levou aos seguintes resultados apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Parâmetros cinéticos para as preparações de lipases LCR, LPP, LKM e LNU.

Lipases	$K_{map}$ (mM)	$V_{max\ ap}$ (U)
<i>Candida rugosa</i> (Sigma) - LCR	594,3	4052,1
Pâncreas de porco (Sigma) - LPP	714,0	8310,0
Pancreatina (Kin Master) - LKM	532,1	5985,4
Pancreatina (Nuclear) - LNU	1150,5	5864,2

(Equações ajustadas pelo Programa Enzfitter)



**Figura 4.4.** Atividade hidrolítica das lipases em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37°C).

Os valores de  $K_{map}$  determinados mostram que a lipase LKM é a preparação enzimática que apresenta maior afinidade pelo substrato (emulsão de azeite de oliva). A lipase LPP foi a preparação que demonstrou menor afinidade pelo substrato.

As principais características das lipases descritas nas seções anteriores são sumarizadas na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Caracterização das preparações das lipases LCR, LPP, LKM e LNU

Propriedades catalíticas	Lipases			
	LCR	LPP	LKM	LNU
pH ótimo	7,0	7,5	8,0	8,0
Temperatura ótima ( °C)	40	45	40	37
kd (45°C) (h <sup>-1</sup> )	0,52	2,23	0,83	1,18
Tempo de meia-vida 45°C (h)	1,33	0,38	0,90	0,58
K <sub>map</sub> (mM)	594,3	714,0	532,1	1150,5
V <sub>max</sub> (U)	4052,1	8310,0	5985,4	5864,2

#### 4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE

Os abatedouros de frangos utilizam grande quantidade de água no processo industrial, gerando águas residuárias caracterizadas por elevadas cargas orgânicas e concentração de sólidos em suspensão, provenientes do processo de abate e dos processos de lavagem de pisos e equipamentos. Entretanto, as características desses efluentes variam dependendo do tipo do processo adotado industrialmente, incluindo o consumo de água por frango abatido.

A caracterização do efluente proveniente do frigorífico Macedo-Koerich foi realizada de acordo com metodologia descrita no item 3.6. Os valores encontrados para os diversos componentes analisados, indicam que a composição química do efluente (Tabela 4.5), está dentro dos limites esperados, conforme anteriormente descrito (Tabela 2.6), com exceção da concentração de amônia, cujo baixo valor pode ser atribuído à presença de proteína degradada.

O valor encontrado para o índice de saponificação (IS = 188,60mg KOH/g) é similar aos valores normalmente encontrados nos óleos de origem animal (160-193). O índice de saponificação comprova a presença de composto insaturado sendo de extrema importância no cálculo da massa molecular média dos ácidos graxos presentes no efluente. A massa molecular do efluente determinada foi de MM=318,3 g/mol.

O índice de acidez de 3% está acima do valor esperado dos óleos em geral, os quais devem apresentar valores máximos de acidez de 1,5%. Observa-se ainda que o efluente apresenta uma alta carga orgânica expressa em termos de demanda química de oxigênio (3930 mg/L), fato normalmente verificado em efluentes com elevados teores de gorduras.

A análise dos ácidos graxos presentes no efluente bruto mostra uma concentração elevada de ácido palmítico (0,56g/L ou 46,5%) e de ácido oléico (0,35g/L ou 29,5%), de acordo com a Tabela 4.6. Estes dados são bastante similares aos descritos por LEE E



FOGLIA (2000) para gordura de frango (ácido palmítico = 40,5% e ácido oléico = 25%). O cromatograma desta análise é representado na Figura 4.5. Essa composição em ácidos graxos é também bastante similar à encontrada no azeite de oliva, conforme mencionado anteriormente (item 2.8.6).

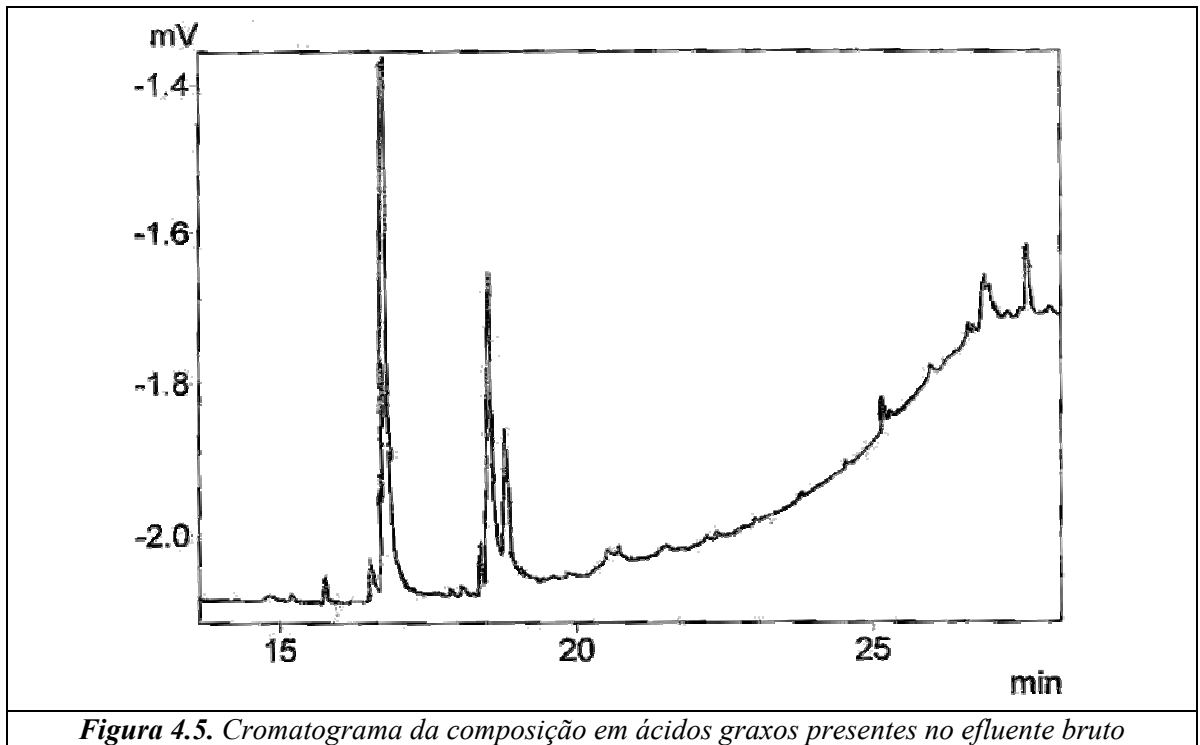
**Tabela 4.5.** Caracterização do efluente proveniente da Indústria Macedo Koerich

Análise	Resultado
pH	6,2
Acidez (%)	3,0
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	75,1
DQO (mg/L)	3.930
Amônia (mg/L)	17,4
Fósforo total (mg/L)	7,30
Fosfato total (mg/L)	80,70
Índice de saponificação (mg KOH/g)	188,6
Massa molecular (aproximada) (g/mol)	318,3
Óleos e graxas (g/L)	48,3
Densidade (g/mL)	0,92
Ácidos graxos livres (%)	53,6
Ácido oléico (%)	14,4

coletado antes do flotador

**Tabela 4.6.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente

Ácido graxo	Composição	
	g/L	%
Ácido Palmítico	0,56	46,5
Ácido Palmitoléico	0,035	2,90
Ácido Esteárico	0,138	11,5
Ácido Oléico	0,354	29,5
Ácido Linoléico	0,024	1,99
Colesterol	0,019	7,6



### 4.3. SELEÇÃO DA PREPARAÇÃO DE LIPASE

Baseado na caracterização das preparações de lipase e do efluente foram realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho das diferentes preparações de lipases comerciais na hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente, possibilitando uma comparação do desempenho das enzimas entre si para a seleção de um número menor de preparados, para estudos posteriores mais criteriosos.

Para realização desses ensaios, o efluente bruto foi emulsificado com goma arábica (3% m/v) e incubado com as diversas preparações de lipase numa concentração fixa de 6000 unidades de atividade por grama de efluente, tomando por base a atividade lipolítica anteriormente medida (Tabela 4.1). A preparação de lipase LNU por ter sido adquirida posteriormente não foi incluída nesta série de experimentos. Os ensaios foram realizados em duplicata sem ajuste de pH numa temperatura de 40°C e agitação de 200 rpm. Os resultados médios obtidos são mostrados na Figura 4.6 (a-f) e Tabela 4.7. O detalhamento desta série de experimentos é mostrado no Apêndice 8.6.

*Tabela 4.7. Desempenho das preparações de lipase na hidrólise do efluente de abate de frango.*

Enzima	Tempo (min)	Ácidos Graxos (mM)	Hidrólise (%)
Lipozyme (Novozyme)	120	30,7	20,4
Lipolase (Novozyme)	120	1,0	0,7
<i>Candida rugosa</i> (Sigma)	90	19,7	13,2
Pâncreas de porco (Sigma)	150	19,5	13,0
Pancreatina (Kin Master)	150	28,1	18,8

**Condições Fixas:** 6000 Unidades de atividade por grama de efluente, 3% (m/v) de agente emulsificante, sem ajuste de pH (5-6), 40°C).

Dentre as lipases testadas, o melhor desempenho foi demonstrado pela lipase Lipozyme, atingindo em 2h um percentual de hidrólise de 20,4% (Figura 4.6a). Apesar desse bom desempenho, o emprego da Lipozyme fica comprometido para este tipo de tratamento devido ao seu elevado custo (US 1400/kg).

Lipolase foi a preparação enzimática menos eficaz atingindo uma porcentagem máxima de hidrólise de apenas 0,7% num período de tempo de 2h (Figura 4.6b).

O desempenho insatisfatório alcançado pela Lipolase pode ser associado a faixa de atuação ótima de pH desta preparação de lipase, a qual apresenta segundo informações do fabricante maior atividade e estabilidade em pH alcalino (=11). Considerando que o pH do

meio reacional estava na faixa entre 5 a 6, é provável que um melhor desempenho dessa enzima possa ser alcançado em meios com valores de pH mais alcalinos.

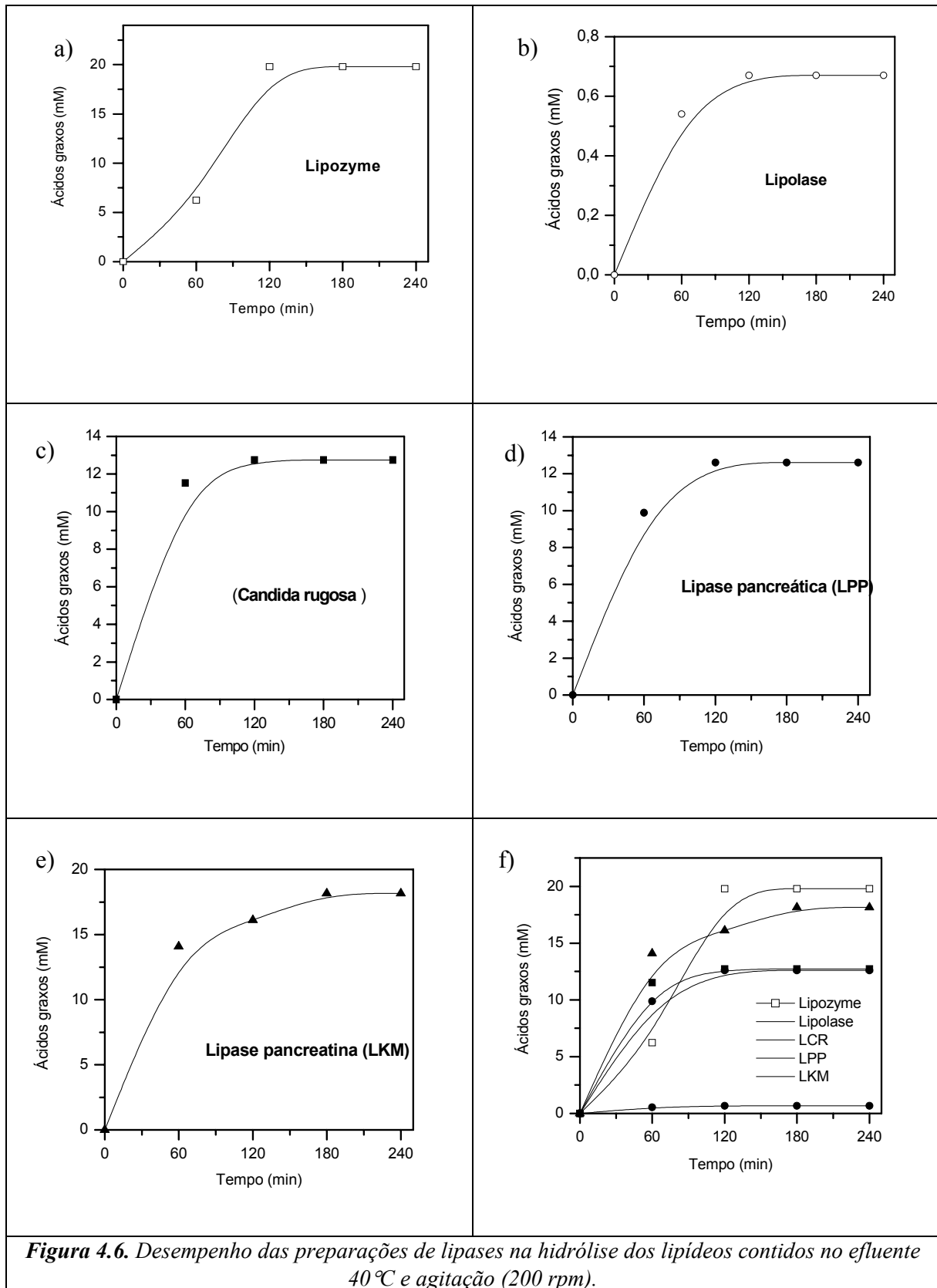
A lipase microbiana de *Candida rugosa* (Figura 4.6c) apresentou um comportamento satisfatório atingindo uma porcentagem máxima de hidrólise de 13,2% em um período de tempo relativamente curto (90 min).

As preparações de lipase de origem animal (LPP e LKM) mostraram comportamentos diferenciados para o mesmo período de tempo de incubação (150 min), sendo que a LPP alcançou uma porcentagem máxima de hidrólise de 13% (Figura 4.6d), enquanto a LKM atingiu um valor máximo de hidrólise de 18,6% (Figura 4.6e). Esse comportamento distinto se justifica em função das proteínas contaminantes presentes na LPP, que podem ter interferido negativamente a hidrólise dos lipídeos presentes no efluente (FABER, 1997).

Entre as preparações testadas, a lipase LKM foi a única que apresentou um desempenho bastante similar ao alcançado pela Lipozyme (Figura 4.6f). Esta preparação, conforme já mencionado, composta por diversas hidrolases, é produzida por indústria nacional, o que poderia ser mais atrativo para uma aplicação industrial do processo proposto. Entretanto, essa preparação enzimática apresenta uma baixa estabilidade térmica para temperaturas superiores a 40 °C (tempo de meia-vida = 0,90 h a 45 °C).

Nesse sentido, a lipase LCR apresenta-se como uma segunda alternativa, pois além de ser uma preparação comparativamente mais estável termicamente proporcionou também um desempenho bastante satisfatório na hidrólise dos lipídeos contidos no efluente. Além disso, essa enzima é capaz de hidrolisar completamente os triglicerídeos devido à sua habilidade em liberar todos os tipos de cadeias acila, independente de sua posição no triacilglicerol, ou seja, possui uma característica desejada de não oferecer restrições informadas quanto a regioespecificidade.

Tomando por base esses resultados foram selecionadas as lipases LCR e LKM para testes posteriores visando determinar as condições que maximizam a hidrólise de triglicerídeos presentes no efluente. Um tratamento estatístico foi empregado, visando economia de materiais e tempo, por meio da redução do número de experimentos, uma vez que a faixa de amostragem escolhida poderia ter sido excessivamente ampla.



**Figura 4.6.** Desempenho das preparações de lipases na hidrólise dos lipídeos contidos no efluente 40 °C e agitação (200 rpm).

#### **4.4. ESTUDOS DA OTIMIZAÇÃO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO EFLUENTE POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Nessa etapa de desenvolvimento do presente trabalho, foram realizados ensaios referentes ao planejamento e otimização dos parâmetros de hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente catalisada pelas preparações enzimáticas LCR e LKM.

##### **4.4.1. Avaliação dos Efeitos da Concentração de Enzima, Agente Emulsificante, Íons Cálcio e pH para a Enzima LCR**

Preliminarmente foi efetuado um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ . Este fatorial possui uma característica importante: os seus contrastes não misturam os efeitos principais com interações de dois fatores, e sim com interações de três fatores, que em princípio devem ser menos significativas, e por isso desprezíveis (BOX *et al.*, 1978).

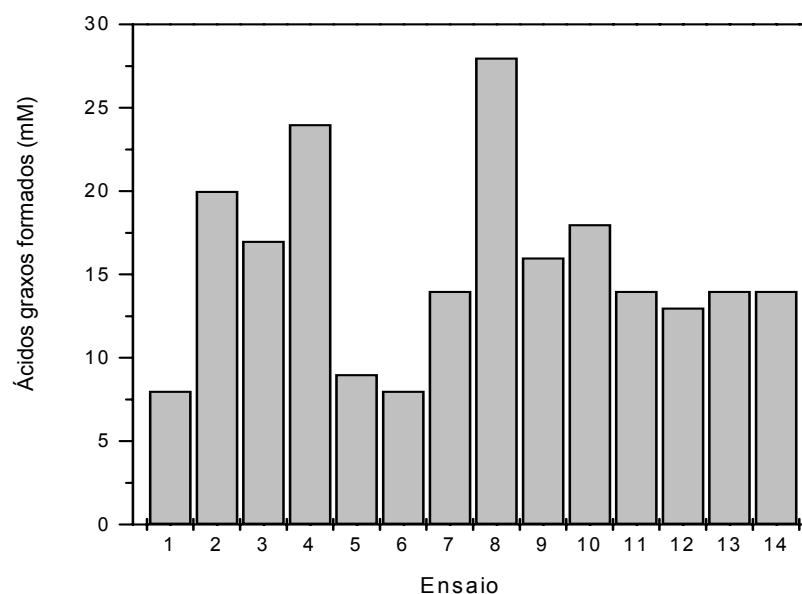
Na Tabela 4.8 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios realizados com base no planejamento fatorial  $2^{4-1}$ , para avaliação da influência da concentração da enzima LCR ( $x_1$ ), da concentração do agente emulsificante ( $x_2$ ), da adição dos íons cálcio ( $x_3$ ) e do controle do pH ( $x_4$ ). As condições operacionais foram mantidas constantes com relação a temperatura (40°C) e agitação (200 rpm). Para estimativa do erro experimental foram realizados ensaios adicionais no ponto central (3 repetições). Como variável resposta foi considerada a porcentagem de hidrólise alcançada após 3h da ação enzimática. Na Figura 4.7 são mostradas as concentrações finais de ácidos graxos (mM) para esses mesmos ensaios. O detalhamento dos resultados obtidos nos experimentos é mostrado no Apêndice 8.7.

Os resultados obtidos indicam que a lipase LCR foi capaz de hidrolisar os triglicerídeos presentes no efluente em todas as condições ensaiadas. Os teores de ácidos graxos livres variaram entre 8 a 28 mM após 3h de reação, correspondendo a porcentagens de hidrólise de 6,45 a 22,57%, respectivamente. As porcentagens mais elevadas foram verificadas nas reações realizadas com ajuste do pH inicial em 7,0, pela adição de tampão fosfato 0,1M. Tal fato pode ser explicado, principalmente, devido ao pH ótimo de atividade catalítica da lipase LCR se encontrar em pH 7,0. Provavelmente nesta condição, a adição de tampão no meio reacional tenha favorecido a maior liberação de ácidos graxos. Verifica-se, portanto, que o ajuste do pH do meio reacional foi um fator extremamente significativo e positivo na resposta analisada.

**Tabela 4.8.** Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ) para a lipase *Candida rugosa* empregando como substrato efluente da indústria de abate de frango

Ensaio	Valores reais				Resposta	
	[E] %	Goma (%)	CaCl <sub>2</sub> (M)	Tampão	AGL (mM)	Hidrólise (%)
1	0,1	0	0	Ausente	8,10	6,45
2	0,4	0	0	Presente	20,0	16,12
3	0,1	3	0	Presente	17,0	13,70
4	0,4	3	0	Ausente	24,0	19,35
5	0,1	0	0,02	Presente	9,0	7,25
6	0,4	0	0,02	Ausente	8,0	6,44
7	0,1	3	0,02	Ausente	14,0	11,28
8	0,4	3	0,02	Presente	28,0	22,57
9	0,25	1,5	0,01	Presente	16,0	12,89
10	0,25	1,5	0,01	Presente	18,0	14,51
11	0,25	1,5	0,01	Presente	14,0	11,29
12	0,25	1,5	0,01	Ausente	13,0	10,47
13	0,25	1,5	0,01	Ausente	14,0	11,28
14	0,25	1,5	0,01	Ausente	14,0	11,28

\*Tempo de hidrólise: 180 min



**Figura 4.7.** Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase *Candida rugosa* sob diferentes condições.

No entanto, pela análise direta da Tabela 4.8 não foi possível analisar o efeito dos outros fatores, como a concentração de enzima, suplementação do meio reacional com  $\text{CaCl}_2$  e agente emulsificante. Isto foi feito pela análise estatística dos dados, utilizando o programa Statistica (versão 6.0). As estimativas dos efeitos, erros-padrão e do teste t de Student's para a resposta analisada são apresentadas nas Tabelas 4.9 e 4.10.

**Tabela 4.9.** Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise do efluente, de acordo com o planejamento fatorial  $2^{4-1}$

Variáveis	Efeitos	Erros-padrão	Valores de t	p
Média	12,49	$\pm 0,53$		
Enzima ( $x_1$ )	6,45	$\pm 1,40$	4,60	0,0013 <sup>a</sup>
Goma ( $x_2$ )	7,66	$\pm 1,40$	5,46	0,004 <sup>a</sup>
$\text{CaCl}_2$ ( $x_3$ )	-2,02	$\pm 1,40$	-1,44	0,184
Tampão ( $x_4$ )	3,11	$\pm 1,40$	2,99	0,017 <sup>b</sup>

a  $p < 0,01$ ; b  $p < 0,05$

**Tabela 4.10.** Análise de Variância do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  proposto

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Enzima ( $x_1$ )	83,20	1	83,20	59,20	0,015
Goma ( $x_2$ )	117,35	1	117,35	83,49	0,008
$\text{CaCl}_2$ ( $x_3$ )	8,16	1	8,16	5,81	0,074
Tampão ( $x_4$ )	33,88	1	33,88	24,10	0,093
Falta de ajuste	29,78	5	5,96	4,23	
Erro total	5,62	4	1,40		
Total corrigido	278,00	13			

$R^2=0,883$

Os resultados da análise estatística confirmam o efeito sugerido pela análise direta dos dados com relação ao ajuste do pH. Verifica-se de acordo com o teste t de Student's (Tabela 4.9) que além do efeito do pH ( $x_4$ ), a concentração de enzima ( $x_1$ ) e a concentração de goma ( $x_2$ ) apresentaram uma influência altamente significativa, enquanto a concentração dos íons cálcio não foi significativa estatisticamente a um nível de 95% de confiança.



#### 4.4.2. Avaliação da Influência Individual do ajuste do pH do Efluente com Solução Tampão sobre a Porcentagem de Hidrólise

Uma vez que, por meio do planejamento estatístico efetuado, o efeito da adição de tampão no meio reacional foi positivo e altamente significativo, apontando para a sua importância para alcançar taxas elevadas de hidrólise, foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  completo, de forma a investigar o efeito separado do tampão fosfato na reação de hidrólise do efluente, conforme a matriz mostrada na Tabela 4.11.

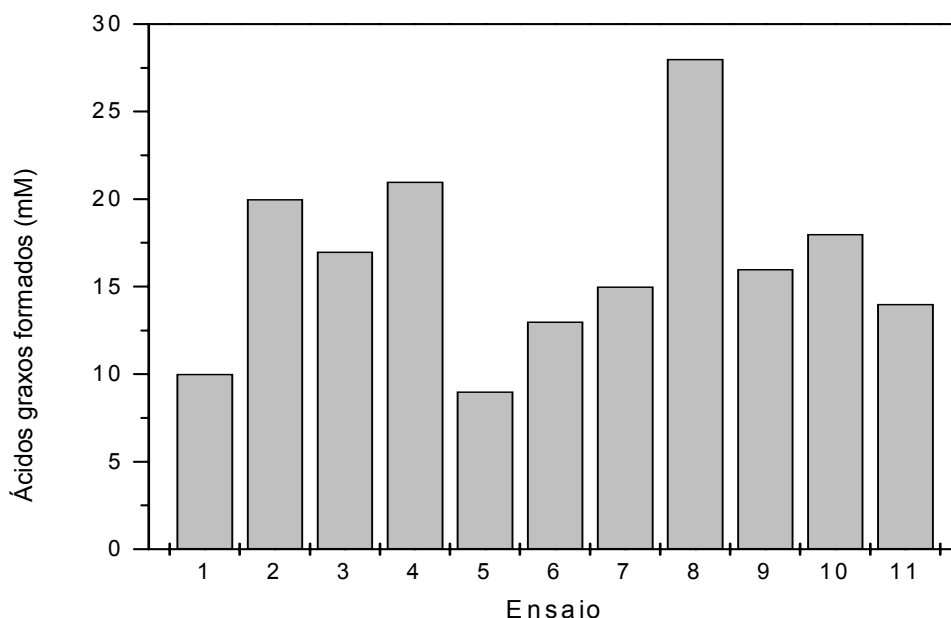
Na Tabela 4.11 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios realizados com base no planejamento fatorial  $2^3$ , para avaliação das variáveis: concentração de lipase ( $x_1$ ), agente emulsificante ( $x_2$ ) e íons cálcio ( $x_3$ ) na formação de ácidos graxos (mM) e porcentagem de hidrólise alcançada após 3h de tratamento enzimático. O detalhamento dos resultados obtidos nos experimentos para a resposta avaliada é mostrado no Apêndice 8.8.

**Tabela 4.11.** Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  para a lipase *Candida rugosa* em presença de tampão

Ensaio	Valores reais			Variáveis Respostas	
	[E] (%)	[AE] (%)	CaCl <sub>2</sub> (M)	Hidrólise (%)	Ácidos graxos formados (mM)
1	0,1	0	0	8,10	10,0
2	0,4	0	0	16,10	20,0
3	0,1	3	0	13,70	17,0
4	0,4	3	0	19,40	21,0
5	0,1	0	0,02	7,30	9,0
6	0,4	0	0,02	10,50	13,0
7	0,1	3	0,02	16,10	15,0
8	0,4	3	0,02	22,60	28,0
9	0,25	1,5	0,01	12,90	16,0
10	0,25	1,5	0,01	14,50	18,0
11	0,25	1,5	0,01	11,30	14,0

A liberação de ácidos graxos variou entre 10 mM a 28 mM, correspondendo a porcentagens de hidrólise entre 8,10 a 22,60%. Verifica-se que a formação de ácidos graxos foi dependente da concentração de lipase e do agente emulsificante. A suplementação de íons cálcio no meio reacional não apresentou efeito significativo, provavelmente devido à presença de íons cálcio na goma arábica, tornando desnecessário o uso de CaCl<sub>2</sub>. De uma maneira geral, a reação de hidrólise foi favorecida para meios reacionais emulsificados com goma arábica e concentração de lipase no nível máximo

(0,4%). Na Figura 4.8 estão apresentadas as concentrações finais de ácidos graxos (mM) para os ensaios realizados. A resposta analisada foi a porcentagem de hidrólise alcançada após 3h da ação enzimática.



**Figura 4.8.** Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase *Candida rugosa* sob diferentes condições.

A Tabela 4.12 reúne os dados da análise dos efeitos, erros-padrão e do teste t de Student's. Verifica-se que apenas a variável concentração de íons cálcio ( $x_3$ ) não foi estatisticamente significativa num nível de 95% de confiança ( $p = 0,88$ ). Tanto o efeito da variável  $x_1$  como  $x_2$  apresentaram valores similares (5,85 e 7,45) e significativos ao nível de 99% de confiança, sendo selecionados para estimativa do modelo matemático que descreve o processo de hidrólise na região experimental estudada.

Os efeitos principais foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo linear e a melhor função linearizada pode ser demonstrada pela equação 4.3.

$$Y = 14,22 + 2,92 x_1 + 3,73 x_2 \quad (4.3)$$

em que: Y é a variável resposta,  $x_1$  e  $x_2$  representam os valores codificados para concentração de enzima e concentração de agente emulsificante.

**Tabela 4.12.** Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise do efluente, obtida nos ensaios realizados, de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^3$  proposto

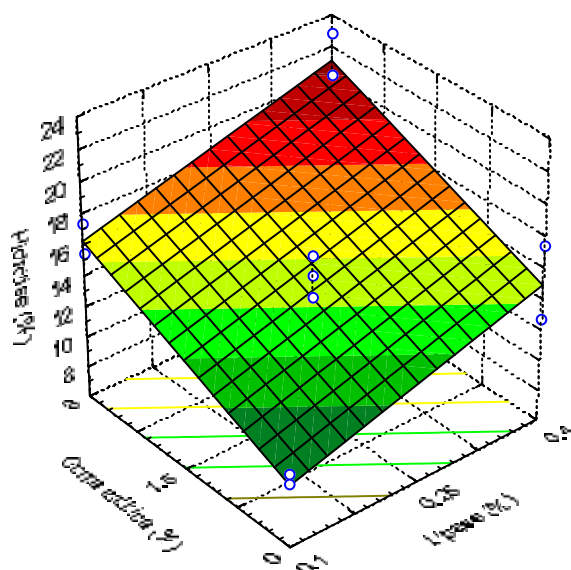
Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de t	p
Média	13,86	± 0,54	25,63	
Enzima ( $x_1$ )	5,85	± 1,27*	4,61*	0,001*
Goma ( $x_2$ )	7,45	± 1,27*	5,87*	0,004*
CaCl <sub>2</sub> ( $x_3$ )	-0,20	± 1,27	-0,16	0,88
$x_1x_2$	0,25	± 1,27	0,19	0,85
$x_1x_3$	-1,00	± 1,27	-0,79	0,47
$x_2x_3$	3,00	± 1,27	2,36	0,08

A significância estatística do modelo foi avaliada pelo teste F (Tabela 4.13), demonstrando que a regressão é altamente significativa a 99% de nível de confiança e apresenta um bom coeficiente de determinação ( $R^2=0,94$ ), deste modo, justificando 94% a variação total da resposta. Segundo BARROS NETO *et al.* (1995), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, o modelo estatístico determinado para a porcentagem de hidrólise foi também preditivo.

**Tabela 4.13.** Análise de Variância do planejamento fatorial completo  $2^3$  proposto

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
Modelo	179,45	2	89,73	21,48	0,0010
Curvatura	3,83	1	3,83	0,92	0,37
Resíduos	29,25	7	4,18		
Falta de ajuste	24,13	5	4,83	1,88	0,38
Erro Puro	5,12	2	2,56		
Total	212,53	10			

Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta (Figura 4.9) indicam que a hidrólise máxima pode ser obtida numa concentração de enzima de 0,4% (m/v) na presença de agente emulsificante (3%).



**Figura 4.9.** Superfície de resposta para a porcentagem de hidrólise do efluente catalisada pela lipase LCR, descrita pela equação 4.3.

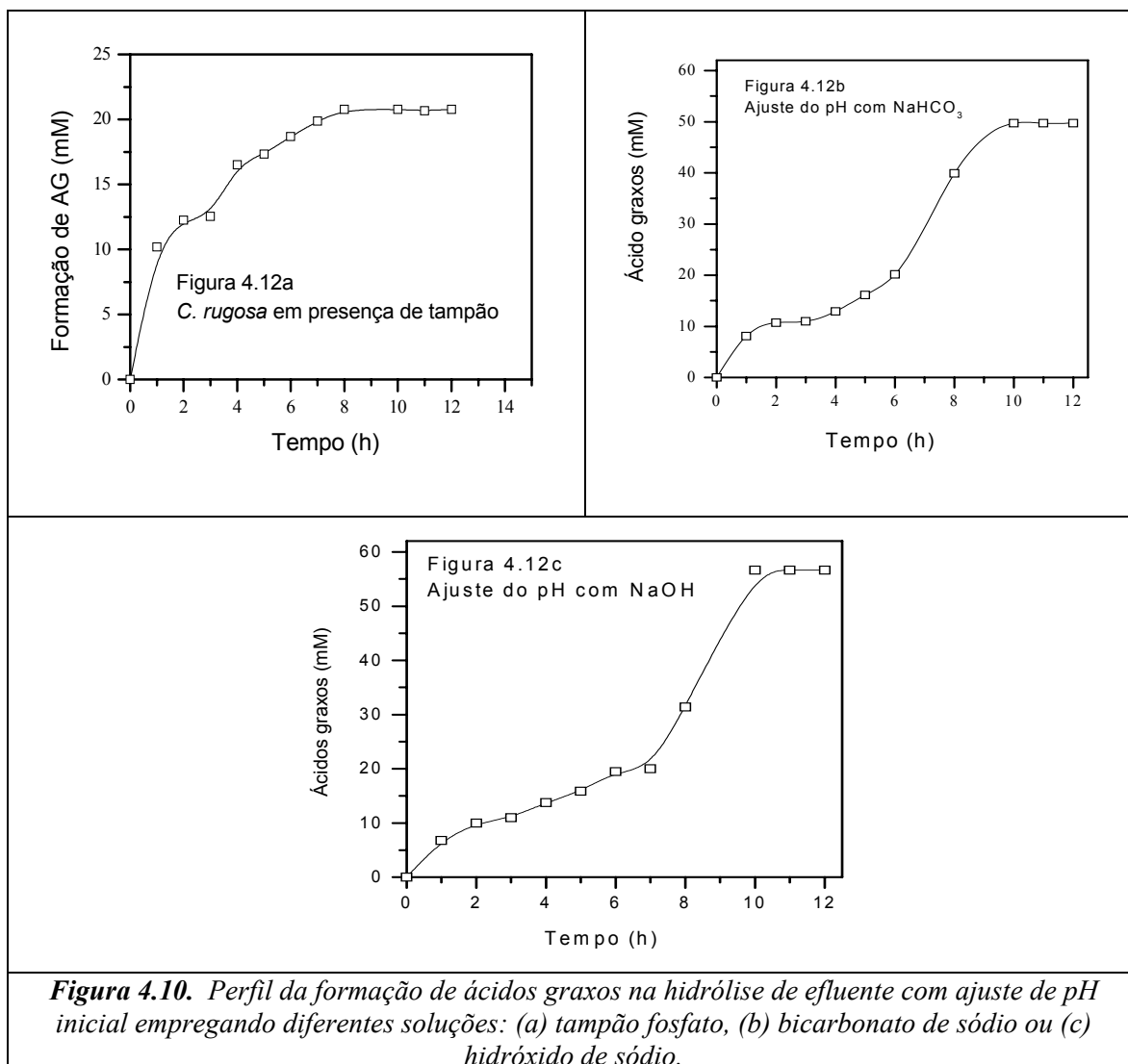
#### 4.4.3. Ajuste do pH do Efluente com Bicarbonato de Sódio ou Hidróxido de Sódio

Empregando as condições estabelecidas anteriormente foi verificada a influência da substituição da solução tampão de fosfato de sódio por soluções de bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio para ajustar o pH do meio para 7,0 (pH ótimo de atuação da LCR). Na presença de bicarbonato de sódio (30g/L) ou de hidróxido de sódio (1M) observou-se um aumento na porcentagem de hidrólise estimado em 50%, caracterizado pela formação de ácidos graxos e glicerol, como mostrado na Tabela 4.14 e Figura 4.10.

**Tabela 4.14.** Parâmetros de caracterização do efluente tratado com *Candida rugosa*

Ajuste de pH	Glicerol (%)		Ácidos Graxos (mM/mL)		DQO (mg/L)
	0 h	12 h	0 h	12 h	
Tampão	0,34	0,50	0,25	0,45	nd
NaHCO <sub>3</sub>	0,18	0,28	0,44	0,94	21857
NaOH	0,25	0,35	0,44	1,07	22557

nd: não determinado



Não foi verificada uma redução da matéria orgânica em termos de demanda química de oxigênio (DQO), porém o tratamento enzimático foi bastante satisfatório, promovendo a hidrólise dos lipídeos presentes no efluente bruto. Esses resultados são similares aos descritos por JUNG *et al* (2002), nos tratamentos efetuados em efluentes contendo teores de gorduras da ordem de 800 mg/L.

Testes de biodegradabilidade foram realizados para avaliar o possível impacto do tratamento enzimático na biodigestão anaeróbia, sendo monitorados pelo volume de metano gerado e demanda química de oxigênio (DQO).

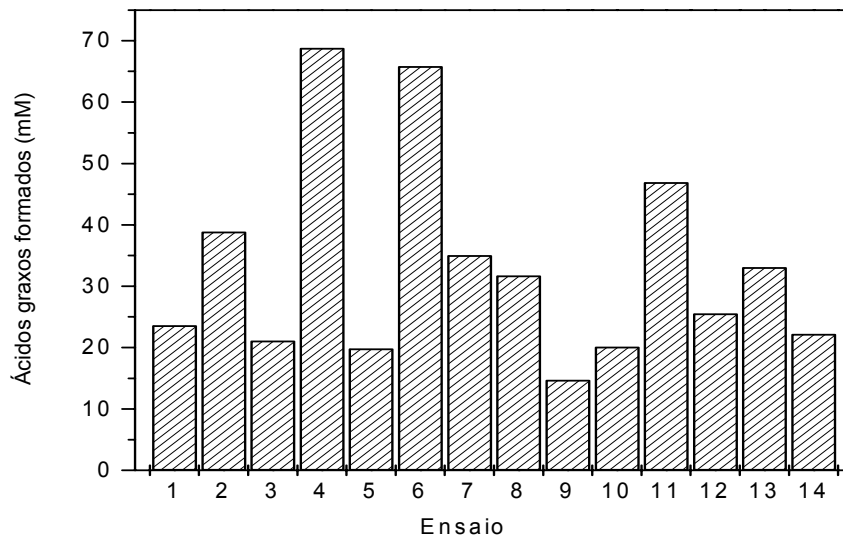
#### 4.4.4. Avaliação dos Efeitos da Concentração de Enzima, Agente Emulsificante, Íons Cálcio na Hidrólise do Efluente pela Enzima LKM

A técnica de planejamento de experimentos foi também utilizada para avaliar a influência dos parâmetros mais significativos na porcentagem de hidrólise dos lipídeos presentes no efluente, utilizando a preparação enzimática LKM. As porcentagens de hidrólise alcançadas nos ensaios realizados são apresentadas na Tabela 4.15, com base no planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ) avaliando o efeito da concentração da enzima LKM ( $x_1$ ), do agente emulsificante ( $x_2$ ), dos íons cálcio ( $x_3$ ) e controle do pH com solução de bicarbonato de sódio ( $x_4$ ). Foram mantidas constantes as condições operacionais: temperatura (40°C) e agitação (200 rpm). A Figura 4.11 mostra os perfis de ácidos graxos formados em função do tempo total do tratamento enzimático (6h).

**Tabela 4.15.** Matriz do planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ) para a lipase LKM empregando efluente da indústria de abate de frango

Ensaio	Valores reais				Respostas	
	[E] %	Goma (%)	CaCl <sub>2</sub> (M)	Bicarbonato de sódio	AG Formados (mM)	Hidrólise (%)
1	0,1	0	0	Ausente	23,61	24,33
2	0,4	0	0	Presente	38,88	40,04
3	0,1	3	0	Presente	21,13	20,33
4	0,4	3	0	Ausente	68,83	72,08
5	0,1	0	0,02	Presente	19,84	20,26
6	0,4	0	0,02	Ausente	65,87	66,91
7	0,1	3	0,02	Ausente	35,03	33,67
8	0,4	3	0,02	Presente	31,75	27,52
9	0,25	1,5	0,01	Presente	14,74	14,08
10	0,25	1,5	0,01	Presente	20,14	16,16
11	0,25	1,5	0,01	Presente	46,93	15,70
12	0,25	1,5	0,01	Ausente	25,55	25,31
13	0,25	1,5	0,01	Ausente	33,09	32,46
14	0,25	1,5	0,01	Ausente	22,22	21,22

t=tempo de hidrólise 6h



**Figura 4.11.** Concentração de ácidos graxos formados na reação de hidrólise do efluente catalisada pela lipase pancreatina (LKM) sob diferentes condições

O efeito individual dos fatores experimentais e de suas interações sobre a porcentagem de hidrólise foi avaliado estatisticamente pelo Programa Statistica versão 6.0 (Tabelas 4.16 e 4.17). Os resultados obtidos indicam um comportamento bastante distinto entre as preparações LCR e LKM, sendo que a LKM forneceu valores superiores de porcentagem de hidrólise (14,08 a 72,08%) após 6h de tratamento enzimático.

Os teores de ácidos graxos variaram entre 14 a 68 mM após 6h de tratamento. Pela análise direta da Tabela 4.15, verifica-se que as porcentagens mais elevadas de hidrólise foram obtidas nas reações realizadas com efluente sem o ajuste de pH e concentração de enzima no nível máximo (0,4%), ou seja, o aumento da concentração de lipase ( $x_1$ ) de 0,1 para 0,4%, provocou um aumento significativo no grau de hidrólise, enquanto a adição de bicarbonato de sódio no meio reacional reduziu a formação de ácidos graxos, sugerindo uma inibição da ação enzimática em efluentes com pH ajustado com esse composto. Observa-se também que tanto a adição do agente emulsificante, quanto de íons cálcio no efluente não foram relevantes para que ocorresse uma maior liberação de ácidos graxos.

Este comportamento foi confirmado por meio da análise estatística (Tabela 4.16), indicando que as variáveis  $x_1$  (concentração de enzima) e  $x_4$  (bicarbonato de sódio) foram significativas ao nível de 95% de confiança. Enquanto o efeito da concentração de enzima foi positivo (26,33), a adição de solução de bicarbonato de sódio teve uma influência negativa (-17,77). As outras duas variáveis ( $x_2$  e  $x_3$ ) não apresentaram efeitos significativos, isto é,  $p > 0,05$ .

Um comportamento similar foi constatado por MENDES E CASTRO (2003) nas reações de hidrólise de soro de queijo com pH inicial ajustado com bicarbonato de sódio e empregando a lipase pancreática (LKM). Esses autores atribuíram esse comportamento a algum tipo de composto presente no soro de queijo que possa ter reagido com bicarbonato de sódio, influenciando negativamente a atividade lipolítica da lipase, tendo ainda verificado uma elevação no pH do meio reacional.

Entretanto, tal explicação não se aplica aos testes descritos nesse trabalho, tendo em vista que nos ensaios realizados com a LCR (item 4.4.3) esse comportamento não foi verificado. Mesmo considerando que o pH do meio reacional tenha sido alterado durante o progresso da hidrólise para valores mais alcalinos entre 8,5 a 9,0 (Apêndice 8.9), estudos adicionais são necessários para explicar esse mecanismo de inibição da LKM em meios com adição de bicarbonato de sódio, principalmente se for considerado que essa preparação enzimática apresenta valores de pH ótimos em faixas mais alcalinas (item 4.1, Figura 4.1). Portanto, testes posteriores (item 4.5) foram realizados para verificar se a substituição do bicarbonato de sódio por hidróxido de sódio modificaria o perfil de hidrólise.

**Tabela 4.16.** Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste t de Student's para a porcentagem de hidrólise

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	Valores de t	p
Média	32,35	±3,31	9,7778	0,00004
Enzima (x <sub>1</sub> )	26,33	± 8,75	3,0075	<b>0,0148*</b>
Goma arábica (x <sub>2</sub> )	1,18	± 8,75	0,1342	0,8962
Cálcio (x <sub>3</sub> )	-1,45	± 8,75	-0,1651	0,8726
NaHCO <sub>3</sub> (x <sub>4</sub> )	-17,77	± 6,62	-2,6853	<b>0,0250*</b>

Baseado nos efeitos avaliados (Tabela 4.16) foi desenvolvido um modelo matemático ajustando a função resposta com os dados experimentais (Tabela 4.17). A equação 4.4 expressa o modelo, no qual as variáveis apresentam os valores codificados, representando o rendimento de hidrólise (Y) como função da concentração de enzima (x<sub>1</sub>) e presença de bicarbonato de sódio (x<sub>4</sub>).

$$Y = 38,19 + 13,54 x_1 - 7,38 x_4 \quad (4.4)$$

A validade do modelo proposto foi estatisticamente significativa (p=0,02) ao nível de 95% de confiança. O modelo não apresentou falta de ajuste e a determinação do

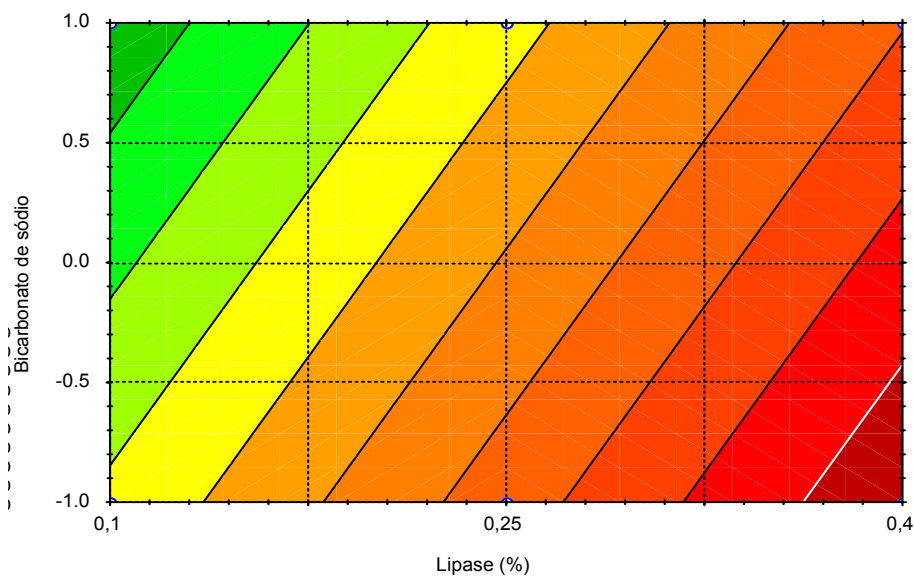


coeficiente de correlação ( $R^2=0,70$ ), indica que 70% da variabilidade na resposta, em relação aos resultados obtidos, pode ser explicada pelo modelo.

**Tabela 4.17.** Análise de Variância para a porcentagem de hidrólise

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	2228,56	2	1114,28	11,73	0,0024*
Curvatura	682,68	1	682,68	7,19	0,0230*
Resíduos	949,70	10	94,97		
Falta de ajuste	753,04	6	125,51	2,55	0,1918
Erro Puro	196,66	4	49,17		
Total	3860,95	13			

Os valores preditos pelo modelo (Figura 4.12) indica que a porcentagem de hidrólise foi maximizada no nível alto de concentração de lipase ( $x_1=1$ ) e na ausência de bicarbonato de sódio ( $x_4 = -1$ ).



**Figura 4.12.** Curva de nível para a porcentagem de hidrólise do efluente catalisada pela lipase LKM, descrita pela equação 4.4.

#### 4.4.5. Influência do Ajuste do pH do Efluente com diferentes Soluções Alcalinizantes na Hidrólise empregando a Enzima LKM

Nesta série de experimentos foi testada a substituição da solução de  $\text{NaHCO}_3$  por  $\text{NaOH}$  para o ajuste do pH do meio reacional, empregando duas concentrações de lipase (0,1 e 0,4%) na presença e ausência de goma arábica, como descrito na Tabela 4.18. Todos os ensaios foram realizados na temperatura de  $40^\circ\text{C}$ , agitação de 200 rpm e tempo de hidrólise de 6h.

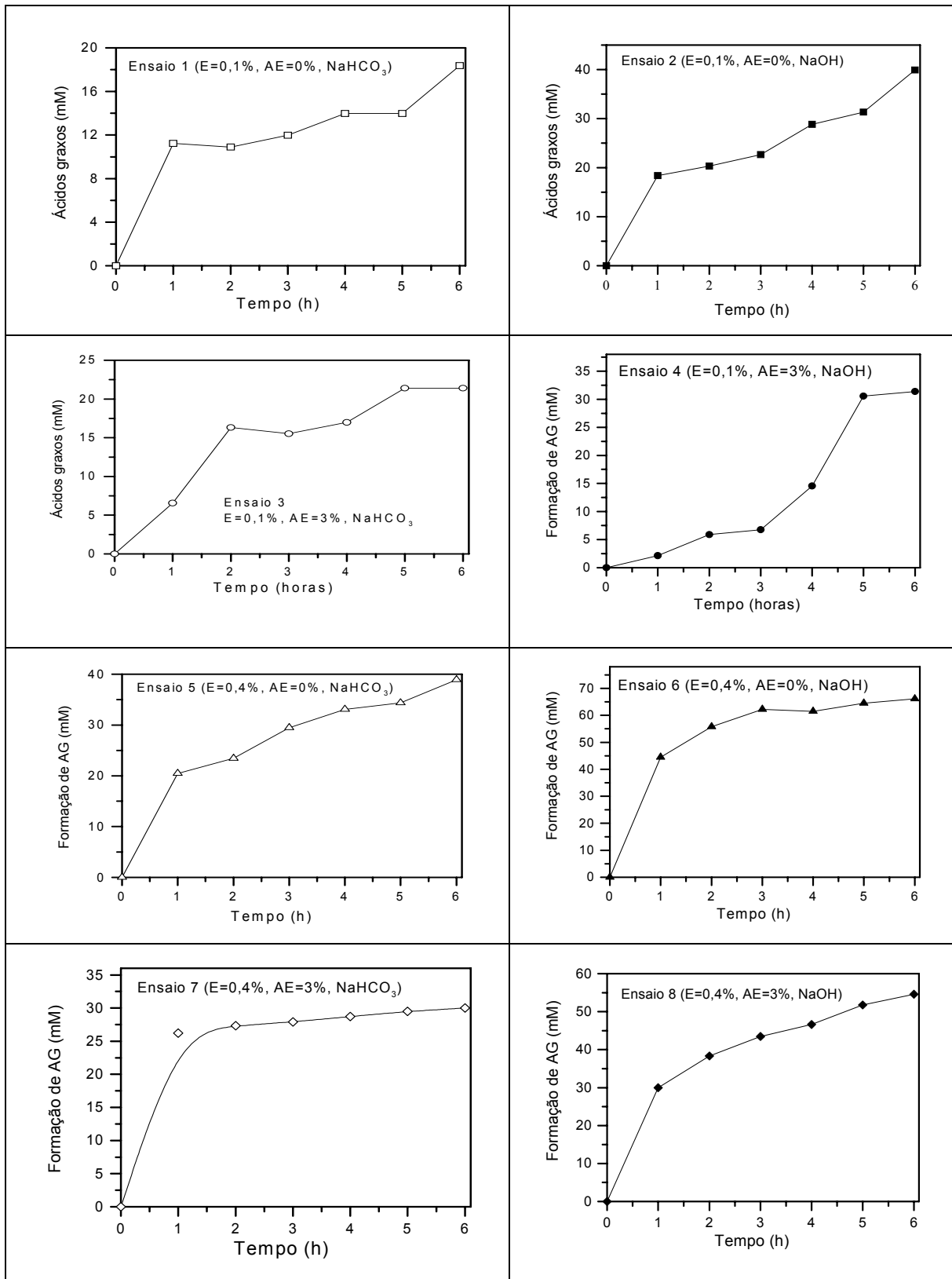
**Tabela 4.18.** Ensaios complementares de hidrólise do efluente com pH ajustado por adição de diferentes soluções alcalizantes ( $\text{NaHCO}_3$  ou  $\text{NaOH}$ )

Ensaio	Enzima (%)	Agente emulsificante (%)	Solução alcalizante
1	0,1	0	$\text{NaHCO}_3$
2	0,1	0	$\text{NaOH}$
3	0,1	3	$\text{NaHCO}_3$
4	0,1	3	$\text{NaOH}$
5	0,4	0	$\text{NaHCO}_3$
6	0,4	0	$\text{NaOH}$
7	0,4	3	$\text{NaHCO}_3$
8	0,4	3	$\text{NaOH}$

A comparação das diferentes condições testadas na hidrólise dos lipídeos presentes no efluente neutralizado com  $\text{NaHCO}_3$  ou  $\text{NaOH}$  em termos de ácidos graxos formados (mM) em função do tempo de reação é mostrada na Figuras 4.13, tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.10.

Verifica-se que a solução alcalinizante utilizada no ajuste do pH do meio reacional influenciou de maneira acentuada na liberação de ácidos graxos. Quando se utilizou a solução de bicarbonato de sódio (Ensaio 1, 3, 5 e 7) a concentração máxima de ácidos graxos formados foi de 38,88 mM (ensaio 5), a substituição do bicarbonato por hidróxido de sódio elevou essa concentração para 66,09 mM (ensaio 6). O efeito das outras variáveis (concentração de lipase e agente emulsificante) foi similar ao anteriormente descrito (item 4.4.3).

De fato verifica-se que a única variável significativa no processo foi a concentração de enzima. Observa-se ainda que o ajuste do pH do meio reacional só é relevante, quando a solução alcalinizante de bicarbonato é utilizada, sendo esse efeito negativo.



**Figura 4.13.** Perfil de formação de ácidos graxos na hidrólise enzimática do efluente tratado com a lipase pancreática (LKM) de acordo com o planejamento fatorial (40 °C, 200 rpm).

AE = Agente Emulsificante; E = Enzima

Tomando por base os experimentos do planejamento fatorial (Tabela 4.15, ensaios 4, 6, 8) e os ensaios descritos na Tabela 4.18 (2, 4, 6 e 8), verifica-se que o mesmo tipo de comportamento de hidrólise é obtido em meios reacionais com ajuste ou sem ajuste de pH. Entretanto, considerando que geralmente os valores de pH de efluentes são muito variáveis, recomenda-se, neste caso particular, um ajuste do pH do meio reacional com hidróxido de sódio.

Com o objetivo de determinar a eficiência do tratamento enzimático pela enzima LKM, foram também quantificados a concentração de glicerol e ácidos formados bem como a carga orgânica do efluente antes e depois do tratamento adotando as seguintes condições: concentração de enzima (0,4%), ajuste do pH com NaOH na presença ou ausência de agente emulsificante (3% m/v). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.19. Por outro lado, o agente emulsificante não apresentou nenhum tipo de inibição na hidrólise.

A eficiência do tratamento enzimático com LKM foi também avaliada por meio de testes de biodegradabilidade empregando lodo anaeróbico, neste caso, em todos os ensaios de hidrólise o pH do meio foi ajustado com hidróxido de sódio.

**Tabela 4.19.** Caracterização da hidrólise de efluentes pela enzima LKM na presença e ausência de agente emulsificante

Emulsificante	Glicerol (%)		Ácidos Graxos (mM/mL)		Hidrólise (%)
	0 h	12 h	0 h	12h	
Presença	0,51	0,68	0,31	1,03	48,67
Ausência	0,21	0,45	0,29	1,13	55,33

#### 4.5. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO EFLUENTE HIDROLISADO PELAS ENZIMAS LCR E LKM

A composição dos ácidos graxos presentes no efluente antes e após tratamento enzimático com as enzimas LCR e LKM nas mesmas condições operacionais está relacionada na Tabela 4.20, tomando por base os cromatogramas apresentados nas Figuras 4.14 a 4.17.

Sabe-se da literatura (FABER, 1997) que a enzima *C. rugosa* (LCR) é uma lipase inespecífica, ou seja, catalisa a hidrólise de triglicerídeos para ácidos graxos livres e

glicerol, de modo aleatório. Não mostra especificidade em relação à natureza do grupo acila ou à posição em que este está esterificado no glicerol.

De acordo com os resultados obtidos, a atuação da *C. rugosa* (LCR) aumentou a concentração inicial de ácido esteárico em 70% e do ácido oléico em 100%, após 12h de tratamento com uma porcentagem de hidrólise de 58,70%, resultando num acúmulo desses ácidos no meio reacional. Por outro lado, observa-se que houve um acréscimo de 49% na concentração do ácido palmitoléico e de 24% de ácido linoléico. Esse aumento pode ser interpretado como um desprendimento preferencial desses ácidos do triglicerídeo.

**Tabela 4.20.** Composição dos ácidos graxos liberados na hidrólise do efluente com as enzimas LCR e LKM

Composição	Efluente tratado com LCR (g/L)		Efluente tratado com LKM (g/L)	
	0 h	12h	0h	12h
Ácido Pentadecanóico	3,0	0	3,0	0
Ácido Palmítico	0,87	0,80	1,01	0,35
Ácido Palmitoléico	0,18	0,09	0,08	0
Ácido Esteárico	0,23	0,33	0,44	0,07
Ácido Oléico	1,32	1,58	1,74	0,18
Ácido Linoléico	0,37	0,09	0,35	0,47
Ácido Araquídico	0	0	0	0,40
Colesterol	0,11	0	0,40	0
Total	310	290	420	240

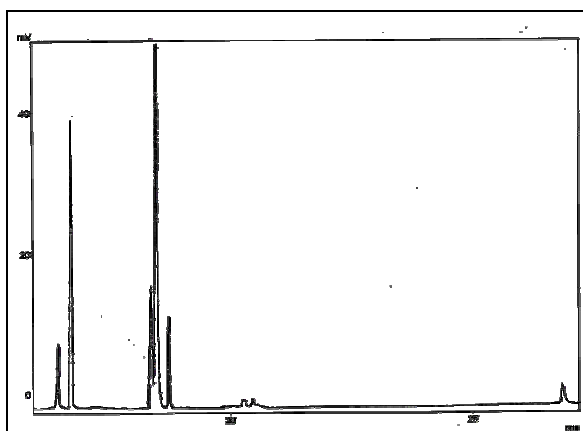
A análise da composição em ácidos graxos liberados na hidrólise do efluente com a enzima LKM foi completamente diferente daquele constatado pela ação da enzima LCR. Fato esse verificado pela redução significativa de 57,14% do teor total de gordura no efluente, refletindo no enriquecimento da fração com os ácidos linoléico (100%), palmítico (34,80%) e esteárico (15,3%). Outros ácidos como pentadecanóico, palmitoléico e colesterol não foram liberados para o meio reacional, demonstrando com isto uma resistência à hidrólise pela enzima LKM. A composição dos ácidos graxos identificados por cromatografia fase gasosa é mostrada nas Figuras 4.16 e 4.17.

Paralelamente foram realizados mais dois tratamentos do efluente com a enzima LKM alterando as condições experimentais citadas anteriormente, basicamente foi verificada a influência do agente emulsificante e do íon cálcio em meio alcalinizado, na liberação de ácidos graxos livres. A composição dos ácidos graxos liberados nesses testes está mostrada na Tabela 4.21 e nas Figuras 4.18 a 4.21.

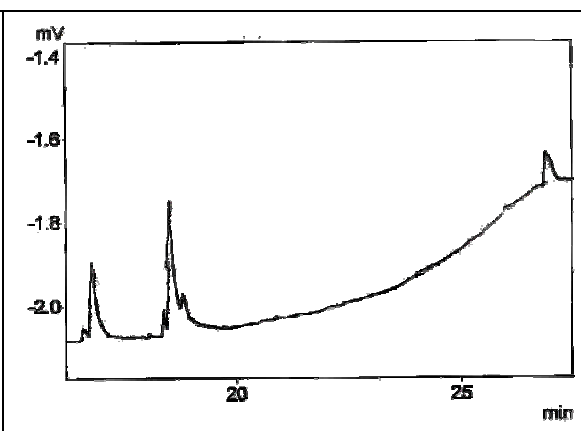
**Tabela 4.21.** Composição dos ácidos graxos livres liberados na hidrólise do efluente com a LKM com ajuste de pH: Influência do agente emulsificante e do íon cálcio

Composição	Presença de cálcio e ausência do agente emulsificante (g/L)		Ausência de cálcio e presença de agente emulsificante (g/L)	
	0 h	12 h	0 h	12 h
Ácido Palmítico	2,83	2,10	2,52	2,73
Ácido Palmitoléico	0,37	0,12	0,37	0,31
Ácido Estearico	0,80	0,90	1,21	0,62
Ácido Oléico	3,33	1,62	3,90	2,64
Ácido Linoléico	0,24	0,25	0,71	0
Colesterol	0,13	0	1,09	0
Total	770	500	940	630

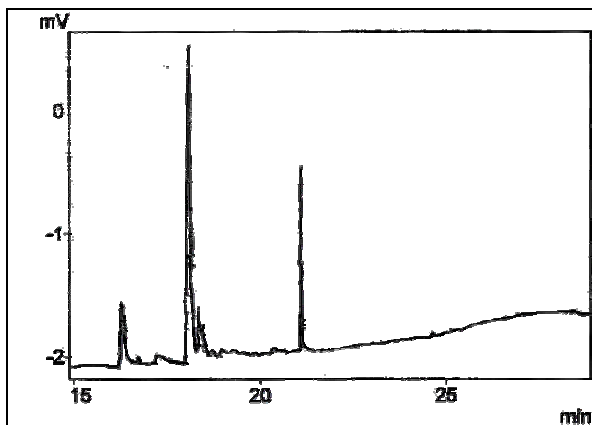
No teste efetuado na presença de cálcio e ausência de agente emulsificante, o perfil de formação de ácidos graxos foi alterado promovendo um melhor enriquecimento da fração com os ácidos: oleico (51,35%), palmítico (74,20%), palmitoléico (57%) e 100% dos ácidos estearico e linoleico. Entretanto, nessas condições experimentais foi constatada uma menor redução do teor de gorduras de 27%, quando comparado com o resultado apresentado na Tabela 4.20 da ordem de 57%. Esse perfil pode ser verificado nos cromatogramas apresentados nas Figuras 4.18 e 4.19.



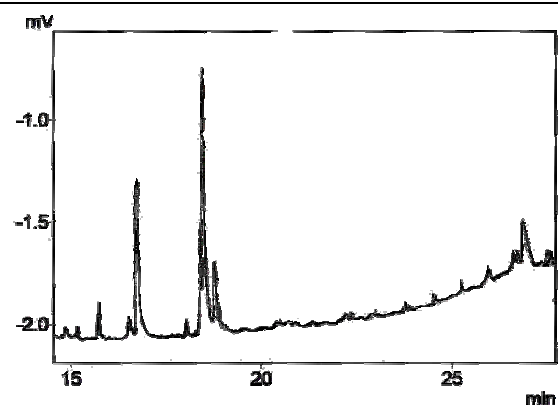
**Figura 4.14.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado com LCR ( $t = 0$  h).



**Figura 4.15.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LCR ( $t = 12$  h).



**Figura 4.16.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente, utilizando LKM ( $t = 0h$ )..

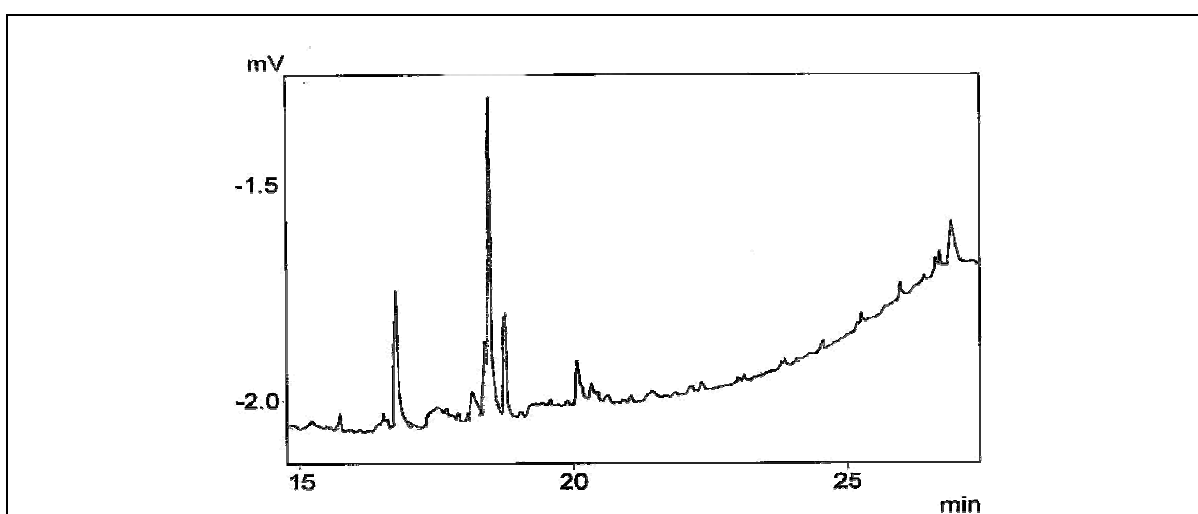


**Figura 4.17.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM ( $t = 12 h$ ).

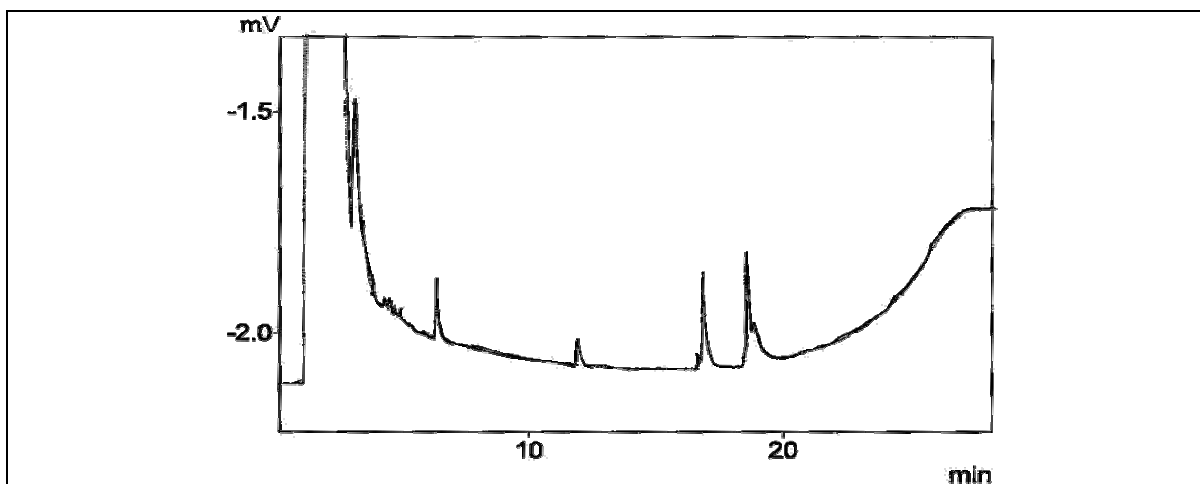
No teste efetuado na ausência de cálcio e presença de agente emulsificante, a enzima LKM demonstrou um desempenho bastante similar, com exceção do ácido linoléico que não foi liberado para o meio reacional. Os cromatogramas referentes a esse teste são mostrados nas Figuras 4.20 e 4.21.

De uma maneira geral, a lipase de *C. rugosa* (LCR) liberou preferencialmente o ácido oléico (18:1) seguido dos ácidos esteárico (18:0) e palmitoléico (16:1). Resultados similares foram descritos por LEE E FOGLIA (2000).

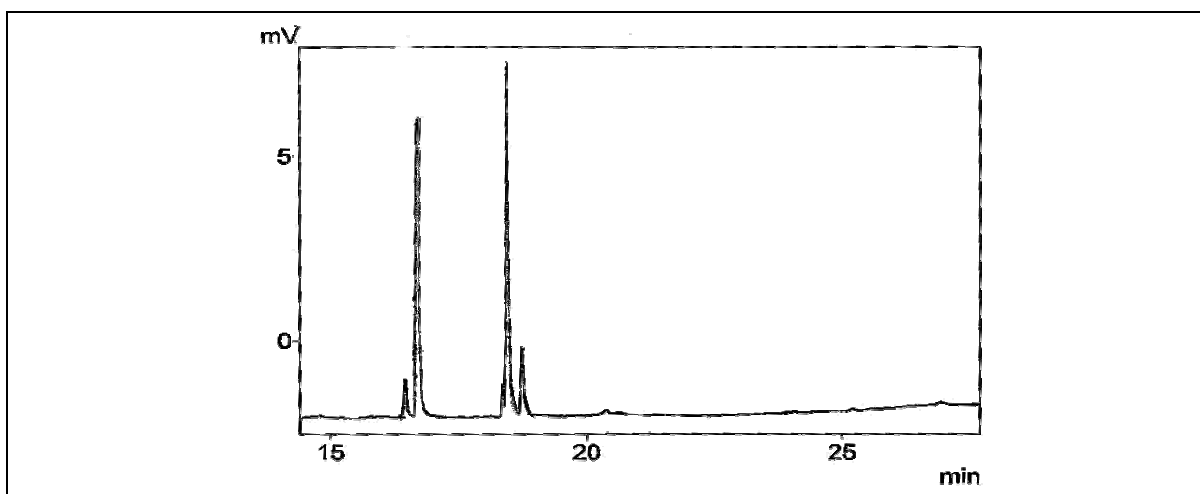
Por outro lado, os ácidos linoléico (18:2), esteárico (18:0), oléico (18:1) e palmítico (16:0) foram liberados preferencialmente pela enzima LKM seguido por outros ácidos em menor proporção.



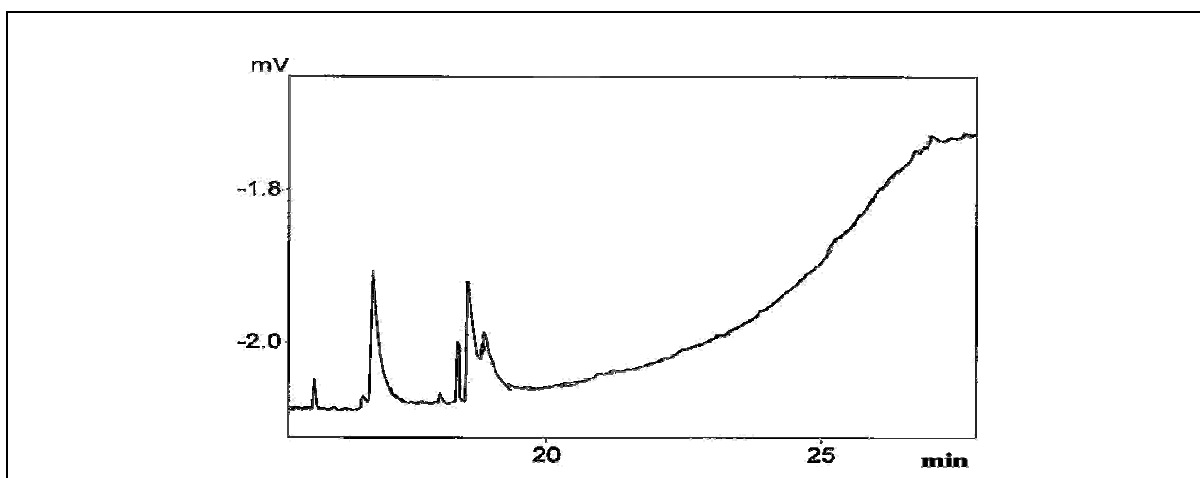
**Figura 4.18.** Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na presença de cálcio e ausência de agente emulsificante ( $t = 0 h$ ).



*Figura 4.19. Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na presença de cálcio e ausência de agente emulsificante (t=12 h).*



*Figura 4.20. Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na ausência de cálcio e presença de agente emulsificante (t= 0 h).*



*Figura 4.21. Composição de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente com a lipase LKM na ausência de cálcio e presença de agente emulsificante (t=12h).*



#### **4.6. TRATAMENTO ANAERÓBIO DO EFLUENTE**

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente de fossa séptica (cedido pela SANEPAR) e apresentou as seguintes características: valores médios de sólidos voláteis de 32,1 g/L, sólidos totais de 75,7 g/L e demanda química de oxigênio de 864 mg de O<sub>2</sub>/L.

##### **4.6.1. Operação com Efluente Bruto**

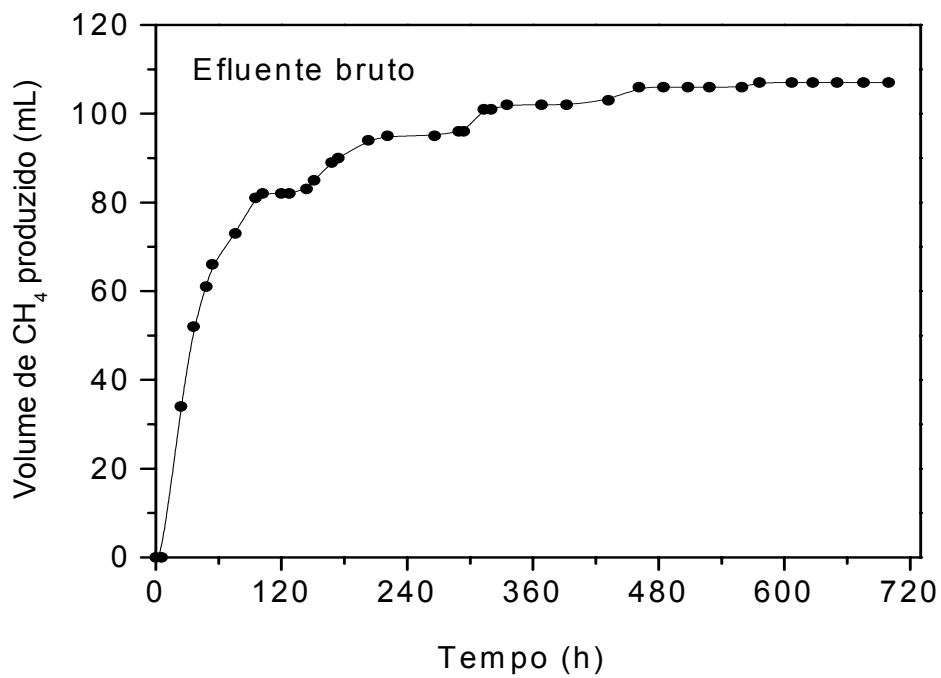
O efluente bruto caracterizado no item 4.2 apresentou uma carga orgânica na faixa de 2,0 a 5,0 g de O<sub>2</sub>/ L de DQO, seguindo as normas recomendadas por SOARES e HIRATA (1997).

O tempo de duração dos testes de biodegradabilidade foi de 30 dias e neste período foi medida a produção de metano pelo deslocamento de hidróxido de sódio 5%. Para minimizar os erros experimentais todos os testes foram realizados em duplicata, com exceção do teste realizado somente com o efluente bruto.

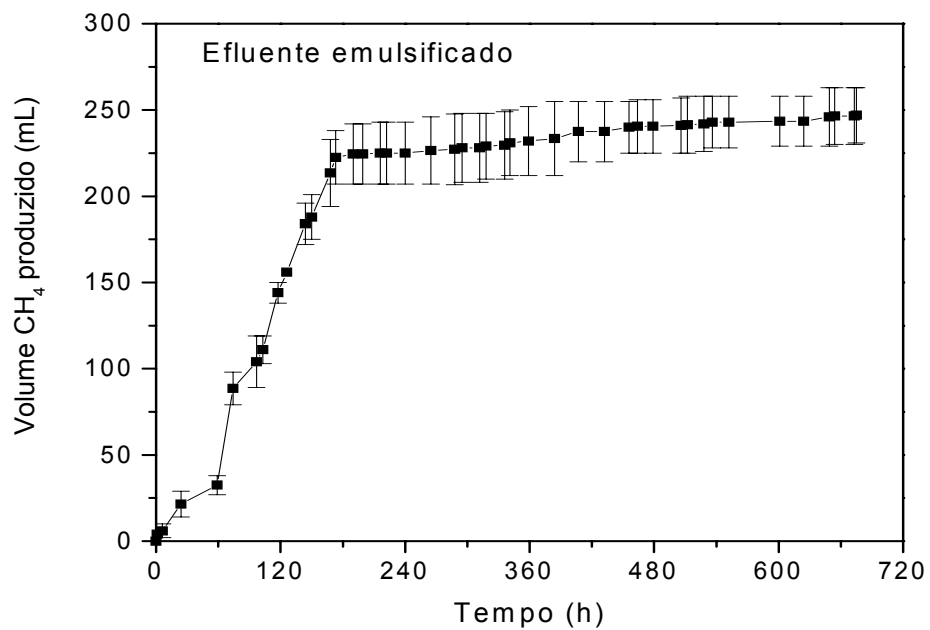
Os dados obtidos da quantidade de metano produzido em função do tempo para o efluente sem tratamento enzimático são apresentados na Figura 4.22, sendo verificado um acúmulo máximo de metano de aproximadamente 107mL. Os dados experimentais são detalhados no Apêndice 8.11. Nota-se uma redução da velocidade de produção de metano durante a realização do experimento sendo que, após aproximadamente 400h, não há mais produção de metano, mesmo havendo DQO residual. Esta parada de produção de metano pode estar relacionada com a falta de algum nutriente, algum tipo de inibição ou a incapacidade dos microrganismos em hidrolisar as gorduras presentes no efluente.

Paralelamente, foi ainda realizado um teste de biodegradabilidade do efluente emulsificado com objetivo de verificar se a goma arábica poderia exercer algum tipo de inibição ou interferência na biodigestão, uma vez que agentes emulsificantes foram usados na etapa de hidrólise.

Como pode ser observada na Figura 4.23, a goma arábica beneficiou a produção de metano durante os 30 dias de teste, gerando um volume de biogás acumulado de 247 ± 16mL. Constata-se uma velocidade constante de degradação da matéria orgânica até aproximadamente 180h quando o processo é inibido, uma vez que foi detectada ainda a presença de DQO residual. Porém, esta quantidade de metano pode ser devido à carga orgânica prontamente assimilável introduzida com a goma arábica, pois há em sua composição açúcares e proteínas.



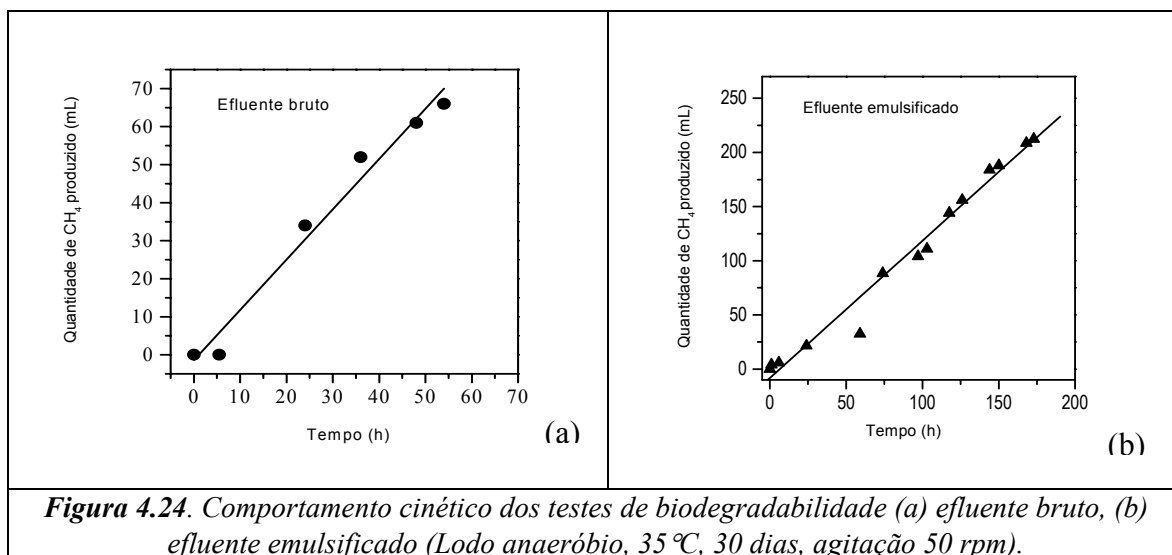
**Figura 4.22.** Cinética de produção de metano do efluente bruto em função do tempo (Lodo anaeróbio, 35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm)



**Figura 4.23.** Cinética de produção de metano do efluente bruto emulsificado e lodo anaeróbio em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).

Foi também calculado o parâmetro cinético da curva de biodegradação, medindo-se a velocidade inicial de produção de metano. A biodegradabilidade do efluente pode ser relacionada aos valores dos parâmetros cinéticos, desde que as mesmas condições experimentais sejam mantidas. Assim, quanto maior for o valor da velocidade inicial de produção de metano, mais biodegradável será o substrato.

Na Figura 4.24 as curvas ajustadas para a biodegradação do efluente bruto e emulsificado em função do tempo são mostradas, das quais foram determinadas as velocidades iniciais de produção de metano, sendo 1,40mL/h para o efluente bruto e 1,16mL/h para efluente emulsificado. Observa-se que houve um decréscimo de 17,1% na velocidade inicial de produção de metano, quando se utilizou efluente emulsificado.

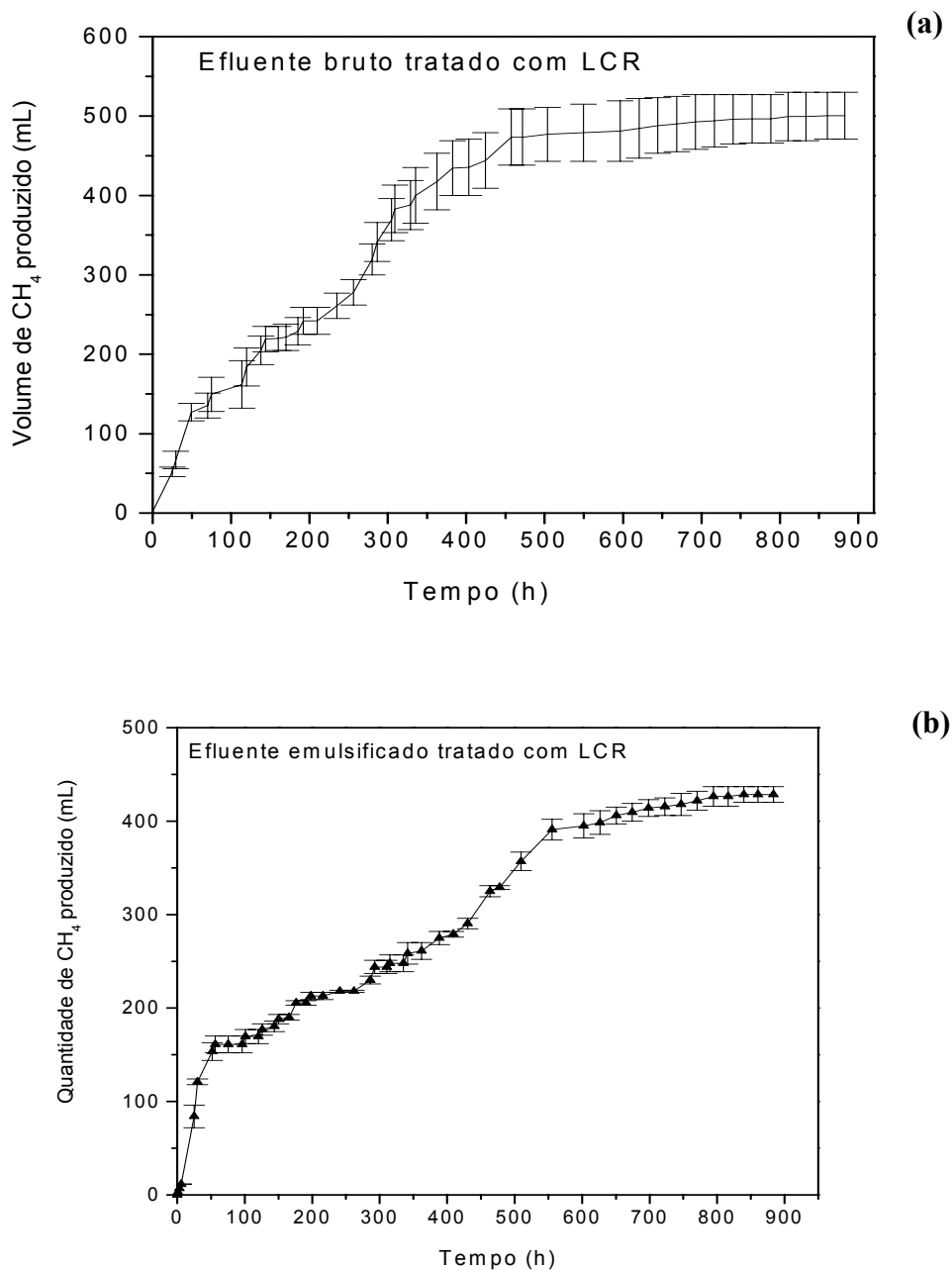


Em função dos erros experimentais foram obtidos valores de velocidades iniciais tanto para os ensaios com efluente bruto como para o efluente emulsificado, indicando que os resultados de remoção de substrato ao longo do tempo para os dois ensaios foram semelhantes, apesar de apresentarem diferentes DQO, fato este devido à presença do agente emulsificante no efluente.

#### 4.6.2. Testes de Biodegradabilidade do Efluente Hidrolisado com a Enzima LCR

A eficiência do pré-tratamento com a enzima LCR em termos de biodegradabilidade foi verificada em efluentes hidrolisados nas condições otimizadas por meio do planejamento fatorial completo (0,4% de lipase, 3% de agente emulsificante e pH

= 7,0). Considerando, entretanto, que a presença de goma arábica no meio reacional pode interferir na velocidade de biodegradação, foram também efetuados testes de biodegradação dos efluentes hidrolisados nas mesmas condições ótimas, entretanto, sem a adição do agente emulsificante. O volume de metano produzido em função do tempo está representado na Figura 4.25 (a, b).



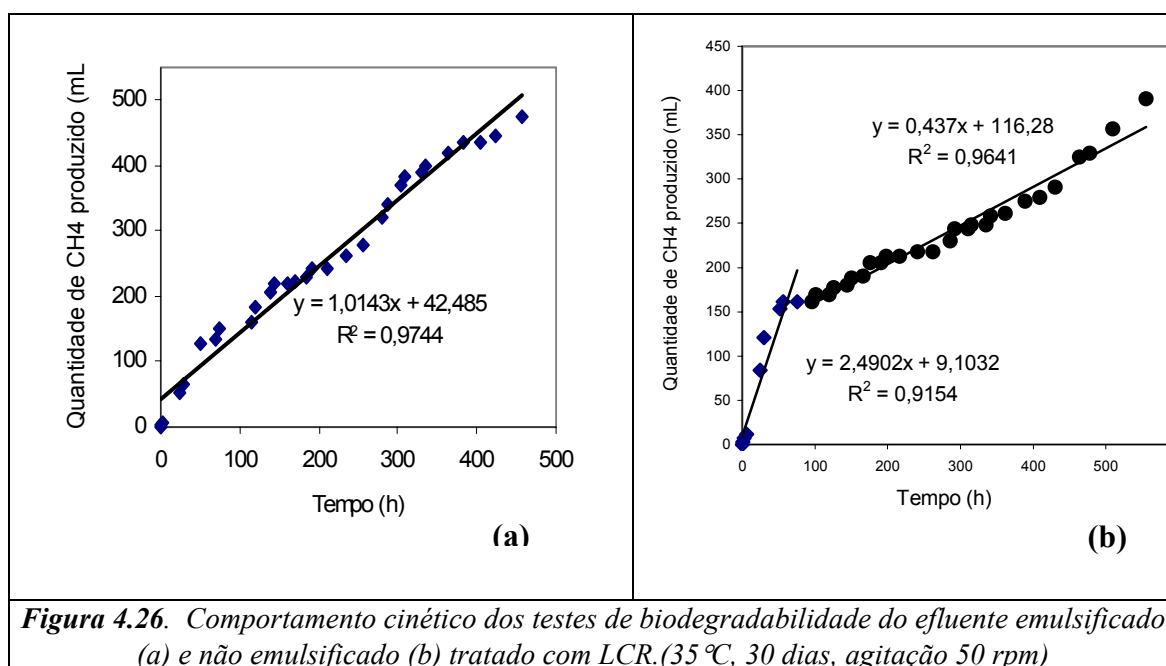
**Figura 4.25.** Cinética de produção de metano do efluente não emulsificado (a) e emulsificado (b) tratado com LCR em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).

Para o efluente emulsificado tratado com LCR a quantidade de metano produzido foi de  $428 \pm 8,5\text{mL}$  (Figura 4.25a), o que representa um aumento de 4 vezes do volume de biogás gerado em relação ao teste de biodegradabilidade do efluente bruto (sem tratamento, Figura 4.22). No efluente não emulsificado e tratado enzimaticamente (Figura 4.25b), a quantidade máxima de metano atingiu  $500 \pm 29,5\text{mL}$ , correspondendo a um aumento de 4,7 vezes em relação ao efluente sem tratamento.

Estes resultados foram também avaliados, correlacionando com o perfil cinético da quantidade de metano produzido em função do tempo, como mostrado na Figura 4.26.

Foram determinadas duas velocidades de produção de metano, sendo que nas primeiras horas obteve-se o valor de  $2,5\text{mL/h}$ , porém no decorrer do ensaio até 600h o valor da velocidade foi de  $0,44\text{mL/h}$ .

Esse comportamento não foi verificado no testes de biodegradabilidade do efluente tratado na ausência de goma arábica, sendo determinado um valor da velocidade inicial de  $1,01\text{mL/h}$ .



Nos dois casos, a utilização do pré-tratamento enzimático aumentou a biodegradabilidade do efluente em aproximadamente 4 vezes. Pode-se concluir, também, que a parada da biodegradação, observada nos testes anteriores (Figuras 4.22 e 4.23) não é devido à falta de nutrientes, nem à inibição, mas está relacionada à matéria orgânica prontamente assimilável pelo microrganismo, que foi gerada no pré-tratamento enzimático.

### **4.6.3. Testes de Biodegradabilidade do Efluente Hidrolisado com a Enzima LKM**

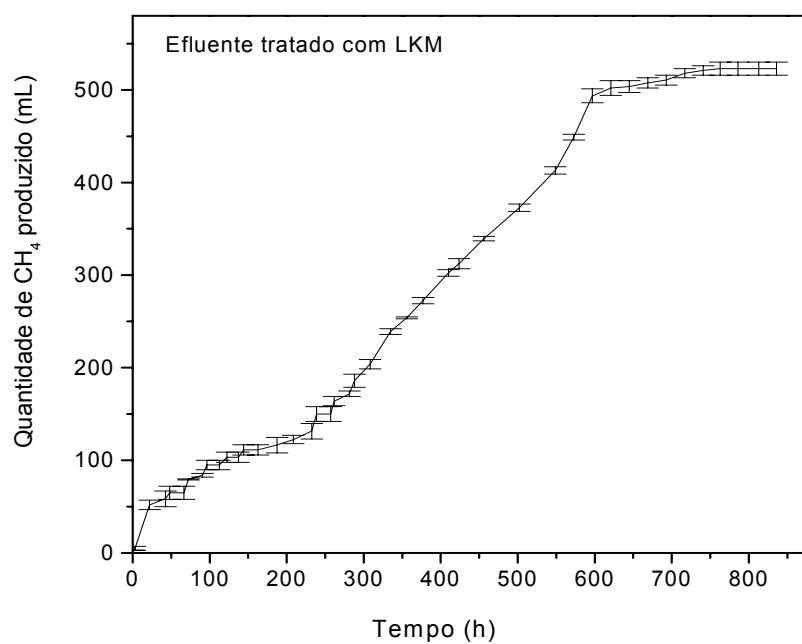
Testes de biodegradabilidade foram também conduzidos com o efluente tratado com a lipase LKM. O perfil de quantidade de metano produzido ao longo do tempo é representado na Figura 4.27, sendo que os dados experimentais detalhados são mostrados no Apêndice 8.12. Os experimentos foram conduzidos na ausência de cálcio e de goma arábica, e o ajuste do pH em 8,0 do hidrolisado foi feito com hidróxido de sódio.

A cinética de produção de metano foi distinta nos dois experimentos, porém a quantidade de metano acumulada foi de aproximadamente 500mL para os dois experimentos.

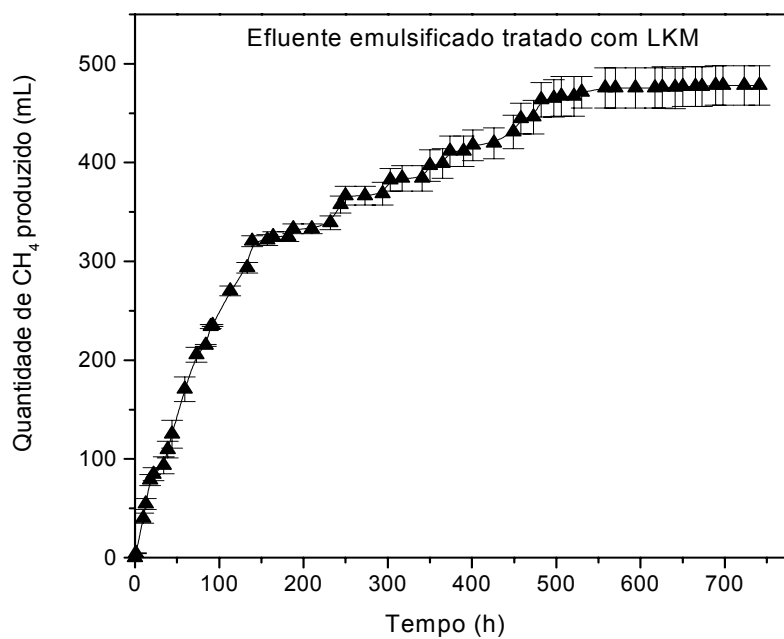
Em ambos os casos há uma inibição que impede a degradação de matéria orgânica depois de aproximadamente 600h, onde ainda há DQO residual. A adição de emulsificante aumenta a velocidade inicial de degradação anaeróbia, porém no contexto geral a quantidade degradada, bem como o tempo de degradação é semelhante.

A análise da cinética de produção de metano mostrada na Figura 4.28 indica que a velocidade inicial de produção de metano determinada na biodegradação do efluente emulsificado e tratado com LKM foram de 2,1mL/h nas primeiras 150h, caindo para 0,42 mL/h após 150h. Por outro lado, a velocidade de produção de metano determinada na biodigestão do efluente não emulsificado foi de 0,52mL/h para as primeiras 250h passando para 0,88mL/h após esse tempo, sugerindo que a velocidade de biodegradação ocorreu inicialmente de uma forma mais lenta em relação ao efluente emulsificado, porém em uma segunda etapa a velocidade de biodegradação ocorreu de forma mais rápida em relação ao efluente não emulsificado.

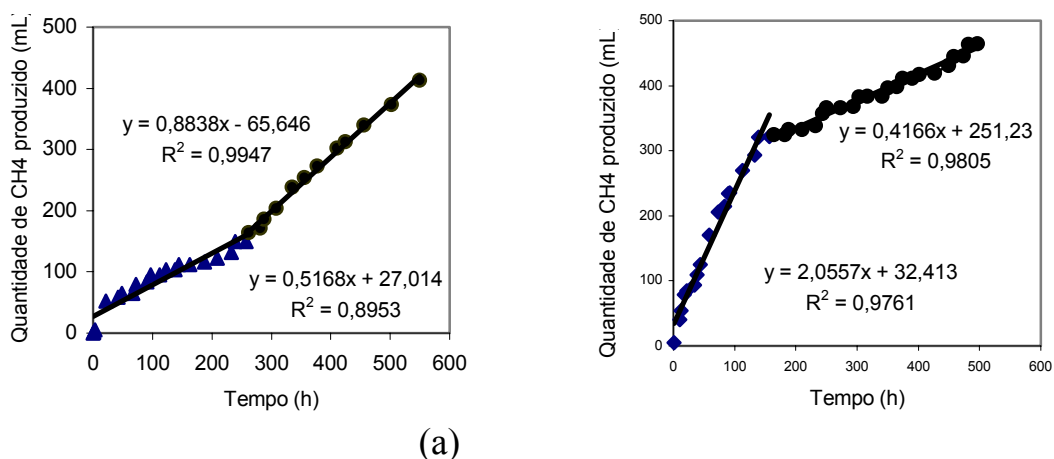
(a)



(b)



**Figura 4.27.** Cinética de produção de metano do efluente tratado com LKM - (a) efluente não emulsificado, (b) efluente emulsificado em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).



**Figura 4.28.** Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente não emulsificado (a) e emulsificado (b) tratado com LKM (35 °C, 30 dias, agitação de 50 rpm).

#### 4.7. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS PREPARAÇÕES DE LIPASES TESTADAS

Sumarizando os resultados obtidos no pré-tratamento com as enzimas LCR e LKM como mostrado na Tabela 4.22, verifica-se um benefício advindo da hidrólise enzimática para posterior tratamento anaeróbio.

**Tabela 4.22.** Volume de metano produzido no teste de biodegradabilidade do efluente bruto e tratado enzimaticamente

Efluente	Tratamento	CH <sub>4</sub> produzido (mL)	Variação do pH	
			0	30 dias
Bruto	Sem tratamento	107	6,60	7,13
Emulsificado	Sem tratamento	231	6,95	4,66
Não emulsificado	Hidrolisado LCR	500 ± 29	6,99	7,8
Emulsificado	Hidrolisado LCR	428 ± 8	7,15	4,92
Não emulsificado	Hidrolisado LKM	523 ± 7	8,12	8,30
Emulsificado	Hidrolisado LKM	478 ± 20	8,15	4,88

O tratamento enzimático foi bastante satisfatório para as lipases LCR e LKM, promovendo a hidrólise parcial dos lipídeos presentes no efluente bruto. A aplicação da lipase LKM na ausência de agente emulsificante resultou em uma produção de metano de 523mL e a aplicação da lipase LCR resultou na produção de metano de 500mL que podem ser considerados proporcional a DQO removida.

A goma arábica, apesar de ser eficaz na etapa de hidrólise e conter em sua composição açúcares e proteínas, em menor concentração, resulta numa pequena



diminuição na produção de metano. Nota-se que isto não aconteceu quando o efluente sem tratamento enzimático foi utilizado, onde a presença de goma beneficiou a produção de metano.

Em termos de eficiências ambas as preparações de lipase (LCR e LKM) demonstraram desempenho similar para emprego na etapa de pré-tratamento, entretanto em termos econômicos, a LKM oferece melhor custo/ benefício.

Em uma cotação realizada em dezembro 2003, a empresa Kin Master (RS) forneceu o valor de US\$ 275,87/ kg para a lipase pancreatina LKM o que corresponde a um valor 30 vezes inferior ao preço praticado pela distribuidora da lipase LCR (US\$ 3800,00/kg).

Mesmo assim, nas condições estabelecidas o uso da lipase LKM implicaria num alto custo por litro de efluente processado, e, portanto, uma redução do custo da enzima poderia facilitar a difusão do processo proposto no setor industrial. Desse modo, foram feitas pesquisas no mercado nacional com o objetivo de encontrar uma outra preparação enzimática que oferecesse uma melhor relação custo/benefício para sua aplicação no tratamento enzimático.

#### **4.8. DESEMPENHO DA LIPASE PANCREATINA LNU NA HIDRÓLISE E NA BIODEGRADABILIDADE DE EFLUENTES PROVENIENTES DE INDÚSTRIAS AVÍCOLAS**

Na busca efetuada foi verificada que a empresa Nuclear, uma indústria brasileira de distribuição de material de consumo, também comercializa uma preparação de lipase pancreática num custo quatro vezes inferior ao praticado pela empresa Kin Master, ou seja, US\$ 68,75/kg, tornando atraente sua aplicação no tratamento enzimático do efluente.

Desta forma, foram realizados experimentos de hidrólise nas mesmas condições utilizadas para a enzima LKM e em seguida avaliado o impacto do tratamento enzimático no efluente, por meio dos testes de biodegradabilidade.

Uma etapa de caracterização preliminar desta preparação comercial foi necessária, tendo em vista que não foram fornecidos valores de atividade pelo fabricante. Desta forma, as propriedades bioquímicas e cinéticas dessa preparação foram determinadas de acordo com a metodologia previamente descrita no item 3.7 (Tabela 4.4, Apêndice 8.3 a 8.5).

Para efetuar a hidrólise enzimática do efluente foram adotadas as seguintes condições: concentração de lipase (0,4% m/v), agente emulsificante (presença e ausência) e ajuste de pH em 8,0 com NaOH 1M, cujos resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.23.

**Tabela 4.23.** Caracterização do efluente hidrolisado pela enzima LNU na presença e ausência de agente emulsificante

Emulsificante	Glicerol (%)		Ácidos Graxos (mM)		Hidrólise (%)
	0 h	12 h	0 h	12h	
Presença	0,34	0,89	34,50	72,64	25,18
Ausência	0,41	0,78	30,47	97,34	44,16

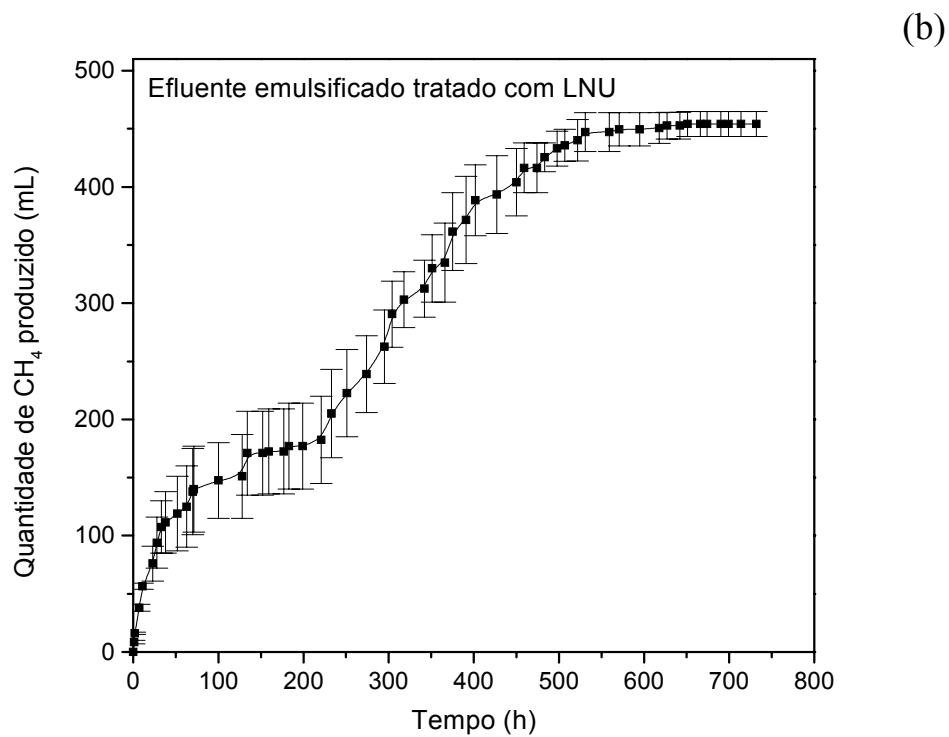
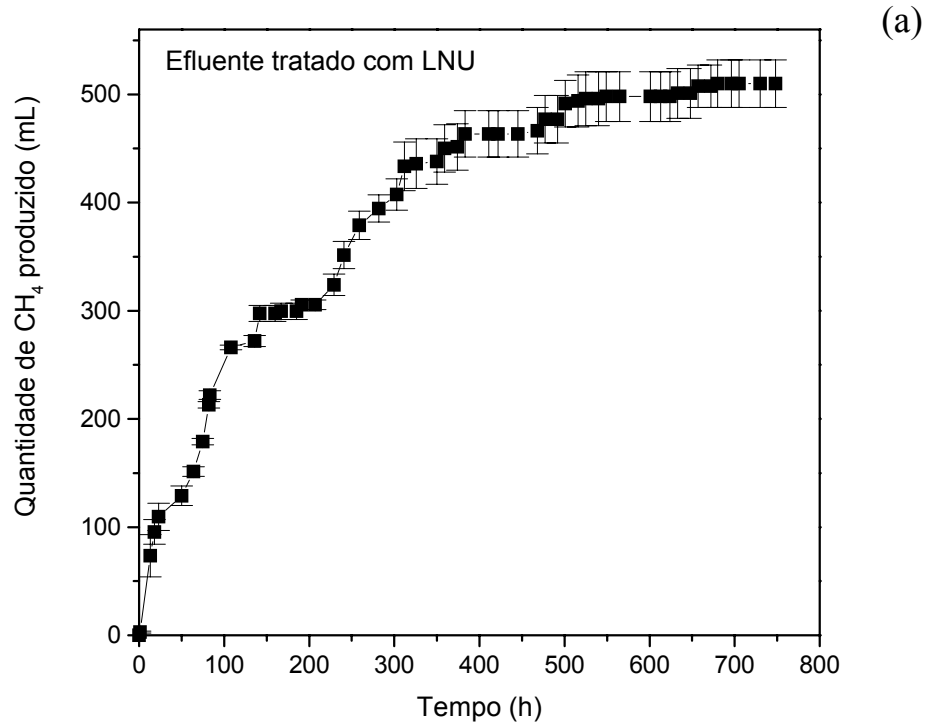
A digestão anaeróbia foi conduzida de acordo com o item 3.5. O processo de digestão foi avaliado pela quantidade de metano produzido na biodigestão (30 dias) e matéria orgânica (DQO). Na Tabela 4.24 e Figura 4.29 são mostrados os resultados obtidos na biodigestão em função do tempo de biodegradação.

**Tabela 4.24.** Tratamento anaeróbio do efluente pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU.

Efluente	CH <sub>4</sub> produzido (mL)	DQO (mg/L)	Variação do pH	
			0	30 dias
Não emulsificado e hidrolisado	510 ± 22,0	1950,00	8,10	8,47
Emulsificado e hidrolisado	454 ± 10,9	15328,6	8,05	4,80

Os resultados obtidos foram bastante similares aos obtidos pela ação da preparação enzimática LKM, tanto em termos de formação de ácidos graxos livres como na biodigestão dos efluentes hidrolisados.

Observa-se que para o efluente não emulsificado foi obtido um volume máximo de metano acumulado de 510 ± 22mL, valor bem similar ao alcançado pela enzima LKM (523 ± 7mL). A exemplo dos ensaios realizados anteriormente com as enzimas LCR e LKM, foi verificado que em meios emulsificados a quantidade de metano produzida foi reduzida em aproximadamente 10,9% (454 ± 10,9mL).



**Figura 4.29.** Cinética de produção de metano do efluente hidrolisado com a lipase LNU (a) efluente não emulsificado e (b) emulsificado em função do tempo (35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).

Os resultados indicam que a preparação de lipase LKM pode ser substituída com vantagens pela enzima LNU, tendo em vista que o custo de aplicação dessa enzima por litro de efluente tratado pode ser reduzida em 75%, tornando desta forma bem atraente tanto em termos técnicos, como econômico a adoção da metodologia proposta em escala industrial.

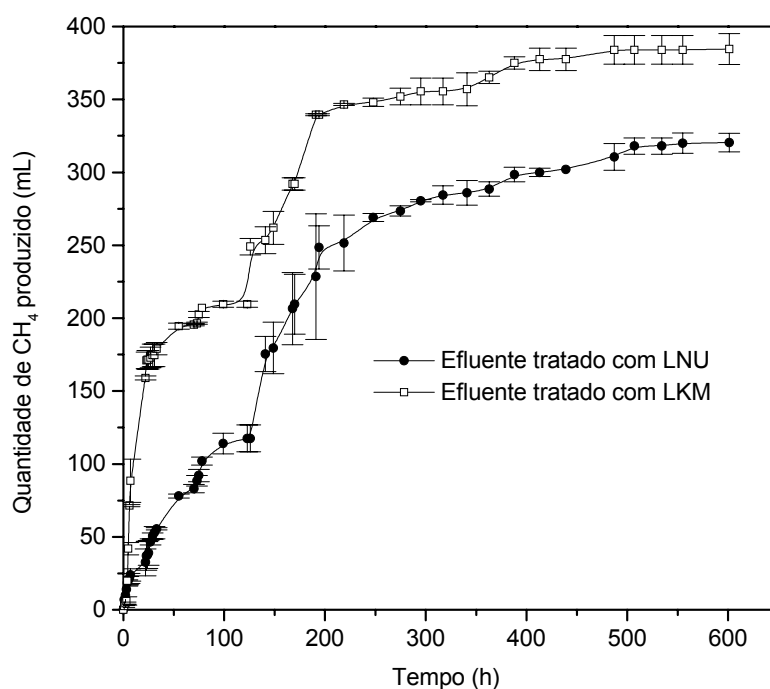
Para verificar se uma redução adicional no custo poderia ser efetuada, foram ainda realizados testes comparativos empregando menores concentrações das preparações LKM e LNU na etapa de hidrólise. Para tanto a concentração das preparações de enzimas foram reduzidas pela metade (0,4 para 0,2%). O objetivo deste teste foi verificar se uma menor concentração de lipase apresentaria o mesmo comportamento na hidrólise e na biodigestão. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.25 e Figura 4.30.

**Tabela 4.25.** Comparação do desempenho das lipases LKM e LNU (0,2%) na hidrólise e biodigestão do efluente de indústria avícola.

Lipases	Glicerol (%)		Ácidos Graxos (mM)		Hidrólise (%)	CH <sub>4</sub> produzido (mL)
	0 h	12 h	0 h	12h		
						30 dias
LKM	0,11	0,63	30,9	64,0	17,46	384,5
LNU	0,05	1,12	28,2	68,8	31,57	320,6

Conforme era esperado a redução da concentração de enzima na etapa de hidrólise afetou negativamente tanto a produção de ácidos graxos livres como a produção de gás metano, para ambas as preparações de enzima. Observa-se ainda que nos testes de biodegradabilidade, a produção de metano a partir do efluente tratado com LNU ( $320 \pm 6,3\text{mL}$ ) foi menor que a obtida para o efluente tratado com LKM ( $384 \pm 6,3\text{mL}$ ). Estudos adicionais são ainda necessários para estabelecer as condições otimizadas da ação da lipase LNU na hidrólise de efluentes contendo elevados teores de lipídeos. Conforme mencionado anteriormente, esta preparação de enzima só foi incorporada no âmbito deste trabalho na sua etapa final, não havendo disponibilidade de tempo para realizar um estudo detalhado de aplicação dessa preparação enzimática.

Por outro lado, os resultados obtidos indicam a potencialidade do uso da lipase comercializada pela empresa Nuclear para tratamento enzimático de efluentes de indústria avícolas.



**Figura 4.30.** Testes comparativos de biodegradabilidade utilizando as lipases LKM e LNU, numa concentração de 0,2% em função do tempo (Lodo anaeróbio, 35 °C, 30 dias, agitação 50 rpm).

#### 4.9. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Em termos de custo, a empresa Kin Master (RS) forneceu o valor de US\$ 276/ kg para a lipase pancreatina (LKM), o que corresponde a um valor de 15 vezes inferior ao preço praticado pela distribuidora da lipase LCR importada (Sigma). A empresa Nuclear forneceu o valor de US\$ 68/ kg para a pancreatina (LNU), correspondendo a um valor de 4 vezes inferior comparado com a LKM e 34 vezes inferior a LCR.

As preparações enzimáticas LKM e LNU fornecidas pelas empresas nacionais (Kin Máster/RS e Nuclear/SP) apresentam limitado grau de pureza, o que diminui seu custo e não interfere no processo. Além disso, a presença de enzimas contaminantes (proteases e amilases) mostrou ser benéfica ao processo, tendo em vista que o efluente de indústria avícola contém elevada concentração de lipídeos e proteínas.

De acordo com os resultados obtidos, a lipase pancreatina comercializada pela empresa Nuclear ofereceu a melhor relação custo/benefício, perfazendo um custo de US\$ 0,27 por litro de efluente tratado e num aumento de 4,2 vezes na remoção de matéria orgânica, em termos de demanda química de oxigênio (DQO), em relação ao efluente bruto (Tabela 6.26).

**Tabela 6.26** Remoção de DQO no tratamento anaeróbio do efluente bruto e pré-tratamento enzimaticamente, por um período de 30 dias.

<b>Enzima</b>	<b>Remoção DQO (%)</b>	<b>Biogás formado (mL)</b>	<b>Custo (US\$/L)*</b>
Sem adição	15,1	107	Não se aplica
LCR	28,0	500 ± 29	16,2
LKM	47,7	523 ± 7	1,08
LNU	62,0	510 ± 22,0	0,27

\*Custo da enzima por litro de efluente tratado

Cabe ressaltar que o efeito do pré-tratamento enzimático nos testes de biodegradabilidade pode também melhorar sensivelmente as condições operacionais dos reatores anaeróbios, bem como a qualidade do efluente tratado (menor teor de sólidos suspenso, menor turbidez). Além disso, a porcentagem de metano no biogás indica que este pode ser aproveitado como insumo energético e a hidrólise enzimática pode alterar a composição do biogás, tendo em vista uma maior atividade das bactérias metanogênicas.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal viabilizar tecnicamente a aplicação de um tratamento enzimático para a remoção de gorduras dos efluentes gerados por indústrias avícolas. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

1. Dentre as preparações de lipases disponíveis comercialmente e inicialmente testadas na hidrólise dos lipídeos presentes no efluente, a lipase pancreatina (LKM) fornecida pela empresa Kin Master (%H=18,8) de custo estimado em US\$ 275,87/kg foi a única que apresentou um desempenho bastante similar ao alcançado por uma preparação de lipase imobilizada comercializada pela Novozymes, sob a denominação de Lipozyme (%H=20,84). A lipase microbiana de *Candida rugosa* (LCR) comercializada pela Sigma apesar de seu custo (US\$ 3800,00/kg) apresentou-se como uma segunda alternativa, em função do desempenho satisfatório alcançado na hidrólise (13,20%).
2. As preparações de lipase selecionadas *Candida rugosa* (LCR) e lipase pancreatina (LKM) foram testadas na hidrólise do efluente (teor de gordura= 48,30 g/L) em regime de batelada simples, e a metodologia de planejamento experimental foi utilizada para otimizar as condições de hidrólise do efluente, considerando como variável resposta a porcentagem de hidrólise. Para cada preparação enzimática foi proposto um modelo matemático que representa a porcentagem máxima de hidrólise na região avaliada.
3. Para a *Candida rugosa* (LCR), o modelo matemático proposto, indicou que porcentagens de hidrólises mais elevadas (20,9%) podem ser obtidas em efluentes tamponados com fosfato de sódio (pH= 7; 0,1M) e empregando uma concentração de enzima de 0,4% (m/v) na presença de agente emulsificante (3% m/v). A substituição da solução de tampão fosfato para ajuste do pH ótimo de atuação da lipase por soluções alcalinizantes NaHCO<sub>3</sub> ou NaOH, resultaram em um aumento na porcentagem de hidrólise estimado em 50%, caracterizado pela formação de ácidos graxos e glicerol. Em termos de composição de ácidos graxos, a atuação da

lipase *Candida rugosa* (LCR) na hidrólise do efluente por 12h (%H=58,70) aumentou a concentração inicial de ácido esteárico em 70% e do ácido oléico em 100%. Houve também um acréscimo de 49% na concentração de ácido palmitoleico e de 24% de ácido linoleico, indicando um desprendimento preferencial desses ácidos do triglicerídeo.

4. Para a lipase pancreatina (LKM) o conjunto de dados obtidos indicou um comportamento distinto daquele obtido com a LCR, sendo que a preparação LKM forneceu valores superiores de porcentagem de hidrólise (72,08%) após 6h de tratamento. A análise estatística revelou que a variável concentração de enzima apresentou um efeito positivo enquanto a variável, ajuste do pH do meio por meio da adição de bicarbonato de sódio teve um efeito negativo. Fato esse não verificado quando foi efetuada a substituição da solução de bicarbonato de sódio por hidróxido de sódio, sugerindo uma influência marcante na hidrólise do efluente pela ação da LKM do tipo de solução alcalinizante usada para ajuste do pH do meio reacional. Neste caso específico é recomendado o ajuste do pH do efluente somente com solução de hidróxido de sódio. Nessas condições, o tratamento enzimático do efluente com LKM promoveu uma redução marcante do teor total de gorduras da ordem de 57,14% e resultou no enriquecimento da fração dos ácidos linoléico (100%), palmítico (34,80%) e esteárico (15,30%) no hidrolisado. O comportamento da concentração dos ácidos graxos no efluente hidrolisado foi também dependente da utilização de estabilizantes e ativadores da enzima, como por exemplo, goma arábica e íons cálcio, respectivamente. Na presença de cálcio e ausência de goma, o hidrolisado foi enriquecido pelos ácidos oléico (51,35%), palmítico (74,20%), palmitoleico (57%) e 100% dos ácidos esteárico e linoléico. Na ausência de cálcio e presença de goma, foi obtido um desempenho bastante similar, com exceção do ácido linoleico que não foi liberado para o meio reacional.
5. Uma terceira alternativa de preparação enzimática de custo extremamente reduzido (US\$ 68,96/kg), lipase pancreática comercializada pela empresa Nuclear, foi também testada para efetuar a hidrólise do efluente. Adotando as mesmas condições estabelecidas para a utilização da lipase pancreatina (LKM), foram obtidas porcentagens de hidrólise de 44,2%.



6. A eficiência do pré-tratamento enzimático do efluente pela ação das enzimas LCR, LKM e LNU foi avaliada por meio de testes de biodegradabilidade e revelou que independente da preparação enzimática utilizada, foi obtido um aumento de aproximadamente 4 vezes do volume de gás metano produzido a partir dos efluentes tratados enzimaticamente em relação ao efluente bruto. Esses dados indicam que a estratégia proposta foi eficiente e pode conduzir a uma redução de matéria orgânica de aproximadamente 45% na digestão anaeróbia de águas residuárias geradas em indústrias avícolas.
7. A análise do comportamento cinético da biodegradação utilizando as preparações de lipases LCR, LKM e LNU indicou uma redução da velocidade de produção de metano, sendo que após o tempo de 400h a geração de metano foi cessada, mesmo havendo matéria orgânica residual (DQO). Tal fato pode estar relacionado à falta de algum nutriente ou presença de tipo de inibidor ou ainda a incapacidade dos microrganismos em hidrolisar as gorduras presentes no efluente.
8. A utilização de goma arábica na etapa de hidrólise enzimática, apesar de aumentar a liberação de ácidos graxos livres resultou numa pequena redução na produção de metano. Por outro lado, isto não foi observado quando o teste de biodegradabilidade foi efetuado com efluente emulsificado sem tratamento enzimático (controle), no qual a presença de goma arábica beneficiou a produção de metano, aumentando 2 vezes o volume de metano gerado em relação ao efluente bruto.
9. Entre as três preparações enzimáticas testadas, a lipase pancreatina comercializada pela empresa Nuclear ofereceu a melhor relação custo/benefício, perfazendo um custo operacional de US\$ 0,27 por litro de efluente tratado e num aumento da produção acumulativa de gás metano de 107 mL (efluente bruto) para  $510 \pm 22$  mL.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes etapas:

1. Verificar as condições que maximizam a hidrólise do efluente de indústrias avícolas empregando a lipase pancreática comercializada pela empresa Nuclear, adotando a metodologia de planejamento fatorial, determinando a influência da utilização do cloreto de sódio como estabilizante da enzima e de baixas concentrações de enzima (<0,4 %) no grau de hidrólise alcançado.
2. Realizar ensaios de estabilidade térmica das enzimas em presença do efluente bruto.
3. Testar a possibilidade de conduzir as etapas de hidrólise e biodigestão simultaneamente.
4. Verificar a possibilidade de aplicação dessa preparação enzimática na redução dos teores de lipídeos presentes em outros tipos de águas residuárias, como as geradas em indústrias de produtos lácteos, matadouros entre outras.
5. Testar industrialmente a eficiência do processo proposto.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADACHI, S., OUMURA, K., OTA, Y. MANKURA, M. (1993). Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentanoic and docosahexanoic acids in glycerides. *Journal Fermentation Bioengineering*, v. 75, p. 259-264.

AITKEN, M. D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: Opportunities and obstacles, *The Chemical Engineering Journal*, v.52, p. 49-58.

ALVES, M. M; VIEIRA, J. A. M.; PEREIRA, R. M. A.; PEREIRA, M. A.; MOTA, M. (2001). Effect of lipids and oleic acid on biomass. Development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. *Water Research*, 35, 1, p. 255-263.

AMANTE, E.R., CASTILHO JR, A.B., KANZAWA, A, ENSSLIN, L., MURAKI, M. (1999). Um panorama da tecnologia limpa na indústria de frangos. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, SBCTA*, v. 33 (1), p. 16-21.

APHA, AWWA, WPCF (1995). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19<sup>th</sup> edition, New York.

BALCÃO, V.M; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. (1996). Bioreactors with lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416.

BALCÃO, V. M., MALCATA, F.X. (1998). Lipase catalyzed modification of milkfat, *Biotechnology Advances* v.16, p. 309-341.

BARROS, F.G, NERY, V. D., DAMIANOVIC, M. H. R. Z., GIANOTTI, E. P. (2000). Modificação da população microbiana de uma lagoa facultativa tratando efluente líquido de abatedouro de frango. *Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária Ambiental*, p. 1-6, ABES.

BARROS NETTO, N. B.; SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. (1995). *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 1<sup>a</sup>. Edição, Campinas, Editora da UNICAMP, 299 p.

BENZONANA, G., DESNUELLE, P. (1958). Action of some effects on hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase, *Biochimica et Biophysica Acta*, v.164 (1), p. 47.

BEVILAQUA, J.V., CAMMAROTA, FREIRE, D. M. G., SANT'ANNA JR, G. L. (2000). Utilização de tirosinase no tratamento de efluente fenólico, *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (CD ROM)*, Águas de São Pedro, Brasil.

BILYK, A., BISTILINE JR., R. G., HAAS, M. J., FEAIRHELLER, S.H. (1991). Lipase-catalyzed triglyceride hydrolysis in organic solvent *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 68 (5), p. 320-323.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. (1978). In: *Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building*, New. York: Wiley & Sons Inc. 653p.

BOLETIM INFORMATIVO KIN MASTER (2000). *Características da pancreatina 6NF*, Passo Fundo/RS.

BON, E.P.S., PEREIRA, N. (1999). *Tecnologia Enzimática*, Editado pelo ENZITEC, pp.113.

BRADFORD, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

BRANCO, S. M.; HESS, M. L., (1975). Tratamento de resíduos. In: *Tópicos de Microbiologia Industrial*, EDUSP, v.2, p. 47-76.

BRANDIMARTE, A.L. (1999). Crise da água: modismo, futurologia ou uma questão atual? *Revista Ciência Hoje*, n. 26, p. 36-42.

BROCKMAN, H. L. (1984). General features of lypolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches, in "*Lipases*", edited by B. Borgstrom and H.L. Brockman, Elsevier, Amsterdam, p. 3-46.

BUEHLER, M. E.; WANDREY, C. (1987). Enzymatic fat splitting, *Fat Science Technology*, v. 89, p. 156-164.

CAMAROTA, M. C., TEIXEIRA. G. A., FREIRE, D. M. G. (2001). Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1591-1595.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. (1995). Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, v. 16, p. 544-554.

CHANG, R.C., CHON, S-J, SHAW, J-F. (1994). Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.19, p. 93-97.

CHERNICHARO, C. A. L. (1997). Princípios de tratamento biológico de águas residuárias. v. 5, Reatores Anaeróbios, DESA/UFMG.

COCKS, L.V., VAN REDE, C. (1966). In: *Laboratory handbook for oils and fats analysis*, 1<sup>st</sup> ed., Academy Press, London.

CONAMA (1986), *Conselho Nacional do Meio Ambiente*, “Resolução nº 20 de 18/06/1986”, Diário Oficial da União. 30 de julho de 1986.

COOKSON JR, J.T (1995). *Bioremediation Engineering – Design and Application*. McGraw-Hill Inc., EUA. 524 p.

COSTA, S. A. (2002). Catalase para remoção de peróxido de hidrogênio dos banhos de branqueamento. *Tese de Doutorado*, Departamento de Engenharia Têxtil, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal, 134p.

CRAVEIRO, A. M. (1994). Desempenho e estudos cinéticos de biogestores híbridos com diferentes porcentagens de enchimento. *Tese de Doutorado*. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 246 p.

D’ANNIBALE, A., STAZI, S.R., VINCIGUERRA, V., DI MATTIA, E., SERMANI, G.G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment, *Process Biochemistry*, v. 34, p. 697-706.

DE FELICE, B., PONTECORVO, G., CARFAGNA, M. (1997). Degradation of waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*, *Acta Biotechnology*, v.17 (3), p. 231-239.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 75-80.

ERDMANN, H., VORDERWERLBECKE, T., SCHMID, R., KIESLICH, K. (1990). In *Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*, edited by L. Alberghing, R.D. Schmid and R. Verger, GBF. Monographs, Braunschweig Germany, v. 16, p. 425-428.

FABER, K., (1997), In: *Biotransformations in organic chemistry: A textbook*, 3a. ed., Cap. 1, 2 e 3, Berlin, Germany, Springer-Verlag.

FACIOLLI, N.L., GONÇALVES, L.A. (1998). Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui, *Química Nova*, v. 21, p.16-19.

FERNANDES, E. A. (2000). Impactos econômico e ambiental do aproveitamento de subprodutos avícolas. In: *Seminário Nordestino de Pecuária Pecuária Nordeste*, Fortaleza, Anais: v.2, p. 39-56.

FLORÊNCIO, M. L. (1999). Sistemas de tratamento anaeróbio. In: *IV Curso de Tratamento Biológico de Resíduos*. Florianópolis/SC, CBAB/MCT/CNPq, CPGENQ/UFSC, CDB. 24p.

FREEDMAN, B. (1995). *Environmental ecology – The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses*. 2a. ed. Academic Press. 606p.

FU, X., ZHU, X., GAO, K., DUANT, J. (1995). Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *Journal of American Oil Chemists Society*, v. 72 (5), p. 527-530,

FURTADO, M. (2002). Efluentes. *Revista Química e Derivados*, nº 402

GAN, Q., BAYKARA, F., RAHMAT, H., WEATHERLEY, L.R. (2000). Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system, *Catalysis Today*, v. 56, p. 179-190.

GANDHI, N.N. (1997). Application of lipases. Review. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v.74, p. 621-634.

GHOSH, S., BHATTACHARYYA, D. K. (1995). Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 72 (112), p.1541-1544.

GILBERT, J.E. (1993). *Pseudomonas* Lipases: Biochemical properties and molecular cloning- Review, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 634.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. (1995). Environmental applications. In: *Microbial Biotechnology*. Eds. W.H. Freeman & Co. N. York, p. 561-620.

GRAY, C.J., NARANG, J.S., BARKER, S.A. (1990). Immobilization of lipase from *Candida cylindraceae* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 12, p. 800-807.

GRIFFITHS, M. (1992). In: *Biotechnology for a clean environment*. Mike Griffiths Associates, The Pantilles, Ivy Lane, Working. Inglaterra. 19p.

GROSS, R. (1996). *Hidrólise enzimática de gorduras de origem animal*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 63p.

HANAKI, K.; MATSUO, T.; NAGASE, M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, p. 1591-1610.

HARALDSSON, G. G. (1991). The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. *Marine Lipids Biotechnology*, cap. 7, p. 337-352.

HU, W.C.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C.F. (2002). A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. *Process Biochemistry* v. 37, p.965–971.

HWU, C. S., VAN LIER, J.B., KULIK, Z. (1997). Feasibility of expanded granular sludge bed (EGSB) system the treatment of wastewaters containing long-chain fatty acids. In: *VIII Conference on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japan, v.3, p. 103-108.

JAEGER, K-E., REETZ, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403.

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W. (1994). Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Review*, v. 15, p. 29-63.

JENSEN, R.G., DEJONG, F.A., CLARK, R.M. (1983). Determination of lipase specificity, *Lipids*, v. 18 (3), p. 239-252.

JENSEN, R. G., GALLUZZO, D. R., BUSH, V. J. (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolase), *Biocatalysis*, v. 3, p. 307-316.

JESUS, P.C., JOÃO, J.J., SILVA, P.L.F., BURLIN, G., NASCIMENTO, M.G. (1997). Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipase e sua aplicação em síntese orgânica, *Química Nova*, v. 20 (6), p. 664-672.

JUNG, F. B.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. (2002). Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewater. *Biotechnology Letters*, v. 24, 21, p.1797-1802.

KARAM, J., NICELL, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical and Technology Biotechnology*, v.69, p.141-153.

KARLSSON, I. (1990). Carbon source for denitrification from precipitate sludge. In: Hahn, H.H., Klute, R. (Eds), *Chemical Water and Wastewater Treatment*. Springer, Berlin.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. (1998). Biotransformation with lipases, In: Rehm HJ, Pihler G., Stadler A., Kelly P.J.W. editors. *Biotechnology*, New York, 8:37-192.

KNEZEVIC, Z., MAVINIC, D.S., ANDERSON, B.C. (1995). Pilot scale evaluation of anaerobic codigestion of primary and pretreated waste activated sludge. *Water Environmental Research*, v. 67, p. 835-841.

KNEZEVIC, Z., MOJOVIC, L., ADNADJEVI, B. (1998). Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22 (4), p. 275-280.

LEAL, M.C.M.R. (2000). *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. Dissertação de Mestrado, COOPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA, G.L. (2000). Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduo da indústria de laticínios. In: *Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (CD ROM)*, Águas de São Pedro, Brasil.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA Jr., G. L. (2002). Hydrolytic enzymes as coadjutants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19 (2), p.175-180.

LEMA, J. M., MÉNDEZ, R., IZA, J. FERNANDEZPOLANCO, F. (1991). Chemical reactor engineering concepts in design and operation of anaerobic treatment processes, *Water Science and Technology*, v. 24 (8), p.79-86.

LEE, K.T., FOGLIA, T.A. (2000). Fractionation of chicken fat triacylglycerols: synthesis of structured lipids with immobilized lipases, *Journal of Food Science*, v.65 (5), p. 826-831.

LIE, E.; MOLIN, G. (1991). Conversion of low grade fats by biological means. In: Martin, A. M. (Ed.) *Bioconversion of waste materials to industrial products*. Elsevier Applied Science, New York, p. 401-416.



LIN, J.G., CHANG, C.N, CHANG, S.C. (1997). Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by alkaline solubilization. *Bioresource Technology*, v.62, p. 85-90.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. J. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v.53, p. 479-472.

MACÊDO, J.A.B. (2000). *Águas & Águas*. Editora Ortofarma, Juiz de Fora, MG.

MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C. (1985). Present and future applications of lipases, Review, *Biotechnology and Genetic Engineering*, v. 3, n. 9, p. 193-217.

MACRAE, A. R. (1983). Lipase catalyzed interesterification of oils and fats, *Journal of American Oils Chemists' Society*, v. 60, p. 291-294.

MACCARTY, P.L. (1982). One hundred years of anaerobic treatment. In: *International Symposium on Anaerobic Digestion, 2*, Travemünde. Proceedings, Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, p.3-22.

MAIA NETO, R. F. (1997). Água para o desenvolvimento sustentável. *Revista Técnica e Informativa do CPRM*, Rio de Janeiro, v.5 (90), p.21-32.

MALCATA, F.X., REYES, H.R., GARCIA, H.S., HILL JR, C.G., AMUNDSON, C.H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 67 (12), p. 890-910.

MALCATA, F.X. (1995). In: *Engineering of/ with lipases*. Nato ASI Series: Applied Sciences, v.317, 618p.

MALINA, J.F.B. (1992). Design of biological wastewater systems. In: *Seminários de Transferência de Tecnologia – Tratamento de esgotos*, Trabalhos apresentados, Rio de Janeiro: ABES/ Water Environment Federation, p.165-171.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. (2001). Testing of alkaline and enzymatic pretreatment for fat particles in slaughterhouses wastewater. *Bioresource Technology*, v.77 (2), p.145-155.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F. (2003). Biotratamento para redução do teor de lipídeos em efluentes das indústrias de produtos lácteos. In: *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações/ SINAIFERM*, 2003. Florianópolis/SC.

MORETTO, E., FETT, R. (1998). *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*, Ed. UFSC, 150p.

MONTEGGIA, L. O., BEAL, L L. (1994). Avaliação da biomassa anaeróbia baseada no teste de atividade metanogênica específica. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Florianópolis/SC – Anais: Rio de Janeiro/ABES, v.2, p. 19-25.

MONGKHOLTANARUK, W., DHARMISTHITI, S. (2002). Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 50, p. 101-105.

MOZAFFAR, Z., WEETE, J.D., DUE, R. (1994). Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 71 (1), p. 75-79.

MUKATAKA, S., KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, J. (1985). Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. *Journal of Fermentation Technology*, v.63 (5), p. 461-466.

NASCIMENTO, V. P., SALLE, C. T. P., MORAES, H. L.S., FALLAVENA, C.B., CANAL, C.W., SANTOS, L.R., RODRIGUES, L.B., LEÃO, J. A, PILOTTO, F., NEVES, N., NASCIMENTO, L.P. (2000). Qualidade microbiológica e prevalência de *Salmonella* no processo de tratamento de efluentes de abatedouros avícolas. *Simpósio sobre resíduos da produção avícola*, Concórdia, SC. *Anais*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 74 p.

NOVO NORDISK (1990). *Product information B-347b-GB*.

NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP (1995). A ação das enzimas, *Catálogo Informativo*, p.47.

NOVOZYMES (2001). *Product Sheet – Detergent/ 2001-04372-01*.

NOGUEIRA, C. (1999). *Revista Veja*, v. 32, n. 46, p. 154-156.

NUNES, F.G. (1998). Otimizando o processamento de aves. *Catálogo Brasileiro de Produtos e Serviços*, v. 8, p.106-119.

NURRY, S, PIÉRONI, G., RIVIERE, C., GARGONI, Y., BOIS, A., VERGER, R. (1987). Lipase kinetics at the triacylglycerol water interface using surface tension measurements. *Chemical Physical Lipids*, v.45, p. 270-370.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v. 29, p. 119-131.

PARK, Y. K., PASTORE, G. M., DEALMEIDA, M. M. (1988). Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. *Journal of American Oil Chemists' Society*. v. 65 (2), p. 252-254.

PAVLOSTATHIS, S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*. Oxford, v. 24 (8), p. 35-39.

PELED, N., KRENZ, M.C. (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. *Analytical Biochemistry*, v. 112 (2), p. 219-222.

PEREIRA, E B.; CASTRO, H.F. FURIGO JR, A (2002) Degradação de gorduras presentes em efluentes industriais de frigoríficos utilizando lipases. In: *XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, Natal-RN. COBEQ-2002. CD-ROM (6p).

PEREIRA, E. B.; MORAES, F.F.; CASTRO, H.F.; ZANIN, G. M. (2001). Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study of the free and the immobilized enzyme on porous chitosan beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91/93, p. 739-752.

PEREIRA, E.B. (1999). Lipase livre e imobilizada em quitosana: Caracterização e potencial de aplicação em reações de hidrólise e síntese. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, 128p.

PERLE, M., KIMCHIE, S., SHELEF, G. (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater, *Water Resource*, v. 29, p. 1549-1554.

PETRUY, R.; LETTINGA, G. (1997). Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource Technology*, v. 61, p. 141-149.

RAJAN, R. V., LIN, J. G., RAY, B. T. (1989). Low level chemical pretreatment for enhanced sludge solubilization, v. 61, p.1678-1683.

RAY, B.T., LIN, J. G., RAJAN, R.V. (1990). Low-level alkaline solubilization for enhanced anaerobic digestion. *Res. J. WPCF* v. 62, p. 81-87.

RIBEIRO, D. F. (1995). Influência do manejo de pré-abate e das operações de abate na qualidade e rendimento das carcaças. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v. 19 (223), p. 38-46.

ROBLES, A., LUCAS, R., CIENFUEGOS, G. A.(2000). Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 217-221.

ROCHA, J. M. S. (1999). *Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia*. Boletim de Biotecnologia, v. 5, p. 25.

ROSA, J. (1995). Programa de bioaumentação para aplicação em processos biológicos de tratamento de águas e resíduos orgânicos em geral, *Revista Nacional da Carne*, n.223, p.48-50.

ROCHA, J.M.S., GARCIA, F.A. P. (1992). Effect of AOT concentration on the colorimetric determination of free fatty acids in a reverse micellar system. *Biotechnology Techniques*, v. 6 (2), p. 131-132.

ROONEY, D., WEATHERLEY, L.R. (2001). The effect of reaction condition upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*, v.36, p. 947-953.

SALMINEN, E.; RINTALA, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 13-26

SARDA, L., DESNUELLE, D. (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters emulsion, *Biochimica et Biophysica*, v. 30, p. 513-521.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P.K; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. (1999). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, v. 77, p.101-115.

SAYED, S.K.I.; DE SEEUW, W. (1988a). The performance of a continuously operated flocculent sludge UASB reactor with slaughterhouse wastewater. *Biological Wastes*, v. 24, p. 199-212.

SAYED, S. K. I.; VAN DER ZANDEN, J., WIJFFELS, R.; LETTINGA, G. (1988b). Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater. *Biological Wastes*, v. 23, p. 117-142.

SOARES, H. M.; HIRATA, T. S. (1997). Práticas de laboratório. In: *Curso de Tratamento Biológico de Resíduos*. Florianópolis/SC. CBAB, MCT/ CNPq, CPGENQ/UFSC, CDB, p. 23.

SOARES, H. M. (1990). Digestão anaeróbia de efluentes de fábrica de cervejas e refrigerantes em reator tipo fluxo ascendente com manta de lodo (UASB). *Dissertação de Mestrado*. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

SOUBES, M. (1994). Microbiologia de la digestión anaerobia. In: *III Taller y Seminario Latino Americano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales*, 3, 1994, Montevideo/Uruguay. Proceedings. Montevideo: Graphis Ltda. Juan C. Gomez, p. 15-28.

SPEECE, R. E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, USA.

STARKENBURG, W. V. (1997). Anaerobic treatment of wastewater: state of the art. *Microbiology*, v. 66 (5), p. 588-596.

SYED RAHMATULLAH, M.S.K.; SHUKLA, V. K. S.; MUKHERJEE, K. D. (1994a).  $\gamma$ -linolenic acid concentrates from borage and evening primrose oil fatty acids via lipase-catalysed esterification, *Journal of American Oils Chemists' Society*, v.71, 563-567.

SYED RAHMATULLAH, M. S. K.; SHUKLA, V. K. S.; MUKHERJEE, K. D. (1994b). Enrichment of  $\gamma$ -linolenic acid from primrose oil and borage via lipase catalysed hydrolysis, *Journal of American Oils Chemists' Society*, v.71, 569-573.

TANTRAKULSIRI, J.; JEYASHOKE, K.; KRISANGKURA, K. (1997). Utilization of rice hull ash as support material for immobilization of *Candida cylindracea* lipase, *Journal of American Oils Chemists' Society*, v. 74 (2), p. 173-175.

TUR, M. Y.; HUANG, J. C. (1997). Treatment of phthalic waste by anaerobic hybrid reactor. *Journal of Environmental Engineering*, v. 123 (11), p. 1093-1099.

VASCONCELOS, Y.A. (2002). Purificação das águas. *Revista Pesquisa FAPESP*. N.75. p 65.

VAZOLLER, R.F.; GARCIA, M.A.R.; GARCIA, A. D.; CONCEIÇÃO NETO, J. (1989). Manual Técnico sobre Microbiologia de Lodos Ativados. *CETESB – Séries Anuais*, 22p.

VAZOLLER, R. F. (1996). Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável – *Microbiologia e Saneamento Ambiental. Biodiversidade: Oportunidade e Perspectivas Tecnológicas* – Campinas, SP, 1996, versão 3/2002.

VIRTO, M. D., AGUD, I., MONTERO, S., BLANCO, A., SOLOZABAL, R., LASCARAY, J.M., LLAMA, M. J., SERRA, J. L., LANDETA, L. C., RENOBALLES, M. (1995). Kinetic properties of soluble and immobilized *Candida rugosa* lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.50, p.127-136.

VOGEL, A.I. (1981). *Química Orgânica. Análise Orgânica Qualitativa*, 3 ed., RJ, Ao Livro Técnico e Científico, v. 1, 2, 3.

VULFSON, E. N. (1993). Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media, *Trends in Food Science and Technology*, v. 4, p. 209-215.

VULFSON, E. N. (1994). Industrial applications of lipases. In: Woolley, P. and Petersen, S. B. (eds). *Lipase: their structure, biochemistry and application*, Cambridge, Great Britain, Cambridge University Press, p. 271-280

WAKELIN, N. G.; FORSTER, C. F. (1997). An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 37-43.

WANG, Y.J., SHEU, J.Y., WANG, F.F., SHAW, J.F. (1988). Lipase catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, p. 628-633.

XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, I. A. (1996). Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *Journal of American Oils Chemists' Society*, 73 (1), p.115-120.

YAHYA, A.R. M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p. 438-450.

ZEIKUS, J. G. (1982). Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. In: *International Symposium on Anaerobic Digestion*, 2, 1982. Travemunde. Proceedings. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press B. V., p. 23-35.

ZUYI, L.; WARD, O. P. (1993). Lipase catalysed to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil alcoholysis using *Pseudomonas* sp lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 601-605.

## 8. APÊNDICES

### APÊNDICE 8.1. PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS: LIPOZYME E LIPOLASE

Microrganismo	<i>Lipozyme</i> ( <i>Mucor miehei</i> )	<i>Lipolase</i> ( <i>Humicola lanuginosa</i> )
Forma	Sólido, enzima imobilizada	Sólido, enzima livre
Suporte	Resina de troca iônica	-
Tamanho da partícula	300 – 600 µm	-
Porosidade	50 – 300 °Å	Granulado branco
Área superficial	200 m <sup>2</sup> /g	-
Concentração de água	10% (w/w)	-
Massa molecular	32.000 Da (SDS – PAGE)	NI
Ponto isoelétrico	4	NI
Especificidade para: Ácido graxo Glicerídeos Álcool	Ampla Posição 1,3 Primário – OH	Mono e diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres
pH ótimo	6-8	10-11
Temperatura de atuação	60-70°C	30-35
Atividade	24 BIU	100 KLU/g
Referência	CASTRO E ANDERSON, 1995	NOVOZYMES, 2001

Um (BIU) Batch Interesterification Unit (1 BIU) é definido como a incorporação de 1 mmol de ácido palmítico em trioleína por minuto sob condições padrões.

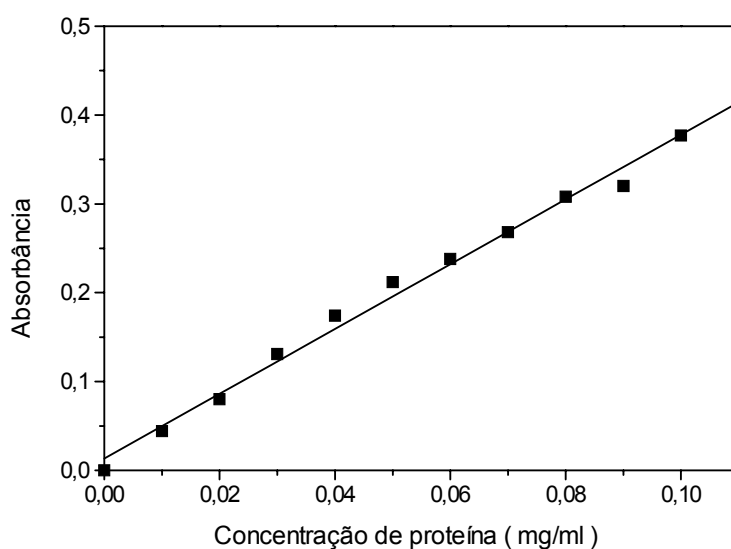
NI: não informado

## APÊNDICE 8.2: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A seguir apresenta-se um exemplo de obtenção da curva de calibração para a determinação de proteína pelo Método de Bradford (1976), empregando-se como padrão a BSA.

Curva de Calibração para Determinação de Proteína pelo Método de Bradford (1976)

Tubo n°	Solução Proteína (mL)	Água (mL)	Conc. Proteína (mg/mL)	Abs. ( 1 )	Abs. ( 2 )	Abs. ( 3 )	Abs. (média)
1	0	4,0	0,00	0	0	0	0
2	0,4	3,6	0,01	0,033	0,054	0,046	0,044
3	0,8	3,2	0,02	0,074	0,08	0,068	0,080
4	1,2	2,8	0,03	0,14	0,131	0,131	0,131
5	1,6	2,4	0,04	0,173	0,164	0,174	0,174
6	2,0	2,0	0,05	0,211	0,21	0,214	0,212
7	2,4	1,6	0,06	0,223	0,247	0,244	0,238
8	2,8	1,2	0,07	0,242	0,277	0,284	0,268
9	3,2	0,8	0,08	0,308	0,311	0,299	0,308
10	3,6	0,4	0,09	0,307	0,32	0,32	0,320
11	4,0	0,0	0,1	0,354	0,377	0,341	0,377



A equação de ajuste para o cálculo do teor de proteína é:

$$\text{Abs} = 0,01332 + 3,6463 \text{ Cp (mg/mL)}, \quad r = 0,9955, \quad \text{desvio padrão} = 0,01208, \quad n = 11$$



### APÊNDICE 8.3. INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA NAS ATIVIDADES DAS LIPASES

#### Influência do pH

Substrato: Emulsão de azeite de oliva em goma arábica 7% (m/v)

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura: 37°C

pH	Atividade (U/mg)			
	<i>Candida rugosa</i> (LCR)*	Lipase Pancreática (LPP)	Pancreatina (LKM)	Pancreatina (LNU)
5,0	20,4	841 ± 127	1109 ± 227	436 ± 100
5,5	23,8	1033 ± 49	1240 ± 288	723 ± 68
6,0	732	1391 ± 46	2066 ± 302	987 ± 4
6,5	1098	2591 ± 248	2532 ± 292	1300 ± 40
7,0	1830	3574 ± 306	3357 ± 157	1771 ± 33
7,5	1573	4029 ± 450	3686 ± 150	2277 ± 159
8,0	1024	5286 ± 383	4606 ± 238	3992 ± 3
8,5	951	3505 ± 288	3762 ± 18	2427 ± 110
9,0	805	3379 ± 0	2942 ± 166	2200 ± 0

\*Dados PEREIRA, 1999.

#### Influência da Temperatura

Substrato: Emulsão de azeite de oliva em goma arábica 7% (m/v)

LCR: pH 7,0; LPP: 8,0; LKM: pH 8,0; LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura 37- 60 °C

Temperatura (°C)	Atividade (U/mg)			
	<i>Candida rugosa</i> (LCR)*	Lipase Pancreática (LPP)	Pancreatina (LKM)	Pancreatina (LNU)
30	1768	3506 ± 322	2411 ± 0	2543 ± 316
37	3400	5434 ± 256	4209 ± 159	3993 ± 3
40	2788	5649 ± 97	4570 ± 130	3241 ± 133
45	2244	6175 ± 133	3884 ± 59	2794 ± 70
50	1475	3605 ± 132	3445 ± 202	2041 ± 53
55	1428	2777 ± 156	2839 ± 433	1869 ± 67
60	1448	1600 ± 240	1698 ± 229	1596 ± 106

\*Dados PEREIRA, 1999.

#### APÊNDICE 8.4. ESTABILIDADE TÉRMICA DAS LIPASES

Substrato: Emulsão de azeite de oliva em goma arábica 7% (m/v)

LCR: pH 7,0; LPP;8,0; LKM: pH 8,0; LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).

Tempo de incubação: 5 min, Temperatura 37°C

##### Lipase *Candida rugosa* (LCR)

Temperatura (°C)	1 hora		2 horas	
	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)
37	3400	100	3400	100
40	3400	100	3400	100
45	2021	59,44	1770	52,06
50	1279	37,62	1082	31,82
55	623	18,32	459	13,50
60	294	8,65	197	5,79

##### Lipase Pancreática (LPP)

Temperatura (°C)	1 hora		2 horas	
	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)
37	5434	100	5434	100
40	4577	84,20	316	5,80
45	586	10,80	472	8,70
50	0	0	0	0

##### Lipase Pancreatina Kin Master (LKM)

Temperatura (°C)	1 hora		2 horas	
	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)
37	4209 ± 158	100	4209 ± 158	100
40	2141 ± 51	50,86	1520 ± 0	36,10
45	1862 ± 336	44,24	996 ± 336	23,56
50	692 ± 36	16,44	561 ± 15	13,30
55	560 ± 0	13,30	488 ± 16	11,56
60	277 ± 101	6,58	109 ± 11	2,58

##### Lipase Pancreatina Nuclear (LNU)

Temperatura (°C)	1 hora		2 horas	
	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Atividade (U/mg)	Atividade Relativa (%)
37	3992 ± 3	100	3992 ± 3	100
40	1218 ± 28	30,50	948 ± 51	23,70
45	1336 ± 113	33,50	461 ± 96	11,50
50	368 ± 4	9,20	11 ± 11	0,30
55	34 ± 34	0,80	0	0
60	12 ± 3	0,30	0	0

**APÊNDICE 8.5. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA**

Varição da concentração do substrato na atividade hidrolítica da LCR, LPP, LKM e LNU  
 Substrato: Emulsão de azeite de oliva (10- 50%) em goma arábica 7% (m/v)  
 LCR: pH 7,0; LPP: pH 8,0; LKM: pH 8,0; LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).  
 Tempo de incubação: 5 min  
 Temperatura 37°C

Emulsão (v/v) (%)	Ácidos graxos* (mM)	Valores obtidos				Valores calculados*			
		Atividade (U/mg)				Atividade (U/mg)			
		LCR	LPP	LKM	LNU	LCR	LPP	LKM	LNU
10	372	1574	2246	2784	1628	1610	2187	2426	1303
20	744	2427	3045	3217	2151	2271	3696	3445	2187
30	1116	2558	5091	3674	2532	2632	4799	4006	2828
40	1488	2624	6636	4258	3199	2859	5642	4361	3312
50	1860	3193	5680	5005	3933	3014	6306	4605	3692

\*MM (azeite de oliva) = 848,80 g/mol

\*modelo ajustado pelo programa enzfitter

## APÊNDICE 8.6. TESTES DE SELEÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

### Condições experimentais

50 mL do efluente bruto +1,5 g de goma arábica (3% p/v) diluída no efluente

Adição de 200 mg de enzima (Concentração de enzima= 0,4%)

Temperatura = 40° C/ 260 rpm (agitação magnética)

Amostra retirada: 2 mL

Tempo = 4 horas

KOH 0,021 N

### Enzima: Lipozyme

Tempo (min)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,66	34,86	0	0	<b>20,4</b>
30	1,90	39,90	-	16,4	
60	2,12	44,52	9,66	31,5	
90	2,95	61,95	27,09	88,4	
<b>120</b>	<b>3,12</b>	<b>65,52</b>	<b>30,66</b>	<b>100</b>	
180	3,12	65,52	30,66	100	
240	3,12	65,52	30,66	100	

### ENZIMA: LIPOLASE

Tempo (min)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,62	34,02	0	0	<b>0,70</b>
30	1,63	34,23	-	20	
60	1,66	34,86	0,84	80	
90	1,67	35,07	-	100	
<b>120</b>	<b>1,67</b>	<b>35,07</b>	<b>1,05</b>	<b>100</b>	
180	1,67	35,07	1,05	100	
240	1,67	35,07	1,05	100	

### Enzima: *Candida rugosa* (LCR)

Tempo (min)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,62	34,02	0	0	<b>13,2</b>
30	2,21	46,41	-	62,7	
60	2,47	51,87	17,85	90,4	
90	2,56	53,76	-	100	
<b>120</b>	<b>2,56</b>	<b>53,76</b>	<b>19,74</b>	<b>100</b>	
180	2,56	53,76	19,74	100	
240	2,56	53,76	19,74	100	

**Enzima: Pâncreas de porco (pancreática) LPP**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Volume gasto (mL)</b>	<b>Ácidos graxos (mM)</b>	<b>AG formados (mM)</b>	<b>Conversão de AG (%)</b>	<b>Hidrólise (%)</b>
0	1,56	32,76	0	0	<b>13,0</b>
30	2,02	42,24	-	48,5	
60	2,29	48,09	15,33	78,4	
90	2,49	52,29	-	100	
<b>120</b>	<b>2,49</b>	<b>52,29</b>	<b>19,53</b>	<b>100</b>	
180	2,49	52,29	19,53	100	
240	2,49	52,29	19,53	100	

**Enzima: Pancreatina (Kin Master) LKM**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Volume gasto (mL)</b>	<b>Ácidos graxos (mM)</b>	<b>AG formados (mM)</b>	<b>Conversão de AG (%)</b>	<b>Hidrólise (%)</b>
0	1,56	32,76	0	0	<b>18,8</b>
30	2,41	50,61	-	63,4	
60	2,60	54,60	21,84	77,6	
90	2,48	52,08	-	68,6	
120	2,75	57,75	24,99	88,8	
180	2,65	60,90	28,14	100	
240	2,49	60,90	28,14	100	

## APÊNDICE 8.7. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

### Lipase de *Candida rugosa*

Condições Experimentais:

Temperatura = 40° C

Agitação: 200 rpm

Atividade: 3400 U/mg

Protéina: 58,9 mg/g

KOH = 0,02 N

**Ensaio 1:** 50 g de efluente  
0 g de goma arábica  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,50	50	0	0	6,45
30	2,75	55	5,0	62,5	
60	2,80	56	6,0	75	
90	2,90	58	8,0	100	
<b>120</b>	<b>2,90</b>	<b>58</b>	<b>8,0</b>	<b>100</b>	
240	2,90	58	8,0	100	

**Ensaio 2:** 50 g de efluente  
0 g de goma arábica  
40 mL de tampão pH 7,0  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0,20 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	16,12
30	2,55	51	3,0	15	
60	2,60	52	4,0	20	
90	3,10	62	14,0	70	
<b>120</b>	<b>3,05</b>	<b>61</b>	<b>13,0</b>	<b>65</b>	
180	3,40	68	20,0	100	
240	3,40	68	20,0	100	

**Ensaio 3:** 50 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	0,80	16	0	0	<b>13,70</b>
30	0,90	18	2,0	11	
60	0,95	19	3,0	17,6	
90	0,95	19	3,0	23,5	
<b>120</b>	<b>1,00</b>	<b>20</b>	<b>4,0</b>	<b>64,7</b>	
180	1,65	33	17,0	100	
240	1,65	33	17,0	100	

**Ensaio 4:** 50 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,2 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,62	32	0	0	<b>19,35</b>
30	2,21	44	12,0	61,4	
60	2,47	49	17,0	88,5	
90	2,56	51	19,0	97,9	
<b>120</b>	<b>2,58</b>	<b>52</b>	<b>24,0</b>	<b>100</b>	
240	2,58	52	24,0	100	

**Ensaio 5:** 50 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,20	44	0	0	<b>7,25</b>
30	2,60	52	8,0	88,8	
60	2,65	53	9,0	100	
90	2,65	53	9,0	100	
<b>120</b>	<b>2,65</b>	<b>53</b>	<b>9,0</b>	<b>100</b>	
240	2,65	53	9,0	100	

**Ensaio 6:** 50 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,2 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,70	34	0	0	<b>6,44</b>
30	1,80	36	2,0	25	
60	2,00	40	6,0	75	
90	2,10	42	8,0	100	
<b>120</b>	<b>2,10</b>	<b>42</b>	<b>8,0</b>	<b>100</b>	
240	2,10	42	8,0	100	

**Ensaio 7:** 50 g de efluente  
 1,5 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,80	36	0	0	<b>11,28</b>
30	1,90	38	2,0	14,2	
60	2,30	46	10,0	71,4	
90	2,50	50	14,0	100	
<b>120</b>	<b>2,50</b>	<b>50</b>	<b>14,0</b>	<b>100</b>	
180	2,50	50	14,0	100	
240	2,50	50	14,0	100	

**Ensaio 8:** 50 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,2 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>22,57</b>
30	2,60	52	4,0	16,6	
60	2,70	54	6,0	25	
90	3,50	70	26,0	100	
<b>120</b>	<b>3,60</b>	<b>72</b>	<b>28,0</b>	<b>100</b>	
240	3,80	72	28,0	100	



**Ensaio 9:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>12,89</b>
30	2,60	52	4,0	25	
60	2,85	57	9,0	56,2	
90	2,85	57	9,0	56,2	
<b>120</b>	<b>2,90</b>	<b>58</b>	<b>10,0</b>	<b>62,5</b>	
150	3,20	64	16,0	100	
240	3,20	64	16,0	100	

**Ensaio 10:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>14,51</b>
30	2,50	50	2,0	11,1	
60	2,60	52	4,0	22,2	
90	2,80	56	8,0	44,4	
<b>120</b>	<b>2,90</b>	<b>58</b>	<b>10,0</b>	<b>55,5</b>	
150	2,95	59	11,0	61,1	
180	3,30	66	18,0	100	
240	3,30	66	18,0	100	

**Ensaio 11:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,60	52	0	0	<b>11,29</b>
30	2,80	56	4,0	44,4	
60	2,90	58	6,0	55,5	
90	3,20	64	12,0	85,7	
<b>120</b>	<b>3,20</b>	<b>64</b>	<b>12,0</b>	<b>85,7</b>	
150	3,30	66	14,0	100	
240	3,30	66	14,0	100	

**Ensaio 12:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,50	50	0	0	<b>10,47</b>
30	2,90	58	8,0	61,5	
60	2,90	58	8,0	61,5	
90	3,00	60	10,0	76,9	
<b>120</b>	<b>3,10</b>	<b>62</b>	<b>12,0</b>	<b>92,3</b>	
150	3,15	63	13,0	100	
240	3,15	63	13,0	100	

**Ensaio 13:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,70	54	0	0	<b>11,28</b>
30	2,80	56	2,0	14,3	
60	2,80	56	2,0	14,3	
90	3,10	62	8,0	57,1	
<b>120</b>	<b>3,35</b>	<b>67</b>	<b>13,0</b>	<b>92,8</b>	
150	3,35	67	13,0	92,8	
180	3,40	68	14,0	100	
240	3,40	68	14,0	100	

**Ensaio 14:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 0 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,80	56	0	0	<b>11,30</b>
60	2,85	57	1,0	25	
90	2,90	58	2,0	50	
120	2,95	59	3,0	75	
<b>150</b>	<b>3,00</b>	<b>68</b>	<b>14,0</b>	<b>100</b>	
240	3,00	68	14,0	100	

## APÊNDICE 8.8. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (LCR)

**Ensaio 1:** 50 g de efluente  
40 mL de tampão fosfato pH 7,0  
0 g de goma arábica  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0,05 g de enzima  
KOH 0,02 N

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,70	54	0	0	<b>8,10</b>
30	3,00	60	6,0	60	
60	3,10	62	8,0	80	
90	3,10	62	8,0	80	
<b>120</b>	<b>3,10</b>	<b>62</b>	<b>8,0</b>	<b>80</b>	
150	3,20	64	10,0	100	
240	3,20	64	10,0	100	

**Ensaio 2:** 50 g de efluente  
0 g de goma arábica  
40 mL de tampão pH 7,0  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0,20 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>16,10</b>
30	2,55	51	3,0	15	
60	2,60	52	4,0	40	
90	3,10	62	14,0	70	
<b>120</b>	<b>3,05</b>	<b>61</b>	<b>13,0</b>	<b>65</b>	
150	3,10	62	14,0	70	
240	3,40	68	20,0	100	

**Ensaio 3:** 50 g de efluente  
1,50 g de goma arábica  
40 mL de tampão pH 7,0  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	0,80	16	0	0	<b>13,70</b>
30	0,90	18	2,0	11,7	
90	0,95	19	3,0	17,6	
<b>120</b>	<b>1,00</b>	<b>20</b>	<b>4,0</b>	<b>23,5</b>	
150	1,35	27	7,0	64,7	
180	1,65	33	17,0	100	
240	1,65	33	17,0	100	

**Ensaio 4:** 50 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,5	50	0	0	<b>19,40</b>
30	2,8	56	6,0	25	
90	2,9	58	8,0	33,3	
120	2,9	58	8,0	33,3	
<b>150</b>	<b>3,6</b>	<b>72</b>	<b>20,0</b>	<b>91,6</b>	
180	3,7	74	22,0	100	
240	3,7	74	22,0	100	

**Ensaio 5:** 50 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,20	44	0	0	<b>7,30</b>
30	2,60	52	8,0	88,8	
60	2,65	53	9,0	100	
90	2,65	53	9,0	100	
<b>120</b>	<b>2,65</b>	<b>53</b>	<b>9,0</b>	<b>100</b>	
240	2,65	53	9,0	100	

**Ensaio 6:** 50 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,2 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	3,00	60	0	0	<b>10,50</b>
30	3,10	62	2,0	15,4	
60	3,10	62	2,0	15,4	
90	3,30	66	6,0	46,1	
<b>120</b>	<b>3,50</b>	<b>70</b>	<b>10,0</b>	<b>76,9</b>	
150	3,50	70	10,0	76,9	
180	3,60	72	12,0	92	
210	3,65	73	13,0	100	
240	3,65	73	13,0	100	

**Ensaio 7:** 50 g de efluente  
 1,5 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,05 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	1,60	32	0	0	<b>16,10</b>
30	1,90	38	6,0	40	
60	2,00	40	8,0	53,3	
90	2,20	44	12,0	80	
<b>120</b>	<b>2,35</b>	<b>47</b>	<b>15,0</b>	<b>100</b>	
240	2,35	47	15,0	100	

**Ensaio 8:** 50 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,11 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,2 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>22,60</b>
30	2,60	52	4,0	14,3	
60	2,70	54	6,0	21,4	
90	3,50	70	22,0	78,6	
<b>120</b>	<b>3,60</b>	<b>72</b>	<b>24,0</b>	<b>85,7</b>	
150	3,80	76	28,0	100	
240	3,80	76	28,0	100	

**Ensaio 9:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>12,90</b>
30	2,60	52	4,0	25	
60	2,85	57	9,0	56,2	
90	2,85	57	9,0	56,2	
120	2,90	58	10,0	62,5	
<b>150</b>	<b>3,20</b>	<b>64</b>	<b>16,0</b>	<b>100</b>	
240	3,20	64	16,0	100	

**Ensaio 10:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,40	48	0	0	<b>14,50</b>
30	2,50	50	2,0	11,1	
60	2,60	52	4,0	22,2	
90	2,80	56	8,0	44,4	
120	2,90	58	10,0	55,5	
150	2,95	59	11,0	61,1	
180	3,30	66	18,0	100	
240	3,30	66	18,0	100	

**Ensaio 11:** 50 g de efluente  
 0,75 g de goma arábica  
 40 mL de tampão pH 7,0  
 0,05 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0,125 g de enzima

Tempo (min)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos (mM)	AG formados (mM)	Conversão de AG (%)	Hidrólise (%)
0	2,60	52	0	0	<b>11,30</b>
30	2,80	56	4,0	28,6	
60	2,90	58	6,0	42,8	
<b>90</b>	<b>3,20</b>	<b>64</b>	<b>12,0</b>	<b>85,7</b>	
120	3,20	64	12,0	85,7	
150	3,30	66	14,0	100	
240	3,30	66	14,0	100	

## APÊNDICE 8.9. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PANCREATINA (LKM)

### Condições Experimentais:

Temperatura = 40° C

Agitação: 200 rpm

KOH = 0,0205 N/ 0,026 N

**Ensaio 1:** 100 g de efluente  
0 g de goma arábica  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
0 g de NaHCO<sub>3</sub>  
0,10 g de enzima  
KOH 0,0205 N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,030	3,70	30,47	0	<b>24,33</b>
1	2,010	3,90	39,78	9,31	
2	2,079	4,40	43,39	12,92	
3	2,014	4,85	49,37	18,9	
4	2,007	5,00	51,07	20,6	
5	2,054	5,20	51,89	21,42	
<b>6</b>	<b>2,009</b>	<b>5,30</b>	<b>54,08</b>	<b>23,61</b>	

**Ensaio 2:** 100 g de efluente  
0 g de goma arábica  
0 g de CaCl<sub>2</sub>  
NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
0,40 g de enzima  
KOH 0,0205 N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,201	3,70	34,46	0	<b>40,04</b>
1	2,012	5,00	50,94	20,47	
2	2,205	5,80	53,92	23,45	
3	1,916	5,60	59,92	29,45	
4	1,775	5,50	63,52	33,05	
5	1,992	6,30	64,83	34,36	
<b>6</b>	<b>2,010</b>	<b>6,80</b>	<b>69,35</b>	<b>38,88</b>	

**Ensaio 3:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,10 g de enzima  
 KOH 0,026 N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,198	2,50	29,57	0	<b>20,33</b>
1	2,161	3,00	36,09	6,57	
2	2,219	3,90	45,89	16,32	
3	2,188	3,80	45,16	15,59	
4	2,039	3,65	46,54	16,97	
5	2,143	4,20	50,96	21,39	
<b>6</b>	<b>12,154</b>	<b>4,20</b>	<b>50,69</b>	<b>21,13</b>	

**Ensaio 4:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,40 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,052	2,50	29,57	0	<b>72,08</b>
1	2,059	6,00	59,79	30,22	
2	2,044	6,85	68,70	39,13	
3	2,047	7,10	71,10	41,53	
4	1,957	7,20	75,42	45,85	
5	1,967	8,80	91,71	62,14	
<b>6</b>	<b>1,979</b>	<b>9,50</b>	<b>98,40</b>	<b>68,83</b>	

**Ensaio 5:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0,22 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,10 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,193	2,85	26,67	0	<b>20,26</b>
1	1,751	3,00	35,14	8,47	
2	1,868	3,20	35,12	8,45	
3	2,154	4,90	46,63	19,96	
4	2,182	4,65	43,86	17,19	
<b>6</b>	<b>2,027</b>	<b>4,60</b>	<b>46,51</b>	<b>19,84</b>	



**Ensaio 6:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0,22 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,40 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,005	2,50	26,67	0	<b>66,91</b>
1	1,996	6,70	68,81	42,14	
2	2,009	6,90	70,41	43,74	
3	2,006	8,30	84,82	58,15	
4	2,040	8,50	85,42	58,75	
5	2,024	8,60	87,10	60,43	
<b>6</b>	<b>2,038</b>	<b>9,20</b>	<b>92,54</b>	<b>65,87</b>	

**Ensaio 7:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0,22 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,10 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,120	6,00	41,74	0	<b>33,67</b>
1	1,997	6,20	63,61	21,87	
2	2,059	6,50	64,71	22,97	
3	2,065	7,00	69,49	27,75	
4	2,176	7,45	70,18	28,44	
5	2,025	5,80	74,47	32,73	
<b>6</b>	<b>2,066</b>	<b>6,10</b>	<b>76,77</b>	<b>35,03</b>	

**Ensaio 8:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0,22 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,40 g de enzima  
 KOH 0,026N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,041	5,30	41,74	0	<b>27,52</b>
1	2,022	5,25	67,51	25,77	
3	2,066	5,85	73,62	31,88	
4	2,116	6,10	74,95	33,21	
5	2,112	6,00	73,86	32,12	
<b>6</b>	<b>2,388</b>	<b>6,75</b>	<b>73,49</b>	<b>31,75</b>	

**Ensaio 9:** 100 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,026N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,087	3,00	34,45	0	<b>14,08</b>
1	2,085	3,60	44,89	10,44	
3	2,124	4,10	50,19	15,74	
4	2,002	3,90	50,65	16,2	
5	2,080	4,00	50,00	15,55	
<b>6</b>	<b>2,167</b>	<b>4,10</b>	<b>49,19</b>	<b>14,74</b>	

**Ensaio 10:** 100 g de efluente  
 1,5 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,260	3,60	32,65	0	<b>16,16</b>
1	2,012	3,70	37,69	5,04	
2	2,091	3,70	36,27	3,62	
3	2,037	4,00	40,26	7,61	
4	1,944	4,20	44,29	11,65	
5	1,974	4,45	46,21	13,56	
<b>6</b>	<b>2,058</b>	<b>5,30</b>	<b>52,79</b>	<b>20,14</b>	

**Ensaio 11:** 100 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,182	3,55	33,35	0	<b>15,70</b>
1	2,030	3,80	38,37	5,02	
2	2,146	5,10	48,72	15,37	
3	2,057	6,00	59,79	26,44	
4	1,756	4,95	57,79	24,44	
5	1,919	5,20	55,55	22,20	
<b>6</b>	<b>1,881</b>	<b>5,80</b>	<b>63,21</b>	<b>46,93</b>	

**Ensaio 12:** 100 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,0205N/ 0,026N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	1,980	5,50	55,01	0	<b>25,31</b>
1	2,014	6,10	62,09	7,08	
2	2,157	6,70	63,67	8,66	
3	1,998	7,00	71,82	16,81	
5	2,130	6,60	80,56	25,55	
<b>6</b>	<b>2,009</b>	<b>6,10</b>	<b>80,56</b>	<b>25,55</b>	

**Ensaio 13:** 100 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,026N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,120	5,50	55,01	0	<b>32,46</b>
1	1,993	5,60	73,06	18,05	
2	2,141	6,25	75,89	20,88	
3	2,044	7,00	89,04	34,03	
4	2,138	6,75	82,48	27,47	
5	2,123	6,85	84,00	28,99	
<b>6</b>	<b>2,110</b>	<b>7,15</b>	<b>88,10</b>	<b>33,09</b>	

**Ensaio 14:** 100 g de efluente  
 1,50 g de goma arábica  
 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>  
 0 g de NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,25 g de enzima  
 KOH 0,0205N

Tempo (h)	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)	Hidrólise (%)
0	2,130	4,40	55,01	0	<b>21,22</b>
1	1,829	5,00	56,04	1,03	
2	2,070	6,15	60,91	5,9	
3	2,046	7,70	77,15	22,14	
4	2,100	8,00	78,09	23,08	
5	2,024	7,70	77,99	22,98	
<b>6</b>	<b>2,243</b>	<b>8,45</b>	<b>77,23</b>	<b>22,22</b>	

**APÊNDICE 8.10. HIDRÓLISE DO EFLUENTE COM AJUSTE DO PH POR ADIÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES ALCALINIZANTES (NaHCO<sub>3</sub> OU NaOH) EMPREGANDO A LKM**

**Ensaio 1:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,10 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	35,51	0
1	46,75	11,24
2	46,37	10,89
3	47,49	11,98
4	49,49	13,98
5	49,49	13,98
<b>6</b>	<b>53,87</b>	<b>18,36</b>

**Ensaio 2:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaOH pH 8,0  
 0,10 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	15,31	0
1	33,68	18,38
2	35,64	20,33
3	37,94	22,63
4	44,12	28,81
5	46,65	31,34
<b>6</b>	<b>55,21</b>	<b>39,90</b>

**Ensaio 3:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,10 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	29,57	0
1	36,09	6,57
2	45,69	16,32
3	45,16	15,59
4	46,54	16,97
5	50,96	21,39
<b>6</b>	<b>50,96</b>	<b>21,39</b>

**Ensaio 4:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaOH pH 8,0  
 0,10 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	38,02	0
1	40,18	2,16
2	43,92	5,90
3	44,76	6,74
4	52,97	14,55
5	68,60	30,58
<b>6</b>	<b>69,40</b>	<b>31,38</b>

**Ensaio 5:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub>H pH 8,0  
 0,40 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	30,46	0
1	50,94	20,48
2	53,92	23,46
3	59,92	29,46
4	63,52	33,06
5	64,83	34,37
<b>6</b>	<b>69,35</b>	<b>38,89</b>

**Ensaio 6:** 100 g de efluente  
 0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaOH pH 8,0  
 0,40 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	30,47	0
1	74,95	44,48
2	86,23	55,76
3	92,72	62,25
4	91,99	61,52
5	94,98	64,51
<b>6</b>	<b>96,56</b>	<b>66,09</b>

**Ensaio 7:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaHCO<sub>3</sub> pH 8,0  
 0,40 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	30,47	0
1	56,69	26,22
2	57,80	27,33
3	58,38	27,91
4	59,20	28,73
5	59,97	29,50
<b>6</b>	<b>60,49</b>	<b>30,02</b>

**Ensaio 8:** 100 g de efluente  
 3,0 g de goma arábica  
 0 g de CaCl<sub>2</sub>  
 NaOH pH 8,0  
 0,4 g de enzima

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácidos graxos livres (mM)</b>	<b>Ácidos graxos formados (mM)</b>
0	43,36	0
1	73,34	29,98
2	81,69	38,33
3	86,84	43,48
4	89,98	46,62
5	95,11	51,75
<b>6</b>	<b>97,93</b>	<b>54,57</b>

**APÊNDICE 8.11. CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DO EFLUENTE BRUTO**

<b>TEMPO (H)</b>	<b>QUANTIDADE DE METANO PRODUZIDO (ML)</b>
0	0
5,5	0
24	34
36	52
48	61
54	66
76	73
95	81
102	82
120	82
127,5	82
144	83
151	85
168	89
174	90
203	94
221	95
266	95
289	96
294	96
313	101
320	101
335	102
368	102
392	102
432	103
461	106
484,5	106
508	106
528,5	106
559,5	106
576	107
607	107
627	107
675,5	107
699,5	107

**APÊNDICE 8.12. CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DO EFLUENTE TRATADO COM LKM**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Volume de CH<sub>4</sub> (mL)<sup>1</sup></b>	<b>Volume de CH<sub>4</sub> (mL)<sup>2</sup></b>	<b>Média</b>
0	0	0	0
1	3	0	1,5
3	7	3	5
22	57	47	52
42,5	67	50	58,5
48	72	58	65
66,5	72	58	65
72,5	79	80	79,5
90,5	82	86	84
96,5	90	100	95
112,5	90	100	95
122,5	98	109	103,5
137,5	98	109	103,5
144	106	117	111,5
162,5	106	117	111,5
187,5	108	125	116,5
208,5	118	127	122,5
232,5	123	140	131,5
239	142	158	150
257	142	158	150
261,5	159	169	164
281,5	169	175	172
288	179	193	186
308,5	199	209	204
335	236	242	239
356	253	255	254
377	269	276	272,5
410	299	306	302,5
424	307	318	312,5
456	337	342	339,5
502	369	377	373
549	409	417	413
573	446	452	449
597	486	501	493,5
621	494	510	502
645	497	510	503,5
693	505	516	510,5
717	513	523	518
741	516	526	521
763	516	530	523
786	516	530	523
813	516	530	523



**APÊNDICE 8.12 (CONTINUAÇÃO)**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Volume de CH<sub>4</sub> (mL)<sup>1</sup></b>	<b>Volume de CH<sub>4</sub> (mL)<sup>2</sup></b>	<b>Média</b>
0	0	0	0
1	4	5	4,5
10	45	35	40
13	60	49	54,5
18	84	73	78,5
22	91	78	84,5
34	102	85	93,5
39	118	101	109,5
44	139	111	125
59	183	158	170,5
73	213	198	205,5
84	216	214	215
90	236	232	234
92	236	234	235
113	275	265	270
133	299	288	293,5
139	326	315	320,5
157	327	316	321,5
164	330	320	325
182	330	320	325
188	338	328	333
210	338	328	333
232	346	332	339
244	366	349	357,5
250	376	357	366,5
273	376	357	366,5
294	380	357	368,5
303	394	371	382,5
317	397	371	384
341	397	371	384
350	413	381	397
365	414	384	399
374	427	396	411,5
390	427	396	411,5
401	433	402	417,5
426	435	404	419,5
449	448	414	431
458	460	429	444,5
473	463	429	446
482	481	446	463,5
497	484	446	465
506	487	447	467
521	487	447	467
530	487	455	471
689	498	458	478
698	498	458	478

### APÊNDICE 8.13. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Esta tese de doutorado foi baseada em dados experimentais obtidos ao longo de 48 meses de estudo, os quais deram origem a publicações em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

CASTRO, Heizir Ferreira de; MENDES, Adriano Aguiar; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JR, Agenor. Biodegradabilidade anaeróbia de águas residuárias de indústrias de produtos avícolas e lácteos previamente tratadas com enzimas hidrolíticas. 2004. *Patente: Privilégio e Inovação. n. 000933 (PI 0402587-3)*, "Biodegradabilidade anaeróbia de águas". 30 de jan. de 2004 (Depósito).

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JR, Agenor. Aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevado teor de lipídeos, *Química Nova* 325/03 (no prelo).

PEREIRA, Ernandes Benedito; REGINATTO, Valéria; FURIGO JR, Agenor; CASTRO, Heizir Ferreira de. Degradation of fat contents in slaughterhouse wastewater by a commercial microbial lipase, *Brazilian Archives of Biology and Technology* (no prelo).

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JR, Agenor. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*. In: *XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES*, 2003, Florianópolis-SC. Programa /Trabalhos completos. Florianópolis-SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. v. 1, p. 1-6.

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JR, Agenor. Degradação de gorduras presentes em efluentes industriais frigoríficos utilizando lipases. In: *XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 2002, Natal-RN. COBEQ-2002. CD-ROM (trabalho completo)

PEREIRA, Ernandes Benedito; TEIXEIRA, Roberta M; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JUNIOR, Agenor. Tratamento enzimático utilizando lipases em rejeitos industriais frigoríficos. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA - COBEQ 2002*, 2002, Natal/ RN. 2002 (trabalho completo)

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JR, Agenor. Definição das variáveis significativas na hidrólise de efluente proveniente de frigorífico utilizando lipase de *Candida rugosa*. In: *VII SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS*, 2002, Maringá-PR. Programação e Resumos VII SHEB. Maringá-PR: UEM, 2002. v. 1, p. 172-172.(trabalho premiado, Menção honrosa).

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JUNIOR, Agenor. Improvement the degradation of effluent containing fats by lipase addition. In: 24<sup>th</sup> SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 2002, Gantlinburg, Tennessee. Program and Abstracts, OAK RIDGE. 2002. v. 01, p. 168-168.

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JUNIOR, Agenor. Seleção de preparações de lipases comerciais para produção da carga orgânica de efluentes gerados em frigoríficos de frangos. In: 5<sup>o</sup> SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, ENZITEC 2002, Brasília, DF. Livro de Resumos, 2002. v. 01, p. 153-153.

PEREIRA, Ernandes Benedito; CASTRO, Heizir Ferreira de; FURIGO JUNIOR, Agenor. Aplicação da enzima lipase em rejeitos da indústria frigorífica para remoção de óleos e gorduras. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos. 2001. v. 1, p. 335-335.