

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**APLICAÇÃO DE LIPASES COMO AUXILIAR NO PRÉ-TRATAMENTO DE
EFLUENTES DE FRIGORÍFICOS DE SUÍNOS E BOVINOS**

ELISANDRA RIGO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

ABRIL - 2004

Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos

Elisandra Rigo

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc.
Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.
Orientador

Prof. Altemir José Mossi , D.Sc.

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., Dr.Ing.

Prof. Jorge Alberto Vieira Costa, D.Sc.

Erechim, 30 de abril de 2004

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

“Dedico esta conquista à minha vida e as
pessoas que fazem parte dela, em
especial a você Iloir”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Ao meu esposo Iloir Gaio por todo apoio, incentivo e amor.

Aos meus familiares pela compreensão e carinho.

Aos meus orientadores Débora de Oliveira e Marco Di Luccio, pelo auxílio, compreensão e disponibilidade, os quais foram de suma importância para realização deste trabalho, que merecem meu eterno agradecimento.

À professora Denise M.G. Freire por disponibilizar as amostras da Lipase FMS.

Ao professor Cláudio Dariva pelo apoio no planejamento de experimentos.

Aos demais professores e funcionários da Instituição que sempre nos auxiliaram com dedicação e amizade.

Aos colegas e amigos pela amizade e compreensão.

À Cláudia pelo auxílio e carinho em todas as atividades desenvolvidas.

Aos bolsistas de iniciação científica Patrícia Lodea e Fernando Loch e a colega Roberta E. Rigoni pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos durante a pesquisa.

À empresa Allimentus Engenharia e Tecnologia pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudos, bem como, pelas amostras de Lipolase 100T.

À COTREL – Cooperativa Triticola Erechim Ltda, pela colaboração nas amostras do efluente.

À URI-Campus de Erechim pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do RS (programa de Pólos de Inovação Tecnológica) pelo apoio financeiro ao projeto.

“Ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto
de transportar montes, se não tiver
persistência, nada serei.”

Carta de São Paulo aos Coríntios

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos

Elisandra Rigo

Abril/2004

Orientadores: Débora de Oliveira

Marco Di Luccio

O crescimento industrial e tecnológico dos meios geradores de poluição hídrica tem levado a legislação relativa aos limites de descarte e emissão de resíduos a se tornar cada vez mais rígida e criteriosa. Os efluentes de frigoríficos contêm elevado teor de óleos e gorduras, que podem afetar o desempenho do tratamento biológico. A hidrólise enzimática em condições ideais de temperatura, pH, agitação e quantidade de enzima pode vir a contribuir no aumento da biodegradação de efluentes gordurosos e conseqüentemente aumentar a eficiência dos processos de tratamento biológico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática de um efluente de frigorífico de suínos e bovinos, utilizando a técnica de planejamento de experimentos. Os efeitos da temperatura de reação, agitação, pH e quantidade de enzima sobre a hidrólise foram investigados. O desempenho de uma lipase comercial (Lipolase 100T, Novozymes) foi comparado ao de uma lipase obtida por fermentação em meio sólido. O acompanhamento cinético do processo mostrou que, em praticamente todas as condições experimentais, a hidrólise máxima foi atingida entre 9 e 15 horas de reação. A análise estatística foi realizada, considerando-se os efeitos significativos com nível

de 95% de confiança. A quantidade de enzima foi a variável que mais influenciou no processo de hidrólise seguida da temperatura. O pH e a agitação apresentaram efeito pouco pronunciado para ambas as enzimas. A Lipase FMS levou a maiores conversões de ácidos graxos livres em comparação a Lipolase 100T. Embora o nível superior da quantidade de enzima tenha sido o ideal para maximizar a hidrólise dos óleos e gorduras do efluente, o alto teor de enzima influenciou negativamente o processo de biodegradabilidade, principalmente para a Lipolase 100T. O pré-tratamento do efluente com 0,1% (p/v) da Lipase FMS foi o que levou ao maior aumento da eficiência de remoção de DQO de um biorreator anaeróbico, quando comparado a um reator controle alimentado com o efluente bruto.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

Use of lipases in the pretreatment of wastewaters from swine and bovine slaughterhouses

Elisandra Rigo

April/2004

Supervisors: Débora de Oliveira

Marco Di Luccio

The growth of the sources of water pollution has motivated the development of more severe legislations to control the disposal and emission of residues. Slaughterhouse wastewaters contain a large amount of oil and grease, which can affect the performance of the biological treatment. The enzymatic hydrolysis in optimal conditions of temperature, pH, agitation and amount of enzyme may contribute to increase the biodegradation of oil-rich wastewaters and consequently increasing the effectiveness of biological treatment processes. In this context, this work aimed to assess the enzymatic hydrolysis of wastewaters of swine and bovine slaughterhouses, using experimental design technique. The effect of temperature, agitation, pH and amount of enzyme added to the wastewater on the hydrolysis were investigated. The performance of a commercial enzyme (Lipolase 100T, Novozymes) was compared to the one of a lipase obtained by solid state fermentation (SSF). The kinetics of the reaction showed that, in almost all experimental conditions, the maximum hydrolysis was reached between 9 and 15 hours of reaction. A statistical analysis of the results was performed, considering the significant effects with 95% of

confidence. The amount of enzyme was the factor that most influenced the hydrolysis process. The stirring rate and pH presented only a small influence on hydrolysis for both enzymes tested. The SSF lipase showed higher conversions in fatty acids than Lipolase 100T. Although the upper level of enzyme amount was the ideal to maximize the hydrolysis, it has negatively influenced the biodegradation of the wastewater, principally when Lipolase 100T was used. The pretreatment of the wastewater with 0.1 w/v% of SSF lipase was the condition that has mostly increased the COD removal effectiveness in an anaerobic batch reactor, when compared to a control reactor fed with raw wastewater.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO	3
2.1 Introdução	3
2.2 Tratamento de Efluentes na Indústria de Alimentos	3
2.3 Efluentes na Indústria Frigorífica	5
2.3.1 Caracterização dos efluentes líquidos de frigoríficos	6
2.3.2 Tratamentos de efluentes em indústrias frigoríficas	8
2.4 Aplicação de Enzimas no Tratamento de Resíduos	20
2.4.1 Lipases	22
2.4.2 Hidrólise enzimática de resíduos líquidos utilizando lipases	24
2.5 Considerações Finais	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Materiais	29
3.1.1 Reagentes e produtos químicos	29
3.1.2 Equipamentos	30
3.2 Métodos	30
3.2.1 Amostragem de efluente	30
3.2.2 Caracterização do efluente	31
3.2.3 Enzimas utilizadas	31
3.2.4 Planejamento dos experimentos	31
3.2.5 Tratamento enzimático do efluente	32
3.2.6 Avaliação da variação do substrato	33
3.2.7 Tratamento biológico	33
3.2.8 Métodos analíticos	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1 Caracterização do Efluente de Frigorífico	42
4.2 Hidrólise Enzimática	43
4.2.1 Hidrólise enzimática de óleos e graxas do efluente de frigorífico de suínos e bovinos	43
4.3 Avaliação da Variação da Concentração do Substrato	57
4.4 Testes de Biodegradação Anaeróbia	61
4.4.1 Aclimação do lodo anaeróbio	61
4.4.2 Tratamento anaeróbio do efluente	69
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	76
5.1 Conclusões	76
5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros	77
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

A escassez de água vem aumentando à medida que a população, a indústria e a agricultura se expandem (Macedo, 2001). Desta forma, a economia é uma necessidade, bem como a reciclagem e a reutilização são alternativas para o uso racional da água (Carnesecca, 2001) pois reduzem substancialmente as cargas poluidoras e ainda obtém-se subprodutos rentáveis (Rajeshwari *et al.*, 2000).

A água é um fator indispensável para o funcionamento de indústrias, como a frigorífica, onde desempenha diversas funções. Após sua utilização, esta se torna somente veículo de poluição, principalmente de matéria orgânica gerada durante as atividades da indústria (Cavalcanti e Braile, 1993). Este cenário impulsionou as questões ambientais para uma importante preocupação, de se reduzir o impacto provocado por poluentes gerados de uma forma geral, devido ao crescimento dos meios geradores de poluição hídrica (Henze, 1997).

A carga poluidora e o volume dos efluentes líquidos de qualquer frigorífico dependem dos processos industriais, e basicamente possuem gorduras e proteínas em elevadas quantidades, o que resulta em altos teores de DQO (Rinzema *et al.*, 1994). Em princípio, assumindo-se que todos os compostos orgânicos podem ser degradados biologicamente, a via anaeróbia pode ser promissora, por ser indicada para casos em que o resíduo a ser tratado contenha altas cargas de DBO/DQO e sólidos em suspensão, como no caso do efluente frigorífico (Chernicharo, 1997).

No entanto, o controle operacional pode ser dificultado pela complexidade das interações dos microrganismos (Hu *et al.*, 2002). Além disso, a gordura, diminui a biodegradabilidade do efluente causando sérios problemas em processos anaeróbios e aeróbios (Cammarota *et al.*, 2001, Jung *et al.*, 2002). No entanto, pesquisas comprovam que mesmo com a ocorrência de problemas operacionais como flotação do lodo ou toxicidade de compostos intermediários, o processo anaeróbio é utilizado para o tratamento deste tipo de resíduo (Vidal *et al.*, 2000). O melhoramento da eficiência da digestão anaeróbia faz-se necessário, através de implementação de novas técnicas e/ou incorporação de melhorias nas já existentes.

No tratamento de efluentes gordurosos os lipídios representam em torno de 50% da DQO do resíduo (Rajeahwari *et al.*, 2000). Técnicas como instalação de caixas de gordura, flotadores e tratamentos com adição de álcalis são utilizadas embora com baixa eficiência. A

utilização de enzimas específicas como hidrolases, principalmente lipases, pode ser de grande interesse para correções de problemas no sistema biológico causados pelo alto teor de lipídios. Este tipo de tratamento vem sendo pesquisado e apresenta algumas vantagens, tais como controle dos produtos, a não geração de sub-produtos tóxicos, condições moderadas de operação, redução de custo em termos de energia, além de enzimas imobilizadas poderem ser reutilizadas, tornando o processo atrativo do ponto de vista econômico e ambiental (Masse *et al.*, 2001b, Novo Nordisk, 1992).

O desenvolvimento deste trabalho teve como objetivo principal estudar a aplicação de duas enzimas hidrolíticas como um pré-tratamento da degradação anaeróbia de efluente de indústrias frigoríficas de suínos e bovinos. Os objetivos específicos foram a avaliação da hidrólise enzimática do efluente, otimizando-se as condições operacionais da hidrólise através de técnicas de planejamento de experimentos; e a avaliação do efeito da pré-hidrólise na biodegradação do efluente utilizando-se reatores anaeróbios.

Em uma primeira etapa foram otimizadas as condições operacionais (temperatura, quantidade de enzima, pH e agitação) em termos dos ácidos graxos livres (AGL) formados na hidrólise dos óleos e graxas constituintes do efluente. A técnica do planejamento de experimentos foi utilizada para duas diferentes lipases: Lipolase 100T (Novozymes) e um complexo enzimático obtido por fermentação da torta de babaçu por *Penicillium restrictum*. De posse das condições otimizadas, o efeito da concentração do substrato na hidrólise de óleos e graxas foi ainda avaliado.

Em uma segunda etapa, o efluente pré-tratado enzimaticamente com as duas enzimas foi aplicado em reatores anaeróbios para avaliação da taxa de biodegradação. Uma comparação entre o sistema pré-tratado e o não tratado foi efetuada, para desta forma evidenciar a eficiência do processo, utilizando-se as quantidades de enzima de 0,1 e 5% (p/v), variando a concentração de óleos e graxas na faixa de 250 mg/L até 3.000 mg/L.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados temas referentes ao trabalho realizado, visando proporcionar o embasamento teórico e fornecendo, desta forma, condições para entendimento científico a partir de pesquisas já desenvolvidas.

2.1 Introdução

A água vem se tornando cada vez mais escassa à medida que a população, a indústria e a agricultura se expandem. Embora o uso da água varie de um país para o outro, a agricultura, principalmente nos países de terceiro mundo, é a principal “vilã”, consumindo aproximadamente 70% da água disponível, enquanto a indústria consome 22%. Já o consumo (Km³) doméstico demanda apenas 8%, mesmo que cada indivíduo necessite a cada dia de 189 litros de água para atender suas necessidades (Macêdo, 2001).

Além da necessidade de economia, a reciclagem e a reutilização aparecem como alternativas para o uso racional da água já que esta é um recurso natural renovável, porém finito. Renovável pelos processos do ciclo hidrológico; finito, porque sua quantidade total na terra é constante (Carneseca, 2001).

As questões ambientais têm alcançado importância crescente nos últimos anos, devido ao aumento da preocupação das empresas em reduzir o impacto provocado por poluentes gerados em seus processos industriais, e à conscientização dos consumidores que passaram a exigir produtos em conformidade com as normas de proteção ao meio ambiente (Henze, 1997) e, principalmente, devido à pressão que as instituições de proteção ambiental e órgãos de fiscalização têm exercido sobre as indústrias. Além disso, a reciclagem já é uma realidade, pois é economicamente viável em função da redução dos custos envolvidos com a própria água e por reduzir o volume de efluentes lançados em um recurso hídrico (Macêdo, 2001).

2.2 Tratamento de Efluentes na Indústria de Alimentos

Na indústria, de modo geral, a água é a matéria-prima que se une a outras para criar produtos acabados, ou ser utilizada como meio de transporte, como agente de limpeza, em sistemas de refrigeração, como fonte de vapor e produção de energia (Cavalcanti e Braile, 1993).

Atualmente, os poluentes industriais que mais preocupam são os orgânicos e os metais pesados. Uma elevada poluição por matérias orgânicas é encontrada nos despejos de matadouros e frigoríficos. Esses despejos possuem valores elevados de DBO, sólidos em suspensão, material flutuante e graxas, além de apresentarem altas temperaturas (Cavalcanti e Braile, 1993).

As indústrias que processam matérias-primas geradoras de resíduos orgânicos enfrentam a realidade de um resíduo altamente putrescível, entrando em decomposição poucas horas depois de sua geração, liberando odor característico. Processos de biodegradação controlada surgem para evitar este problema. A biodegradação consiste na decomposição biológica de substâncias ou produtos orgânicos. Para que a biodegradação de um determinado material orgânico ocorra, é necessário que a célula viva possua uma substância química específica destinada à sua decomposição. Verificou-se que estas substâncias químicas que catalisam as reações são as enzimas (Cavalcanti e Braile, 1993).

Em todo o mundo, a legislação relativa aos limites de descarte e emissão de resíduos vem se tornando cada vez mais rígida e critérios de remoção de poluentes específicos devem ser cumpridos. Tradicionalmente, os resíduos industriais e municipais são tratados por processos que empregam populações microbianas. Entretanto, existem diversas situações nas quais o tratamento microbiano não é inteiramente satisfatório. Alterações no meio como mudança de pH, temperatura ou composição química, interferem na qualidade do tratamento (Henze, 1997).

No entanto, a possibilidade de se desenvolver tecnologias mais eficientes para o aproveitamento de resíduos e tratamento de efluentes poderá reduzir o investimento inicial das empresas e também seus custos operacionais para manter os sistemas em funcionamento, além de permitir que as mesmas se adaptem às normas ambientais e, conseqüentemente, venham a contribuir para a redução do impacto ambiental dessas atividades como um todo (Henze, 1997).

Segundo relatório realizado pela FEPAM (1997), a carne e seus derivados possuem valor econômico e potencial poluidor significativos, representando 43% do lançamento total da carga de DQO no estado do Rio Grande do Sul, conforme ilustra a Figura 1.

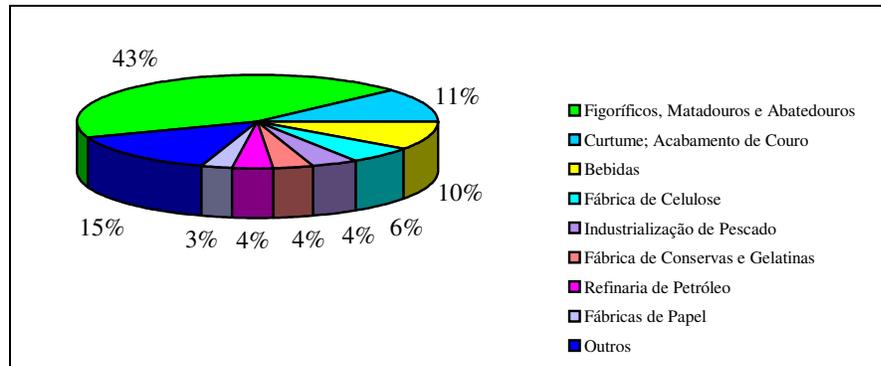


Figura 1. Distribuição da carga de DQO remanescente por setores industriais do Estado do Rio Grande do Sul

A natureza dos resíduos depende das operações realizadas em cada tipo de indústria e, portanto, os métodos de tratamento para minimizar os efeitos das cargas poluidoras geradas por estas devem ser enquadrados em cada caso específico quanto às necessidades de recuperação, modificação e/ou tratamento. De modo geral, os métodos de tratamento de efluentes nas indústrias de alimentos dividem-se em operações e processos unitários. A integração destes compõe os sistemas de tratamento, que consistem em processos físicos e químicos, que caracterizam o tratamento primário e processos biológicos, que caracterizam o processo secundário (Vedana *et al.*, 1999).

2.3 Efluentes na Indústria Frigorífica

Os efluentes das indústrias de carnes possuem elevado volume, são ricos em conteúdo orgânico, causado pela grande concentração de gordura e proteína. Além desses componentes, os efluentes também são constituídos, em alguns frigoríficos, de esgoto sanitário e águas pluviais, captadas na indústria, onde a soma destes constituintes implica em uma importante fonte de poluição de águas e, conseqüentemente, altos valores de DQO. Processos como recuperação do sangue, das gorduras e do conteúdo das vísceras podem reduzir substancialmente as cargas poluidoras e ainda produzir subprodutos rentáveis (Cavalcanti e Braile, 1993, Maartens *et al.*, 1996b, Rajeshwari *et al.*, 2000).

2.3.1 Caracterização dos efluentes líquidos de frigoríficos

Os efluentes líquidos industriais são despejos líquidos originários de diversas atividades, contendo as contribuições de águas de lavagem de equipamentos, tubulações, pisos e demais instalações da indústria. Desta forma, os efluentes líquidos da indústria frigorífica poderão conter (Cavalcanti e Braile, 1993): águas de lavagem oriundas das diversas etapas da produção; detergentes e desinfetantes usados nas operações de lavagem e sanitização; material terroso, fezes, urina, rúmen e pêlos nas operações de lavagem e sanitização dos animais, cevas e pocilgas; lubrificantes empregados em determinados equipamentos; subprodutos obtidos na produção, tais como resíduos gordurosos e proteínas; ingredientes como corantes, emulsificantes, espessantes, nitritos ou condimentos diversos.

Os efluentes gerados surgem com volume apreciável de águas utilizadas no processamento industrial, desde a chegada dos animais na indústria até o seu processamento, que inclui as operações de recepção, abate, escaldagem, limpeza de vísceras, resfriamento das carcaças e preparação de produtos, incluindo as águas de lavagem de equipamentos e instalações, obtendo uma alta concentração de matéria orgânica, tanto em solução quanto na forma de sólidos suspensos (Rajeshwari *et al.*, 2000). As etapas de um processo industrial de frigorífico são divididas em duas áreas chamadas de “área suja” e “área limpa”. A “área suja” refere-se às etapas de escaldagem, depilagem e toalete. Na “área limpa” estão as etapas em que os animais são limpos, as carcaças são preparadas e designadas para embalagem ou para industrialização.

a) Características físico-químicas dos efluentes frigoríficos

Nos matadouros e indústrias de produtos cárneos que produzem resíduos líquidos, os principais parâmetros a serem investigados segundo as exigências da Fepam (Fundação Estadual de Proteção Ambiental) são a DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), sólidos suspensos e sedimentáveis, fósforo total, nitrogênio total, temperatura, pH, vazão, cor, e ainda para controle próprio, óleos e graxas (O&G) (FEPAM, 2003).

De acordo com Cavalcanti e Braile (1993), as características gerais dos efluentes líquidos decorrentes dos vários processos empregados na indústria frigorífica apresentam similaridades. A composição detalhada desses efluentes é influenciada pelos diferentes processos, que podem variar de indústria para indústria, de acordo com os tipos de produtos

fabricados. Pode-se dizer ainda que a carga poluidora e o volume dos efluentes líquidos de qualquer frigorífico dependem dos processos industriais em curso; da quantidade e tipo de carne processada; das condições e tipos de equipamentos utilizados; das práticas de redução da carga poluidora e do volume de efluentes; do gerenciamento e postura da indústria quanto às práticas de gestão ambiental; da quantidade de água utilizada nas operações de limpeza/sanitização e no sistema de refrigeração, dentre outros.

Com base nestes fatores, pode-se concluir que todos os dados relacionados às características físico-químicas dos efluentes devem ser analisados como valores aproximados ou médios, pois variam de forma significativa de frigorífico para frigorífico.

Os valores médios da DQO e DBO de efluentes líquidos industriais de diferentes segmentos que abrangem o setor cárneo podem variar entre 3.500 a 4.500 mg/L e 480 a 3.800 mg/L, respectivamente (FEPAM, 1997). A Tabela 1 apresenta as concentrações médias de DBO e utilização de água em diversos tipos de frigoríficos.

Tabela 1. Volume de água necessário para o processamento de um animal e carga poluidora

Animal	Tipo de matadouro	Volume de água utilizada (L/cabeça)	Carga poluidora (kg DBO/cabeça)	Concentração total de DBO no efluente (mg/L)
Bovino	C/salsicharia	1.000 a 3.000	3,76	1.250 a 3.760
Bovino	S/salsicharia	500 a 2.500	2,76	1.100 a 5.520
Suíno	C/salsicharia	500 a 1.500	0,94	620 a 1.800
Suíno	S/salsicharia	400 a 1.200	0,68	570 a 1.700
Ave	Abatedouro	12 a 15	0,012	480 a 1.000

Fonte: FEPAM, 1997.

b) Conteúdo de óleos e graxas em efluentes frigoríficos

Os óleos e graxas (O&G) originados de fontes naturais são misturas complexas de triglicerídeos contendo diferentes combinações de ácidos graxos, sendo que as concentrações de todos os tipos de triglicerídeos determinam as características físico-químicas dos óleos e gorduras. Atualmente, óleos e gorduras são produzidos em cerca de 100 milhões de toneladas por ano e utilizados principalmente no processamento de alimentos (80%), ração animal (6%) e na indústria oleoquímica (14%) dos quais grande maioria (90%) é destinada para produção de sabão e outros materiais tensoativos (Pereira *et al.*, 2002).

O acúmulo de O&G causa problemas na digestão anaeróbia de efluentes, como toxicidade aos microrganismos (Rinzema *et al.*, 1994). As gorduras e proteínas presentes nos efluentes têm baixa biodegradabilidade, representando sérios problemas no processo biológico aeróbio e anaeróbio; podendo ainda levar ao desenvolvimento de odores e se solidificar a baixas temperaturas, causando danos operacionais (Cammarota *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002). Além disso, O&G adsorvidos na superfície do lodo anaeróbio podem limitar o transporte de substratos solúveis para a biomassa e, conseqüentemente, a taxa de conversão do substrato (Rinzema *et al.*, 1994).

Nos últimos anos, a aplicação de enzimas em processos industriais tem se acentuado, sendo as lipases uma das classes mais estudadas nesse sentido (Jung *et al.*, 2002). Recentemente, o estudo da aplicação de lipases na degradação biológica para remoção de carga lipolítica vem sendo pesquisado com resultados promissores. Os efluentes industriais utilizados na pesquisa são os gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral, na perspectiva de eliminar problemas existentes em sistemas biológicos (Pereira *et al.*, 2002).

2.3.2 Tratamentos de efluentes em indústrias frigoríficas

O lançamento de efluentes não tratados tem sido a causa de sérios danos ao meio ambiente e à saúde pública devido à deterioração dos corpos d' água receptores. Os custos dos métodos de tratamento disponíveis para se atingir padrões estabelecidos pela legislação são elevados e os investimentos nesta área são baixos, como em muitos países em desenvolvimento (Chernicharo, 1997).

A indústria de abatedouros é uma das atividades mais antigas da humanidade. O impacto ambiental deste tipo de indústria cresce consideravelmente, sendo a maior poluição gerada por matéria orgânica em altas concentrações, o que limita alguns métodos de tratamento (Del Pozo *et al.*, 2000).

Os métodos de tratamento de efluentes frigoríficos mais utilizados segundo Vedana *et al.* (1999) são os processos físicos-químicos, onde incluem-se as operações de peneiramento, gradeação, sedimentação, coagulação, cloração, sedimentação/flotação, ajuste de pH e temperatura; e os processos biológicos, sendo mais comuns as lagoas aeradas, anaeróbias, de estabilização, valos de oxidação e outros. Geralmente, o grau de

tratamento exigido, as condições locais, limitação de área, custos de capital e operacional, irão determinar a seleção do sistema a ser adotado.

Todos esses processos reduzem a DBO em 70-95% e os sólidos em suspensão em 80-95%, sendo que cada um desses sistemas tem vantagens e desvantagens (Cavalcanti e Braile, 1993). Qualquer processo biológico de tratamento é considerado econômico se puder ser operado a baixos tempos de retenção hidráulica e a tempos de retenção de sólidos suficientemente longos para permitir o crescimento de microrganismos (Chernicharo, 1997).

Parte da carga orgânica do efluente gerado por indústrias de alimentos pode ser também removida por tratamento físico-químico, contudo o custo destes reagentes é alto e a eficiência de remoção da DQO dissolvida é baixa (Cammarota *et al.*, 2001).

O tratamento biológico de resíduos ocorre inteiramente por mecanismos biológicos, que reproduzem, de certa maneira, os processos naturais que ocorrem em um corpo d' água após o lançamento de despejos. Ocorre, no entanto, o fenômeno de autodepuração em condições controladas e em taxas mais elevadas que nos corpos d' água (Von Sperling, 1996).

Os tratamentos biológicos possuem benefícios claros devido ao potencial de utilização dos seus subprodutos geralmente ricos em nutrientes, como fertilizantes orgânicos de qualidade para as plantas (Paredes *et al.*, 2002). No caso de processos de tratamento físico-químico de efluentes, os resíduos gerados como o flotado, normalmente são lançados em aterros sanitários tornando-se um outro tipo de poluição ambiental. A flotação tem como objetivo separar as gorduras e a parte dos sólidos em suspensão, conduzindo o efluente, com um menor teor de gordura, para o tratamento secundário (biológico). Alguns autores sugerem a biorremediação deste tipo de resíduo anaerobicamente ou aerobicamente através de culturas bacterianas que degradem lipídios (Mongkolthanaruk e Dharmstithi, 2002).

a) Sistemas aeróbios

No sistema aeróbio, as bactérias que decompõem a matéria orgânica necessitam de oxigênio suficiente para respiração microbiana, além de nutrientes e condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Em frigoríficos geralmente se utilizam lagoas aeradas ou aeróbias. Nas primeiras, o oxigênio é introduzido mecanicamente e a agitação deve ser suficiente para manter os sólidos em suspensão e evitar degradação anaeróbia. Nas lagoas aeróbias a aeração é natural e estas são de baixa profundidade para evitar regiões de

anaerobiose. Quando utilizadas para tratamento de resíduos de frigoríficos são freqüentemente precedidas por lagoas anaeróbias ou aeradas, devido à sua baixa taxa de aplicação, para minimizar odores e propiciar um alto grau de tratamento. Desta forma, necessitam de grandes áreas para implantação (Cavalcanti e Braile, 1993).

No caso dos filtros biológicos de alta taxa com recirculação, a principal finalidade da utilização em despejos frigoríficos é diminuir as cargas e os picos durante o processo. Estes sistemas em muitos casos são usados antecedendo um sistema de lodo ativado, pois propiciam apenas uma redução inicial de DBO. Já os biodiscos ou discos biológicos rotativos utilizam os organismos aeróbios presentes naturalmente no efluente, que ao aderir aos discos reduzem a matéria orgânica obtendo fonte de oxigênio através do escoamento do efluente. São utilizados como depuradores em resíduos frigoríficos, portanto, sua instalação normalmente é a jusante de uma lagoa anaeróbia que funcionaria como pré-tratamento (Cavalcanti e Braile, 1993).

Os sistemas de lodos ativados são um dos mais eficientes processos para tratamento de efluentes frigoríficos, como em casos que o efluente ainda possui DBO muito alta e nitrogênio amoniacal (Cavalcanti e Braile, 1993). O tratamento aeróbio de efluentes através de lodos ativados destaca-se em relação a outros pelo fato de as bactérias aeróbias serem menos susceptíveis à inibição por diversas substâncias químicas; o processo imediato de partida das unidades; o curto tempo de adaptação do lodo ao resíduo de interesse; a não necessidade de pós-tratamento; a compreensão da bioquímica e da microbiologia do processo aeróbio; a menor possibilidade de geração de efluente com aspecto desagradável; a grande flexibilidade de operação; a elevada eficiência de tratamento e o porte relativamente pequeno das unidades (Von Sperling, 1997).

No entanto, podem ocorrer problemas no caso de efluentes que contêm elevada quantidade de óleos e graxas, como os de frigoríficos e laticínios. Estes são degradados muito lentamente, pois as gorduras geram problemas nos sistemas de bombeamento e aeração, provocando o desenvolvimento de microrganismos filamentosos (gênero *Nocardia* e *Microthrix*), fenômeno conhecido como "bulking" e/ou promovem formação de mousses estáveis na superfície do tanque de aeração, que dificultam a floculação e a sedimentação do lodo e bloqueiam as trocas gasosas indispensáveis à degradação biológica. Pesquisas revelam que a utilização de enzimas nestes casos surge como um eficiente avanço de tecnologia em tratamento de efluentes convencionais (Jung *et al.*, 2002).

b) Sistemas anaeróbios

As tendências atuais são adotar tecnologias de tratamentos disponíveis mais confiáveis e mais baratas, de acordo com as condições locais específicas. Com base nestes aspectos, surge como proposta promissora, a utilização do processo de tratamento anaeróbio (Chernicharo, 1997).

O sistema anaeróbio ocorre através da fermentação bacteriana de substâncias biodegradáveis produzindo gás metano e dióxido de carbono na ausência de oxigênio livre. A digestão ocorre através de três grupos de microrganismos: Bactérias hidrolíticas (transformam orgânicos complexos em orgânicos simples), bactérias formadoras de ácidos (formam os ácidos graxos voláteis) e as homoacetogênicas, hidrogenogênicas e metanogênicas sub-divididas em acetoclásticas e hidrogenotróficas (formadoras de gases acetato, dióxido de carbono, hidrogênio e metano) em sistemas anaeróbios (Chernicharo, 1997, Sterling Jr. *et al.*, 2001). A microbiologia e as etapas constituintes do processo de digestão anaeróbia foram muito estudadas nos últimos vinte anos com contribuições relevantes, estando disponíveis revisões detalhadas deste tema (Leal, 2000).

Os processos anaeróbios tiveram grande difusão a partir da década de oitenta, com aplicações no tratamento de efluentes de cervejarias, agro-industriais e esgoto doméstico. Um sumário das vantagens e desvantagens desse processo é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos processos anaeróbios

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Baixa produção de sólidos, cerca de 5 a 10 vezes inferior à que ocorre nos processos aeróbios; • Baixa demanda de área; • Produção de metano, um gás combustível de elevado teor calorífico; • Possibilidade de preservação da biomassa, sem alimentação do reator, por vários meses; • Tolerância a elevadas cargas orgânicas; • Aplicabilidade em pequena e grande escala; • Baixo consumo de nutrientes. 	<ul style="list-style-type: none"> • As arqueas metanogênicas são suscetíveis à inibição por um grande número de compostos; • A partida do processo pode ser lenta na ausência de lodo de semeadura adaptado; • Alguma forma de pós-tratamento é usualmente necessária; • A bioquímica e a microbiologia da digestão anaeróbia são complexas e ainda precisam ser estudadas; • Possibilidade de geração de maus odores, porém controláveis; • Possibilidade de geração de efluente com aspecto desagradável; • Remoção de nitrogênio, fósforo e patogênicos insatisfatória.

Fonte: Chernicharo (1997)

Os principais sistemas anaeróbios utilizados no tratamento de águas residuárias podem ser divididos em dois grandes grupos:

- ⇒ Sistemas convencionais: são dimensionados com elevados tempos de retenção hidráulica, o que resulta na construção de reatores de grandes volumes. Exemplos: digestores anaeróbios, tanques sépticos, lagoas anaeróbias e outros (Chernicharo, 1997).
- ⇒ Sistemas de alta taxa: desenvolvidos a partir da necessidade de tratar esgotos industriais de elevada carga orgânica. Esses reatores retêm grandes quantidades de biomassa em seu interior, muitas vezes imobilizadas, possibilitando o emprego de altos tempos de retenção celular e baixos tempos de retenção hidráulica, o que leva à diminuição do volume do tanque. Exemplos: reatores de leito fixo, de leito expandido, de leito expandido/fluidificado; reatores de dois estágios, de chicanas, UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor”) e reator de contato (Rajeshwari *et al.*, 2000, Chernicharo, 1997).

Processos anaeróbios podem competir favoravelmente com os processos aeróbios tradicionais para o tratamento de efluente de indústria de alimentos, desde que este tenha atividade suficientemente concentrada utilizável, ou seja, alta temperatura e biodegradabilidade (Berardino *et al.*, 2000), sendo o resíduo orgânico considerável biodegradável em índices de umidade entre 85-90% (Salminen e Rintala, 2002).

Em princípio, todos os compostos orgânicos podem ser degradados pela via anaeróbia, sendo que o processo se mostra mais eficiente e econômico quando os dejetos são facilmente biodegradáveis (Chernicharo, 1997). Desta forma, é indicado para casos em que o resíduo a ser tratado contenha altas cargas de DBO e de sólidos em suspensão. (Vidal *et al.*, 2000).

Durante as duas últimas décadas, os processos de digestão anaeróbia vêm sendo aplicados ao tratamento de resíduos de indústrias de alimentos, por exemplo, efluentes da fabricação de açúcar, amido, cervejaria e de sorvete (efluente gorduroso), entre outros. As vantagens do uso de digestores anaeróbios para tratamento de resíduos orgânicos são bem documentadas. No entanto, o controle operacional pode ser dificultado pela complexidade das interações dos microrganismos (Hu *et al.*, 2002).

O tratamento de efluentes de abatedouro através de sistemas anaeróbios pode ser problemático, devido à ocorrência de processos como a suspensão da biomassa (arraste)

devido ao alto conteúdo de gordura. No entanto, algumas modificações na disposição e funcionamento bem como adaptações às necessidades do tratamento fazem destes processos eficientes sugestões de tratamento para este tipo de resíduo (Del Pozo *et al.*, 2000).

De qualquer forma, os processos de digestão anaeróbia são de grande interesse por serem bem conhecidas as suas vantagens. Diversos tratamentos anaeróbios convencionais vêm sendo usados abundantemente em indústrias de alimentos. Pesquisas comprovam que mesmo ocorrendo alguns problemas operacionais como flotação do lodo ou toxicidade de compostos intermediários formados, estes tipos de resíduos podem ser efetivamente tratados por processos anaeróbios (Vidal *et al.*, 2000).

Neste caso, os reatores mais indicados incluem sistemas anaeróbios de contato, onde o efluente pode ser utilizado sem a realização de uma etapa de pré-tratamento. Quando da utilização de um reator de alta taxa (por exemplo, UASB “Upflow Anaerobic Sludge Blanket”), uma etapa de pré-tratamento para remoção dos sólidos suspensos e gorduras é essencial antes do tratamento anaeróbio (Rajeshwari *et al.*, 2000).

O reator anaeróbio de contato é um dos mais usados na Europa, devido ao desenvolvimento de seu design e das características operacionais que proporcionam uma adequada mistura e, conseqüentemente, uma melhor performance frente a outros tipos de reator como no tratamento de resíduo de sorveteria (Hu *et al.*, 2002, Sterling Jr *et al.*, 2001, Björnsson *et al.*, 2001).

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, têm 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 (Leal, 2000).

O interesse em fontes de energia alternativa resulta em mais um importante atrativo do processo anaeróbio, pois a produção do gás metano pode ser usada para substituir a energia de combustível fóssil, e assim reduzir a emissão de dióxido de carbono ao meio ambiente (Rajeshwari *et al.*, 2000, Salminen e Rintala, 2002, Vorkamp *et al.*, 2001, Björnsson *et al.*, 2001). O sistema anaeróbio pode ser viabilizado ainda pela implantação de reatores de segunda geração, os digestores de alta taxa, os quais possibilitam a remoção, em alguns casos, de 24Kg DQO/m³ dia (Rajeshwari *et al.*, 2000).

O conhecimento de alguns aspectos fundamentais como a fase líquida (externa) e a fase sólida (interna), transferência de massa, parâmetros cinéticos intrínsecos e a hidrodinâmica dos reatores podem ser úteis para melhorar o design e os processos de operação dos reatores, sendo o processo de transferência de massa um dos mais importantes fenômenos a ser estudado (Sarti et al., 2001).

A transferência de massa da fase líquida em reatores anaeróbios (HAIB “Horizontal Flow Anaerobic Immobilized Biomass”, UASB “Upflow Anaerobic Sludge Bed”, EGSB “Expanded Granular Sludge Bed”) é um fator relevante devido ao seu funcionamento requerer para produção de metano mistura suficiente e contato entre o substrato e a biomassa. Desta forma, através da diminuição da resistência da transferência de massa da fase líquida obtém-se um aumento da eficiência do processo (Sarti *et al.*, 2001, Rinzema *et al.*, 1993).

O efluente produzido por refinarias de óleo alimentício e indústrias de laticínios usualmente contém concentração de óleos e graxas maiores que 100 mg.L^{-1} . O tratamento anaeróbio destes substratos consiste em realizar a hidrólise de óleos e graxas em ácidos graxos de cadeia longa que são degradados em acetato e glicerol (Hwu *et al.*, 1998a). Em usina de óleo de palma tem-se referência de tratamento do resíduo contendo compostos lignocelulósicos e uma mistura de carboidrato e óleo através da digestão anaeróbia (Oswal *et al.*, 2002).

A flutuação de carga de matéria orgânica pode ser um problema para a biodegradabilidade destes materiais. No entanto, pesquisas demonstraram que na digestão anaeróbia de efluente industrial de confeitaria, a utilização de um filtro anaeróbio apresentou uma grande habilidade de adaptação da biomassa a uma nova fonte de carbono bem como a flutuações de carga orgânica e alimentações diluídas (Berardino *et al.*, 2000).

Outras razões para o desequilíbrio dos digestores anaeróbios incluem mudanças de temperatura, pH, presença de material tóxico como fenóis, a mudança na alimentação e um aumento repentino de carga orgânica. O pH ideal para produção de metano é entre 6,8 e 7,2; enquanto a temperatura deve ficar nos níveis adequados a bactérias mesofílicas e termofílicas (Sterling Jr. *et al.*, 2001, Rajeshwari *et al.*, 2000).

O efeito da temperatura no tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro através de reator ASBRs (“Anaerobic Sequencing Batch Reactors”) foi avaliado pela remoção de DQO e da produção de metano na faixa de 20 a 30°C. Remoções de 90,8%, 88,7% e 84,2% de DQO foram obtidas a 30°C, 25°C e 20°C, respectivamente. Com relação à produção de

metano, a diminuição da temperatura de 30°C para 25°C não afetou significativamente a taxa específica de produção de metano, sendo esta variável afetada, principalmente, pela concentração de biomassa (Massé e Masse, 2001).

Em casos da necessidade de tratamento sazonal, como em indústrias de açúcar de milho, os digestores anaeróbios são vantajosos pelo fato das arqueas metanogênicas não sofrerem deterioração a 15°C, possibilitando assim a preservação do lodo anaeróbio por longos períodos. Para ativação em processos, além da temperatura e pH ideais, as arqueas metanogênicas necessitam ainda de nutrientes, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, manganês, cobalto, níquel, ferro e enxofre, em pequenas quantidades para evitar efeito contrário, como inibição da formação de metano (Rajeshwari *et al.*, 2000).

Os processos de digestão anaeróbia de efluentes de abatedouro entre 20 a 30°C são geralmente lentos devido à alta concentração de sólidos suspensos e partículas de gorduras, características comuns neste tipo de efluente, sendo a concentração de lipídios o fator limitante no tratamento dos sólidos. Os orgânicos solúveis são usualmente metanizados antes que os sólidos em suspensão sofram a hidrólise e a completa degradação das partículas, o que aumenta o tempo de retenção hidráulica necessário, sendo as partículas de lipídios as maiores causadoras deste problema. Caso os sólidos não sejam degradados, ocorre um acúmulo destes dentro da camada de biomassa, especialmente gorduras, resultando em um sério impacto no desempenho do reator anaeróbio de alta taxa. A aplicação de pré-tratamento a fim de proporcionar a hidrólise de partículas de gordura pode acelerar a biodegradação em reatores anaeróbios de efluentes como o de frigoríficos e plantas de embalagem de carne (Masse *et al.*, 2001a, Masse *et al.*, 2003).

O melhoramento da eficiência da digestão anaeróbia pode ser obtido pelo aprimoramento dos digestores já existentes através da incorporação de técnicas atuais. Fatos como o “arraste” da biomassa podem ser evitados ao se acoplar no próprio digestor membranas para reter a biomassa, possibilitando assim o tratamento de resíduos com elevada concentração de matéria orgânica (Rajeshwari *et al.*, 2000). Filtros anaeróbios são uma alternativa para tratamento de efluentes de abatedouros, pela eficiência de remoção de carga orgânica. No entanto, são necessárias limpezas periódicas com o intuito de evitar entupimentos (Del Pozo *et al.*, 2000). A utilização de suportes corrugados para fixação de microrganismos demonstra vantagens quanto à remoção de matéria orgânica, devido à habilidade de recuperação do biofilme quando as condições favoráveis são retomadas, após choques de carga ou oscilações de vazão (Nikolaeva *et al.*, 2002; Del Pozo *et al.*, 2000).

A utilização de um consórcio de bactérias pode ser uma opção para tratamento de efluente rico em lipídios visando evitar os problemas convencionais. Esta técnica mostrou-se promissora em pesquisas que visam aumentar a biodegradação em tratamento biológico anaeróbio, demonstrando que *Pseudomonas aeruginosa*-LP₆₀₂; *Bacillus sp.*-B₃₀₄ e *Acinetobacter calcoaceticus*-LP₀₀₉ são eficientes na redução de DBO e do conteúdo de lipídios, provavelmente devido às bactérias LP₀₀₉ e LP₆₀₂ serem produtoras de lipase, facilitando a biodegradação de lipídios (Mongkoltharuk e Dharmstithi, 2002).

Para tratamentos de resíduos domésticos e industriais, nas últimas duas décadas, o sistema de alta taxa mais utilizado é o reator UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor”), devido às vantagens como baixo custo e adequada eficiência do processo (Sarti *et al.*, 2001; Hawkes *et al.*, 1995, Hwu *et al.*, 1998b). No entanto, quando o resíduo é complexo (insolúvel ou inibitório), contém lipídios e ou ácidos graxos de cadeia longa, algumas falhas podem ocorrer, como por exemplo a flotação de grânulos do lodo e matéria graxa, diminuindo a carga do reator, ou a inibição dos microrganismos anaeróbios pelos ácidos graxos de cadeia longa. O aumento da vazão e diminuição do tempo de retenção hidráulica, juntamente com uma demasiada camada de lodo granular pode melhorar a mistura e promover maior contato entre substrato e biomassa, e em caso de “arraste” pode-se acoplar um tubo para coletar matéria graxa e/ou biomassa (Hwu *et al.*, 1998b).

Quando os lipídios representam 50% ou mais para a DQO do resíduo, o reator UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor”) pode se tornar impróprio para o tratamento, uma vez que pode ocorrer o “arraste” e perda da eficiência de contato entre o substrato e a biomassa. O reator EGSB (“Expanded Granular Sludge Bed”) surge como um reator UASB melhorado, pois leva em consideração a necessidade do tipo de resíduo a ser tratado podendo ser uma alternativa promissora (Hwu *et al.*, 1998b, Rinzema *et al.*, 1993).

A comunidade microbiana em digestores anaeróbios pode ser analisada quanto à sua atividade metabólica através de indicadores no próprio sistema. Os indicadores mais comumente usados são: taxa de produção de gás, a composição dos gases, pH, alcalinidade e concentração de ácidos graxos voláteis (Björnsson *et al.*, 2001). O monitoramento da variação da produção do metano é uma informação dinâmica dos diferentes tipos de colonização e fixação da biomassa em reatores anaeróbios de filme fixo (Michaud *et al.*, 2002).

Os reatores anaeróbios são utilizados também na avaliação da remoção de nitrogênio da indústria frigorífica de aves e suínos, pois este tipo de resíduo costuma conter alto teor de proteína, a qual é responsável pela alta concentração de nutrientes,

principalmente o nitrogênio em suas diferentes formas. O sistema é composto por dois reatores de fluxo contínuo em série, um reator híbrido (anaeróbio/anóxico) e um tipo filtro biológico de fluxo ascendente com aeração e sistema de reciclo para nitrificação e desnitrificação do resíduo. A eficiência global do sistema na remoção do nitrogênio foi de 60% próximo do valor máximo calculado teoricamente (64,3%) para razão de reciclo estudada ($R=1,8$) (Teixeira *et al.*, 2002).

Processos inibitórios para a biodegradação anaeróbia de resíduos

As gorduras, carboidratos e proteínas presentes em efluente de indústria de laticínios, por exemplo, pode causar problemas na biodegradabilidade anaeróbia deste efluente. Com intuito de melhorar a biodegradabilidade, testes com efluentes sintéticos contendo estes tipos de matéria orgânica foram realizados por Vidal *et al.* (2000), possibilitando observar que a biodegradação de resíduos ricos em gordura é mais lenta que os ricos em carboidratos. A geração de compostos intermediários durante a biodegradação anaeróbia de efluentes contendo alta concentração de matéria orgânica pode causar problemas no desempenho do processo anaeróbio, como:

- ⇒ Flotação do lodo: pode ocorrer devido ao desenvolvimento de lodo com diferentes características físicas ou fraca atividade microbiana, devido à presença de gordura, podendo resultar no arraste das células e/ou lentidão do processo devido à dificuldade de transporte de substrato através da camada de gordura aderida no lodo, causando baixa conversão em gás metano. Comportamento similar foi observado em efluente rico em proteína e em reatores do tipo UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor”) onde, devido à adsorção dos ácidos graxos de cadeia longa no lodo, o sucesso do sistema anaeróbio de alta taxa não foi atingido (Vidal *et al.*, 2000, Hu *et al.*, 2002, Rinzema *et al.*, 1993, Hwu *et al.*, 1998b).
- ⇒ Formação de espuma: ocorre em resíduos que contenham altos conteúdos de gordura e proteína. A digestão anaeróbia pode ser perturbada pela formação de uma camada de espuma de gordura após 3 dias, causando a ineficiência do processo (Hu *et al.*, 2002). Em casos de sistemas que contenham coletor de gás, a espuma torna-se um problema devido a possíveis entupimentos do sistema. A formação de grânulos brancos na superfície foi observada em sistemas de tratamentos com reator EGSB (“Expanded Granular Sludge Bed”), provavelmente devido ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa aderidos na camada de lodo (Hwu *et al.*, 1998b).

- ⇒ Baixa conversão em gás metano: qualquer dificuldade no processo de biodegradação causa decréscimo na formação de metano. Produtos específicos da degradação de carboidratos como propionato, etanol ou acetato acumulados lideram a inibição de diversas espécies microbianas (Vidal *et al.*, 2000). O acúmulo de lipídios no lodo anaeróbio diminui a eficiência devido ao fenômeno de flotação e arraste da biomassa (Del Pozo *et al.*, 2000).
- ⇒ Inibição de arqueas metanogênicas: o destino dos lipídios é particularmente importante para estabilidade do processo anaeróbio, pois o aumento da concentração de ácidos graxos livres na solução pode ter um irreversível efeito inibitório para arqueas metanogênicas (Masse *et al.*, 2001b, Hu *et al.*, 2002, Rinzema *et al.*, 1994, Hwu *et al.*, 1998a). Existem indicativos que o ácido oléico começa a inibir as arqueas metanogênicas a partir de 280 mg.L⁻¹, (Masse *et al.*, 2001b). Já o ácido esteárico em concentrações de 100mg.L⁻¹ não inibe a metanogênese acetoclástica. A metanogênese hidrogenotrófica é tanto inibida pelo ácido oléico quanto esteárico a 21°C (Lalman e Bagley, 2001). O ácido linoleico, importante constituinte de óleos vegetais, em concentrações de 30 mg.L⁻¹ a 21°C, inibe a metanogênese acetoclástica e ligeiramente a metanogênese hidrogenotrófica (Lalman e Bagley, 2000, Alves *et al.*, 2001). A inibição por ácidos graxos voláteis foi caracterizada em experimentos utilizando acetato como sinalizador, por ser este o precursor de mais de 75% da produção de metano na digestão anaeróbia. O propionato e butirato são ácidos graxos intermediários que podem causar inibição no crescimento de diversas espécies de microrganismos, proporcionando queda da produção de metano. Estes ácidos graxos intermediários são usualmente convertidos em acetato e hidrogênio quando o sistema estiver em bom funcionamento (Aguilar *et al.*, 1995). Concentrações de nitrogênio amoniacal entre 50 e 200 mg. L⁻¹ são estimulantes para as arqueas metanogênicas, mas acima desta faixa podem ter efeitos tóxicos para este tipo de bactérias (Vidal *et al.*, 2000).

O resíduo de uma indústria de sorvetes foi testado quanto à biodegradabilidade anaeróbia via filtros anaeróbios. Ao final do processo constatou-se uma pobre retenção de biomassa, causada possivelmente pelo conteúdo de gordura existente no efluente, concluindo-se que realmente a quantidade de gordura é um fator limitante na performance do reator (Hawkes *et al.*, 1995). Outro fator limitante, constatado durante a digestão anaeróbia de resíduo de abatedouro de aves, foi a concentração de propionato que inibe a etapa de hidrólise do resíduo (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

⇒ Alteração do pH: a degradação de efluente rico em carboidratos produz amônia livre em concentrações perto dos níveis inibitórios ($62,2 \text{ mg amônia.L}^{-1}$), mas em casos como na biodegradação de efluentes de laticínios que contêm alto teor de gordura, esta produção facilita a regulação da faixa de pH alterado frente ao acúmulo de ácidos graxos voláteis. No entanto, o aumento de pH causado pela forma não ionizada da amônia é prejudicial ao processo devido à alteração que provoca no metabolismo dos microrganismos (Vidal *et al.*, 2000). Verificou-se que pequenos aumentos na concentração de nitrogênio amoniacal durante a digestão anaeróbia de esterco de bovino resultam em um aumento de gás hidrogênio e metano, mas grandes aumentos causam a inibição da produção dos mesmos bem como redução de sólidos voláteis do sistema. Baseados nos resultados, a concentração de gás hidrogênio pode ser usada como parâmetro de monitoramento do aumento da amônia (Sterling Jr. *et al.*, 2001).

Os ácidos graxos de cadeia longa, produzidos pela hidrólise de lipídios causam efeitos inibitórios nos microrganismos mesófilos e termófilos em digestores anaeróbios. No entanto, a toxicidade do ácido oléico inibe mais a formação de acetato através da metanogênese em condições termofílicas (55°C) e lodo floculento do que em condições mesofílicas ($40\text{-}30^{\circ}\text{C}$) e lodo granular. Desta forma, é sugerida a aplicação de microrganismos mesofílicos em processos de digestão anaeróbia de efluentes gordurosos, como o efluente de laticínio e de indústria de óleo de oliva (Hwu e Lettinga, 1997). A pré-adaptação de lodos em reatores de batelada alimentada durante o primeiro período de operação resulta em uma alta tolerância à toxicidade do ácido oléico, resultando em um bom funcionamento do sistema. Surge a possibilidade de utilização de sistemas em ciclos de degradação por adsorção da matéria orgânica em tratamentos de efluentes com alto conteúdo de lipídios. Já o sistema de lodo imobilizado é desaconselhável para estes casos (Alves *et al.*, 2001). Outras pesquisas indicam que um lodo anaeróbio aclimatado com culturas que convertem rapidamente os ácidos produzidos, evita o fenômeno da inibição, bem como a aplicação de lodo do tipo granular, indicado para tratamento de lipídios (Aguilar *et al.*, 1995, Hwu *et al.*, 1996).

O efluente de abatedouro contém quantidades significantes de nitrato e sulfato, sendo de extrema importância a informação sobre a influência destes compostos na biometanização deste efluente. O sulfato é considerado inibitório para metanogênese em digestores anaeróbios tornando-se um importante fator de efeito tóxico (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2002).

Técnicas para melhorar a eficiência dos biodigestores incluem instalações de caixas de gordura ou flutuadores, tratamentos com adição de álcalis ou enzimas específicas como hidrolases, principalmente lipases pelo fato da especificidade, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de lipídios. O pré-tratamento enzimático apresenta algumas vantagens, tais como o controle dos produtos, que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de sub-produtos tóxicos; condições moderadas de operação; redução de custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (Masse *et al.*, 2001b).

Masse *et al.* (2001b) conseguiu resultados que indicam que o pré-tratamento das partículas de gordura suína utilizando NaOH pode ser realizado, indicando ser necessário 4 horas de reação e concentração de 150-300 meq L⁻¹ de NaOH para obtenção de 73% de redução das partículas. No entanto não houve diminuição na concentração de DQO. Doses maiores de NaOH aumentariam o pH do pré-tratamento, o que seria desaconselhável. Segundo Karlsson (1990) o tratamento de lodo ativado com NaOH reduz até 26% de carboidratos, 73% de proteína e 28% de lipídios, enquanto o tratamento biológico é capaz de reduzir cerca de 40% de carboidratos, 20% de proteína e não exibindo efeitos mensuráveis na redução de lipídios, evidenciando sua dificuldade para tratamentos de frações lipídicas. Este comportamento indica a necessidade de alternativas como o pré-tratamento enzimático para aumentar a hidrólise de gorduras e facilitar o tratamento anaeróbio.

2.4 Aplicação de Enzimas no Tratamento de Resíduos

A utilização de enzimas no tratamento de efluentes industriais foi proposta inicialmente nos anos 30 (Aitken, 1994). O desenvolvimento de aplicações como alternativa em processos de tratamento de sistemas sólidos, líquidos e de efluentes perigosos estão sendo pesquisadas, devido à grande variedade de enzimas provenientes de plantas e microrganismos (Karam e Nicell, 1997). As razões do sucesso das enzimas podem ser resumidas pelo fato destas serem catalisadores eficientes, precisos, práticos e por contribuírem para o desenvolvimento sustentável (Novo Nordisk, 1992) e auxiliar o processo de degradação microbiana, catalisando reações de hidrólise ou de transformação de resíduos tóxicos em inertes.

As enzimas são proteínas e estão presentes em todas as células vivas onde desempenham uma função vital, controlando os processos metabólicos, através de sua capacidade catalítica. Estes catalisadores não são consumidos durante o processo,

podendo ser reutilizados, e ao contrário de catalisadores inorgânicos, são muito específicas. Atuam sob condições amenas de pH, temperatura, pressão, o que significa redução de custos operacionais. Para certas aplicações, foram desenvolvidas enzimas mais resistentes à temperatura, porém nenhuma enzima resiste por muito tempo à temperaturas acima de 100°C (Novo Nordisk, 1992).

Algumas aplicações potenciais de enzimas no tratamento de resíduos envolvem (Karam e Nicell, 1997):

- ⇒ Remoção de fenóis: peroxidases e polifenol oxidases, produzidas por fungos e plantas;
- ⇒ Remoção de celulose no resíduo de polpa e papel: celulasas, produzidas por fungos e microrganismos;
- ⇒ Remoção de cianeto, resíduo de pesticidas: Cianidase e cianeto hidrolase, produzidas por fungos;
- ⇒ Resíduos de indústrias alimentícias, remoção e reprocessamento de resíduos de proteína : proteases, produzidas por vegetais, animais e microrganismos;
- ⇒ Remoção de gorduras: lipases, produzidas por animais, vegetais e microrganismos.

As vantagens do tratamento enzimático de efluente, frente aos tratamentos convencionais são (Karam e Nicell, 1997):

- ⇒ Aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes;
- ⇒ Operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade;
- ⇒ Não há efeitos de choque por carga de poluentes;
- ⇒ Não há necessidade de aclimatação de biomassa;
- ⇒ O volume de lodo formado é menor, uma vez que não há geração de biomassa;
- ⇒ Simplicidade e facilidade no controle do processo.

Apesar do grande potencial, existem diversas situações nas quais a utilização de enzimas pode não consistir em uma ferramenta adequada para o tratamento de resíduos. O tratamento biológico freqüentemente é mais econômico e degrada adequadamente efluentes contendo teor de compostos orgânicos entre médio e alto. Nos casos em que se deseja remover várias substâncias de características químicas diversas, em que seria necessário utilizar diversas enzimas, esta forma de tratamento pode não ser viável. Em

algumas situações, a aplicação de enzimas pode até mesmo ser prejudicial, quando a toxicidade do efluente é aumentada após o tratamento enzimático (Aitken *et al.*, 1994).

Além disso, a instabilidade térmica, susceptibilidade ao ataque por proteases, inibição da atividade e dificuldade de separação e reutilização do catalisador livre ao final da reação são questões que dificultam a aplicação das enzimas. Porém, um dos maiores entraves para a difusão da aplicação de enzimas em tecnologias ambientais é o custo relativamente elevado desses biocatalisadores. Assim, justifica-se a busca de processos de produção de enzimas que apresentem baixo custo, como é o caso da fermentação em meio sólido, através da utilização de rejeitos agroindustriais como torta de babaçu e soja como substratos (Leal, 2000, Vargas, 2004).

Efluentes de frigoríficos contêm alto teor de sólidos em suspensão, especialmente gorduras, dificultando a aplicação de tratamentos anaeróbios nestes efluentes (Masse *et al.*, 2001a). As lipases podem ser aplicadas no tratamento de efluentes com alto teor de gorduras como os gerados pela indústria de carnes, balas e laticínios (Leal, 2000), e, como na maioria das vezes são desnecessárias ao final da reação, um processo econômico seria a aplicação das lipases na forma imobilizada (Malcata *et al.*, 1992).

2.4.1 Lipases

As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) e são hidrolases que catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos, ligação presente em acilgliceróis (Leal *et al.*, 2002, Balcão *et al.*, 1996) e tri, di e monoglicerídeos, presentes na interface óleo-água, para liberar ácidos orgânicos e glicerol (Vonderwulbecke *et al.*, 1992, Balcão *et al.*, 1996, Linko *et al.*, 1998). Enzimas lipolíticas são assim definidas como hidrolases de ésteres contendo ácidos graxos de cadeia longa, saturados ou insaturados, com doze ou mais átomos de carbono. A reação lipolítica é reversível e, portanto, as lipases podem catalisar a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol sob certas condições (Oliveira *et al.*, 1999).

A aplicação de lipases é particularmente importante devido ao fato da hidrólise ser específica em óleos e graxas, que é de grande interesse para diferentes aplicações industriais (Leal *et al.*, 2002). O processo necessita da formação da interface e a absorção da enzima nesta interface óleo-água. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas (Oliveira *et al.*, 1999).

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa entre 30 e 40°C, e embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função da origem. As enzimas de origem microbiana são, em geral, mais estáveis. Usualmente, lipases são ativas em uma ampla faixa de pH, apresentando uma alta atividade na faixa de pH 5 a 9, com um máximo situado entre 6 e 8 (Uhlig, 1998).

As lipases são encontradas na natureza em ampla escala filogenética, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e também a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificados que as produzem de forma endógena ou exógena. A obtenção de lipases através de processos fermentativos tem sido a principal rota de produção uma vez que estes processos apresentam maior facilidade de controle e aumento da capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido (Balcão *et al.*, 1996), além de serem em sua maioria extracelulares, facilitando os processos de extração e purificação o que confere uma maior estabilidade às mesmas (Jung *et al.*, 2002). A especificidade das lipases é determinada pelas características moleculares da enzima, sendo que algumas preparações enzimáticas podem conter uma ou mais lipases com diferentes especificidades; pela estrutura do substrato ou por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato ou à própria estrutura conformacional da enzima (Leal, 2000).

Apesar das lipases serem utilizadas industrialmente há várias décadas, o número de aplicações e a quantidade de lipases manufaturadas são limitados, mesmo assim, na biocatálise em sínteses orgânicas é um dos grupos mais estudados (Linko *et al.*, 1998). Industrialmente, as lipases podem ser aplicadas em detergentes, modificação de óleos e gorduras industriais, na indústria farmacêutica e química fina. Na indústria alimentícia, as lipases podem ser utilizadas com a finalidade de aprimorar o aroma e a textura dos alimentos, como na aceleração dos processos de maturação de queijos e desenvolvimento de aromas e sabores (Leal, 2000), pois os ácidos graxos produzidos através de hidrólise de triglicerídeos são os maiores contribuidores para o desenvolvimento das características de aroma em queijos (Kondyli *et al.*, 2003);

Na hidrólise de óleos e graxas em resíduos, as lipases podem ser empregadas no tratamento de efluentes com alto teor de gorduras como os gerados pela indústria de carnes, balas e laticínios. A aplicação de pré-tratamentos para hidrolisar os sólidos em suspensão, especialmente gorduras, pode melhorar a digestão anaeróbia (Masse *et al.*, 2001a).

As lipases podem ainda encontrar aplicação na indústria de couro, para retirar a camada adiposa do couro (Teles *et al.*, 2001); na limpeza de sistemas de membranas

(Maartens *et al.*, 1996a); na alcóólise de óleos vegetais, produção de poliésteres orgânicos e aromáticos e na formação de compostos que diminuem a viscosidade do biodiesel (Linko *et al.*, 1998).

Em um futuro próximo, o tratamento de resíduos também deverá representar um campo de vasta aplicação de enzimas, seja na prevenção, limpeza ou no tratamento de filmes gordurosos (Leal, 2000). Uma vasta gama de aplicações e a tendência crescente do mercado de lipases torna imperativa a necessidade de encontrar, a partir de seleção de microrganismos, novas lipases com características desejáveis e interessantes, tornando imprescindível o desenvolvimento de cepas mais produtivas, como a cepa selvagem de *Penicillium restrictum*, encontrada em rejeitos da produção industrial de óleo de babaçu (Freire, 1997). A idéia da utilização de lipases nestes campos não é nova, mas sua utilização prática não tem sido maior devido principalmente aos custos de produção (Malcata *et al.*, 1992). A produção de lipases de baixo custo, poderia ser obtida através da utilização de substratos alternativos como resíduos da agroindústria, bem como novos microrganismos produtores de lipases (Vargas, 2004).

2.4.2 Hidrólise enzimática de resíduos líquidos utilizando lipases

A hidrólise, síntese de ésteres e reação de interesterificação de lipídios através de lipases vêm sendo investigada exaustivamente nas últimas três décadas. Recentemente, a tendência dos estudos está voltada para reações de quebra de gorduras através da utilização de lipases microbianas em sistemas de reações contínuas buscando a mais eficiente produção de ácidos graxos, através de processos brandos em termos de pH e temperatura (Kolossváry, 1996, Bouwer *et al.*, 1997, Malcata *et al.*, 1992).

A lipase catalisa a hidrólise completa de vários óleos naturais em ácidos graxos e glicerol, assim como a hidrólise de gordura animal (Fadiloglu e Soylemez, 1997). Sugere-se que o aumento na taxa de hidrólise e por conseqüência, da biodegradabilidade de partículas de matéria orgânica seja determinada pela adsorção das enzimas hidrolíticas na superfície biodegradável (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Pesquisas prévias sugerem a aplicação da hidrólise no pré-tratamento de efluente de abatedouro para redução do tamanho das partículas de gordura acelerando o posterior tratamento anaeróbio do efluente. Lipases de diferentes origens foram testadas, sendo a lipase pancreática PL-250 a que mostrou-se mais eficiente na redução do tamanho de partículas de gordura suína. Quanto às partículas de gordura bovina, obteve-se redução de

70% de diâmetro após 7 horas de pré-tratamento, frente a 40% da suína, sinalizando preferência da enzima por triglicérides de cadeias saturadas e monoinsaturadas do que por poliinsaturadas (Masse *et al.*, 2001a).

Masse *et al.* (2001a e 2001b) avaliaram o efeito da concentração de enzima (PL250) no pré-tratamento enzimático de efluente de frigorífico. Variando a concentração de enzima de 125 a 1000 mg.dm⁻³ foi observado que, a partir de 500 mg.dm⁻³ de enzima adicionada, houve uma diminuição na taxa de hidrólise. Este efeito pode ser explicado provavelmente devido à uma excessiva camada de enzima adsorvida nas partículas de gordura do efluente.

A lipase bacteriana LG-1000 foi testada na hidrólise de partículas de gordura suína, demonstrando eficiência no processo. No entanto, foram necessárias altas concentrações de enzima (> 1000 mg.L⁻¹) ou longos tempos de pré-tratamento (24 horas) para se obter uma redução significativa na hidrólise do efluente (Masse *et al.*, 2001b).

Testes de biodegradabilidade do efluente frigorífico utilizando suplemento enzimático contendo proteases, amilases, celulasas e lipases assim como esporos de *Bacillus subtilis* foram realizados em efluentes com altos conteúdos de gorduras. O pré-tratamento decorreu por 24 horas permitiu obter a remoção de 78% no reator contra 59% no reator controle (sem pré-tratamento). A remoção de graxas sobe de 47% para acima de 70% e redução de sólidos de 34% para 70%, respectivamente. No entanto, os resultados não foram os mesmos quando o suplemento foi adicionado diretamente dentro dos reatores, que não se diferenciaram (Masse *et al.*, 2001b).

A utilização de tecnologias híbridas, como o tratamento enzimático associado com o tratamento biológico anaeróbio, sinaliza a possibilidade de redução do tempo de retenção hidráulica, desde que promova a hidrólise de gordura que causa problemas de entupimento na camada do lodo em reatores UASB. A produção de enzimas hidrolíticas através da fermentação em torta de babaçu com fungo *Penicillium restrictum* é uma alternativa importante para aplicação do extrato enzimático em efluentes gordurosos como o de laticínios com baixo custo devido à tecnologia de produção com espécies nativas de alta atividade lipolítica (17,2 U.g⁻¹) (Leal *et al.*, 2002).

A pré-hidrólise do efluente de laticínio por 12 horas seguido de biodegradação em reatores anaeróbios durante 4 dias sem agitação, foi estudado por Leal *et al.* (2002). Observou-se que com 1200 mg.L⁻¹ de gordura, a eficiência de remoção do controle e hidrolisado eram de 19 e 80%, respectivamente. Através dos resultados obtidos, visualiza-se

a viabilidade do uso do tratamento híbrido (enzimático-biológico) em efluentes com alto conteúdo de gorduras.

Excelentes resultados de biodegradação foram obtidos por Cammarota *et al.* (2001) no tratamento de efluente de laticínio com níveis de gordura de 868 mg.L^{-1} pré-tratado enzimaticamente com 0,1% p/v de torta de babaçu fermentada. Obteve-se redução de mais de 90% de DQO, 90% de sólidos suspensos e 75% da turbidez na saída do reator. Sendo que, normalmente, através do tratamento em reator do tipo UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor”), obtinha-se níveis de remoção de DQO ao final do tratamento de 50%, 944 mg.L^{-1} de sólidos suspensos voláteis, e alta turbidez.

Resultados semelhantes foram obtidos por Jung *et al.* (2002) observando-se que até teores de gordura de 600 mg.L^{-1} a flora microbiana anaeróbia assimilou a carga orgânica introduzida nos reatores aeróbios controle e pré-tratado. A partir de 800 mg.L^{-1} a remoção acima de 82% só foi possível no reator pré-tratado enzimaticamente com 0,2% p/v de torta de babaçu fermentada com atividade lipásica de 11 U.g^{-1} . Os resultados obtidos no reator controle foram de 243 mg.L^{-1} de sólidos suspensos voláteis e índice volumétrico de lodo (IVL) de 243 mL.g^{-1} . Já no reator pré-tratado obteve-se 53 mg.L^{-1} de sólidos suspensos voláteis e IVL de 102 mL.g^{-1} , comprovando a eficiência do preparado enzimático produzido pelo fungo *Penicillium restrictum* no tratamento de efluentes gordurosos, neste caso de laticínio.

Outras lipases já foram investigadas para a pré-hidrólise de óleos e gorduras presentes em soro de queijo, uma lipase nacional (pancreatina Kin Máster-LKM) e uma importada (pancreática Sigma, Tipo II-LPP) (Mendes e Castro, 2003). Avaliou-se a influência na formação de ácidos graxos por agentes emulsificantes, íons cálcio e ajuste de pH durante a hidrólise por 24 horas a 40°C e 600 rpm. Através da análise dos resultados evidenciou-se que a formação de ácidos graxos foi favorecida para efluentes contendo emulsificantes e com pH ajustado, mas na ausência de íons cálcio. As duas enzimas hidrolisaram eficientemente os lipídios e proteínas existentes, embora, a matéria orgânica não tenha sido reduzida significativamente, provavelmente devido ao alto teor de lipídios ou à grande quantidade de lactose do soro de leite. A lipase nacional apresentou melhor custo/benefício, e, portanto, foi selecionada para testes de biodegradabilidade subseqüentes (Mendes e Castro, 2003).

Para remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos de abate de frango foram testadas lipases microbianas comerciais (*Candida rugosa* e Lipolase), sob diferentes condições de hidrólise. Através do acompanhamento da formação de ácidos

graxos livres em função do tempo de reação foi possível analisar a degradação de gorduras na temperatura de 37°C, pH 7,0 e agitação de 150rpm. A Lipolase apresentou maior velocidade de reação em 4 horas, enquanto a lipase de *Candida rugosa* necessitou de duas horas adicionais para alcançar 100% de taxa de hidrólise. Com base nestes resultados, surge a perspectiva da aplicação desta tecnologia em resíduos de indústria de frango, vislumbrando a redução no tempo de residência em tratamentos biológicos e eliminação de camadas de gordura em lagoas de estabilização (Pereira *et al.*, 2002).

A utilização de técnicas de planejamento de experimentos surge para aprimorar estudos já realizados, com o propósito de verificar a influência de variáveis: concentração de enzima (*Candida rugosa*), agente emulsificante e íons cálcio no desempenho da hidrólise dos lipídios de efluente de frigorífico de aves, após 3 horas de tratamento. Verificou-se que os íons cálcio não exercem influência significativa na hidrólise, mas somente a concentração de enzima (0,4%*m/v*) e o agente emulsificante (3%*m/v*) influenciaram na otimização da hidrólise em 20,87%, acrescida de 35% após 12 horas de tratamento, quando o ajuste de pH era realizado com NaOH (Pereira *et al.*, 2003).

O tratamento estatístico através da metodologia de superfície de resposta, pode possibilitar também a análise da influência da concentração de enzima (Amano Pharmaceutical Co.) e o tempo de reação na, percentagem de hidrólise da gordura de babaçu (Oliveira *et al.*, 1999).

Oswal *et al.* (2002) mostraram que efluente de usina de óleo de palma, contendo aproximadamente 250.000 mg.L⁻¹ de DQO, pode ser tratado com *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, resultando na redução de 95% da DQO em um tempo de retenção hidráulica de dois dias. A composição do efluente da usina é constituída basicamente de resíduos de lignocelulose com uma mistura de carboidratos e óleo

A avaliação de aplicação de uma lipase de *Yarrowia lipolytica*-ATCC20255 foi realizada também para redução do alto nível de carga orgânica de efluente de uma indústria de processamento de óleo de oliva, demonstrando excelente desempenho, com redução de DQO a 80% em 24 horas de reação (De Felice *et al.*, 1997).

2.5 Considerações Finais

Através da presente pesquisa bibliográfica foi possível vislumbrar relatos sobre o assunto pesquisado. Desta forma, adquiriu-se conhecimentos sobre a situação atual do desenvolvimento industrial e as conseqüências ao meio ambiente, bem como a necessidade

crescente da evolução dos sistemas de tratamento de resíduos para que se tornem adequados para cada fonte geradora. Este trabalho surge para aprimorar os conhecimentos de uma tecnologia nova na área de tratamento de resíduos agroindustriais.

O tratamento biológico de efluente de frigoríficos através de processos anaeróbios é indicado devido às características deste tipo de resíduo (altas cargas de DQO e de sólidos em suspensão) (Vidal *et al.*, 2000). No entanto, o controle operacional pode ser dificultado devido à complexidade das interações dos microrganismos, bem como pela toxicidade da gordura e/ou compostos intermediários da biodegradação. A modificação e/ou adaptações às necessidades de tratamentos surgem como um bom indicativo para melhora da eficiência do processo (Del Pozo *et al.*, 2000).

Apesar das lipases serem usadas industrialmente há várias décadas, a aplicação em efluentes gordurosos como indústria de balas, laticínios e carnes, está ainda na fase de pesquisa. O principal fator desta realidade são os custos de produção de enzima, abrindo espaço para produção de lipases de baixo custo através de rejeitos e de novos microrganismos produtores de lipases (Leal, 2000, Freire, 1997, Vargas, 2004).

A hidrólise dos sólidos em suspensão, especialmente gorduras, pode melhorar a digestão anaeróbia (Masse *et al.*, 2001a) de efluente de frigorífico, em termos de funcionamento como redução do tempo de retenção hidráulica e escassez de choques de carga (Masse *et al.*, 2001b).

Desta forma, o pré-tratamento enzimático pode ser uma forma promissora para redução da carga lipolítica do efluente de frigoríficos, necessitando, para isto, da definição das condições operacionais ideais para a aplicação desta tecnologia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e reagentes utilizados no decorrer dos experimentos, bem como a metodologia experimental aplicada no desenvolvimento do trabalho.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e produtos químicos

Tabela 3. Reagentes e produtos químicos utilizados

Reagentes	Fabricante
1-10 Fenantrolina monohidratada	Nuclear
Acetona	Vetec, Synth
Ácido bórico	Nuclear
Ácido Nítrico	Quimex, Nuclear
Ácido Perclórico	Merck
Ácido sulfúrico concentrado	Quimex
Água Oxigenada	Synth
Álcool etílico	Vetec
Biftalato de potássio	Nuclear
Dicromato de potássio	Synth e Nuclear
Etanol comercial	Parati
Fosfato de sódio dibásico	Merck
Fosfato de sódio monobásico	Merck
Hidróxido de sódio	Quimex
Indicadores verde de bromo cresol, vermelho de metila e fenolftaleína	Nuclear e Vetec, Synth, Merck
n-Hexano	Merck
Óxido de Lantânio	F. Maia Comércio e Indústria
Pastilha catalisadora (sulfato de potássio e selênio)	Velp Scientifica
Sulfato de mercúrio	Quimex
Sulfato de prata	Nuclear
Sulfato ferroso amoniacal	Reagen, Synth

3.1.2 Equipamentos

Tabela 4. Equipamentos utilizados

Equipamentos
Medidor de pH digital Gehaka, modelo PG2000
Mufla Brasimet
Banho Maria Tecnal, modelo TE210
Estufa com circulação mecânica Fanem, modelo 320SE
Balança analítica Belmart, modelo 220
Balança analítica Marte-Ohaus, modelo AS200
Dessecador com sílica Vidralabor, Thermex
Bomba de vácuo Marconi, modelo MA058
Bloco digestor Brasotec, modelo DK20
Destilador Kjeldahl Marconi, modelo MA036
Agitador magnético com aquecimento Fisatom, modelo 752A
Extrator de Soxhlet Marconi, modelo MA491
Termorreator com tampa protetora Merck, modelo TR300
Agitador orbital Marconi, modelo NT113
Agitador orbital com banho incubador (banho Dubnoff) Nova Ética
Centrífuga Hettick, modelo Mikro 20
Geladeira/Freezer Eletrolux Air flow system, modelo DC47
Microondas Philco, modelo PMW 110
Bomba Masterflex L/S, modelo 7518-10
Incubadora Menoncin
Colorímetro Hach, modelo DR 870
Espectrofotômetro de Absorção Atômica Varian, modelo SpectrAA 55

3.2 Métodos

3.2.1 Amostragem de efluente

O efluente empregado em todos os experimentos foi coletado em um frigorífico de suínos e bovinos da região de Erechim (RS). Foram realizadas coletas compostas em dois pontos da Estação de Tratamento de Efluentes da indústria, sendo denominado “pré-flotado” o efluente coletado após o tratamento preliminar (peneiramento) de todo resíduo da indústria onde se retira o material grosseiro; e “flotado” o resíduo de topo do flotor, rico em gordura, formado após a adição de polieletrólitos e FeCl_3 , separado pela ação de microbolhas. A coleta foi realizada durante um dia no horário de operação do frigorífico. O pH e a temperatura do efluente foram monitorados no local. As amostras foram acondicionadas em

recipiente resfriado e mantidas a 4°C durante a coleta. A seguir, o conteúdo dos recipientes foram misturados e homogeneizadas e posteriormente acidificadas com H₂SO₄ concentrado até pH 2 (APHA, 1995) estocadas 4°C, onde permaneceram até o momento das análises.

3.2.2 Caracterização do efluente

Previamente à realização de cada análise as amostras foram homogeneizadas e levadas à temperatura ambiente. Foram realizadas análises de sólidos, óleos e graxas, nitrogênio e Demanda Química de Oxigênio (DQO) segundo os métodos analíticos que serão descritos no item 3.2.8.

3.2.3 Enzimas utilizadas

Neste trabalho utilizou-se duas diferentes lipases. Uma lipase comercial livre (Lipolase 100T, Novozymes) cedida pela Allimentus Engenharia e Tecnologia Ltda (Chapecó-SC) e outra que consiste em um complexo enzimático obtido por fermentação de torta de babaçu (Lipase FMS) por *Penicillium restrictum*, patenteado (Freire *et al.* 2003), e produzido pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática do PEQ/COPPE/UFRJ, que foi mantido a -10°C e utilizado sem nenhum tipo de purificação. A atividade lipásica de ambos os preparados enzimáticos foi dosada segundo metodologia descrita por Freire *et al.*(1997). A determinação da atividade enzimática foi efetuada para acompanhamento de possíveis alterações da atividade das enzimas durante o armazenamento.

3.2.4 Planejamento dos experimentos

A avaliação do efeito das variáveis sobre a hidrólise dos óleos e graxas do efluente foi realizado através da técnica de planejamento de experimentos, que permite a obtenção de resultados precisos com um número reduzido de ensaios experimentais. A Tabela 5 apresenta o intervalo de estudo das variáveis investigadas (quantidade de enzima, agitação, temperatura e pH), definido com base na literatura (Leal *et al.*, 2002). O planejamento experimental fatorial fracionário 2⁴⁻¹ é apresentado na Tabela 6. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e a reprodutibilidade foi verificada repetindo-se alguns ensaios em dias aleatórios.

Tabela 5. Intervalo de estudo das variáveis independentes

Variáveis Independentes	Intervalo
Temperatura (T) (°C)	27-45
Quantidade de enzima adicionada (E) (%p/v)	0,10-5
Agitação (A) (rpm)	0-200
PH	6-11

Tabela 6. Planejamento semi-fatorial 2⁴⁻¹

Ensaio	Condições experimentais			
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)
1	27 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	0,1 (-1)
2	27 (-1)	6 (-1)	200 (1)	5 (1)
3	27 (-1)	11 (1)	0 (-1)	5 (1)
4	27 (-1)	11 (1)	200 (1)	0,1 (-1)
5	45 (1)	6 (-1)	0 (-1)	5 (1)
6	45 (1)	6 (-1)	200 (1)	0,1 (-1)
7	45 (1)	11 (1)	0 (-1)	0,1 (-1)
8	45 (1)	11 (1)	200 (1)	5 (1)
9	36 (0)	8,5 (0)	100 (0)	2,55 (0)

3.2.5 Tratamento enzimático do efluente

Para realização dos experimentos, uma alíquota de efluente padronizado com 10 g/L de gordura foi transferida para um erlenmeyer com tampa. A padronização foi efetuada através da mistura do flotado e pré-flotado com concentrações de óleos e graxas conhecidas. Uma alíquota desta mistura foi retirada no início de cada experimento para análise do teor de óleos e graxas. Cada reação foi conduzida por 24 horas e a cinética da hidrólise foi acompanhada pela dosagem dos ácidos graxos liberados. Alíquotas de 2 mL do meio reacional foram retiradas e adicionadas a uma solução de acetona:etanol (1:1) para cessar a reação. Esta mistura era então titulada com NaOH 0,02N até pH 11 (Freire *et al.*, 1997). A determinação dos Ácidos Graxos Livres (AGL) formados foi obtida através da Equação 1:

$$AGL = \frac{V_a \times N \times 1000}{V_c} \quad (1)$$

Onde:

AGL= Ácidos Graxos Livres ($\mu\text{mol/mL}$);

Va= Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

Vc= Volume de amostra utilizada na reação (mL);

N= Normalidade da solução de NaOH (0,02N).

3.2.6 Avaliação da variação do substrato

Após a execução do planejamento de experimentos e otimização das condições de hidrólise foram realizados experimentos com diferentes concentrações iniciais de substrato (óleos e graxas) e quantidade de enzima constante. As condições operacionais utilizadas nesta etapa foram:

⇒ Lipase FMS: Concentração de enzima – 5%p/v, Temperatura - 45°C, pH 7,8 e Agitação - 200rpm.

⇒ Lipolase 100T: Concentração de enzima – 5%p/v, Temperatura – 37,6°C, pH 11 e Agitação - 130rpm.

3.2.7 Tratamento biológico

a) Adaptação do lodo anaeróbio ao efluente

Os experimentos de biodegradação anaeróbia do efluente foram conduzidos com lodo proveniente da estação de tratamento de esgotos da Ilha do Governador, no Rio de Janeiro (RJ). A adaptação deste lodo aos constituintes do efluente empregado neste estudo (hidrólise), bem como aos do extrato enzimático adicionado na etapa da hidrólise, se fez necessária. Para tanto, 100 mL deste lodo foram incubados em frasco de vidro vedado, com volume útil de 400 mL, acoplado a um dispositivo para liberação de gases em um recipiente captador preenchido com água. O conjunto foi incubado a 35°C. A gradual substituição do meio, contendo todos os nutrientes necessários para a flora microbiana, pela mistura de efluente gorduroso e extrato enzimático permitiu a adaptação do lodo aos constituintes da mistura obtida da hidrólise. A Tabela 7 apresenta a composição do meio de cultivo durante o período de adaptação. A Figura 2 apresenta um esquema do reator utilizado para a adaptação do lodo. A avaliação da adaptação do lodo se deu por meio do monitoramento de

pH, alcalinidade, DQO, teor de nitrogênio, bem como dos sólidos em suspensão voláteis e de alguns micronutrientes como sódio, cálcio, magnésio e potássio.

Nesta etapa foi empregada uma remessa de efluente bruto com conteúdo conhecido de óleos e graxas de 3.000 mg/L. O efluente era adicionado à solução de nutrientes de forma a se obter o teor de gordura desejado. Este processo foi relativamente demorado, pois, inicialmente, o lodo foi adaptado à proporções crescentes de óleos e graxas e um volume fixo de extrato enzimático de 0,01 mL. Após a aclimatação em termos de óleos e gorduras, a proporção de extrato enzimático da Lipase FMS na mistura foi gradativamente aumentada até um volume representativo das concentrações de enzima utilizada na hidrólise enzimática (0,5-80mL), mantendo-se constante a concentração de 600 mg/L de óleos e gorduras. O extrato enzimático foi obtido por extração de torta de babaçu fermentada com 45 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH7,0 incubando-se em banho com agitador orbital a 35°C e 200 rpm durante 30 minutos. Em seguida, era realizada a extração da fração líquida por prensagem manual, que era, posteriormente, autoclavada para inativação por 30 minutos a 1,5 Kgf/cm² e utilizada na aclimatação do reator.



Figura 2. Reatores utilizados para aclimatação do lodo anaeróbio

Tabela 7. Composição do meio de cultivo durante o período de adaptação

Dia	O&G (mg/L)	Vol. efluente	Vol. extrato enzimático ^a	Solução 1 ^b	Solução 2 ^b	Solução 3 ^b	Solução 4 ^b	Solução 5 ^b
6	50	16,7	0,01	10	1	1	1	20
13	100	33,3	0,01	10	1	1	1	15
21	200	66,7	0,01	10	1	1	1	10
31	300	100,0	0,01	10	1	1	1	5
45	400	133,3	0,01	10	1	1	1	2,5
59	500	166,6	0,01	10	1	1	1	0
125	600	200,0	0,01	10	1	1	1	0
135	600	200,0	0,5	10	1	1	1	0
142	600	200,0	1	10	1	1	1	0
152	600	200,0	20	10	1	1	1	0
163	600	200,0	40	10	1	1	1	0
187	600	200,0	80	10	1	1	1	0

Solução 1 - NaHCO₃ (100 g/L)

Solução 2 - Extrato de Levedura (100 g/L)

Solução 3 - NH₄Cl (170 g/L)

KH₂PO₄ (37 g/L)

MgSO₄.7H₂O (9 g/L)

Solução 4 - FeSO₄.7H₂O (15 g/L)

FeCl₃.6H₂O (0,75 g/L)

CoCl₂ (0,24 g/L)

ZnCl₂ (0,05 g/L)

CuSO₄.5H₂O (0,06 g/L)

MnSO₄.4H₂O (0,56 g/L)

(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,05 g/L)

Solução 5 – glicose (50 g/L)

OBS: em cada etapa o volume necessário para 1000 mL era completado com água destilada.

a) O extrato enzimático empregado nesta etapa se encontrava inativo no meio reacional utilizado (efluente).

b) Volumes em mL.

O reator foi operado em regime de bateladas sucessivas e concentrações constantes até os testes de biodegradabilidade onde o lodo devidamente aclimatado foi utilizado. As trocas do meio eram feitas de acordo com os níveis de remoção, no entanto nunca ultrapassavam sete dias. O meio era preparado em cada alimentação, garantindo assim suas características. A DQO era acompanhada diariamente.

b) Tratamento anaeróbio do efluente

Ao término do período de aclimação do lodo, foi dado início ao tratamento biológico do efluente. O lodo adaptado foi dividido e colocado em quatro novos reatores para cada quantidade de enzima, nomeados da seguinte forma:

- ⇒ Controle com Lipolase 100T: reator alimentado com efluente bruto e enzima inativa (no meio reacional utilizado-efluente).
- ⇒ Hidrolisado com Lipolase 100T: reator alimentado com efluente hidrolisado (pré-tratado enzimaticamente).
- ⇒ Controle com Lipase FMS: reator alimentado com efluente bruto e enzima inativa (no meio reacional utilizado-efluente).
- ⇒ Hidrolisado com Lipase FMS: reator alimentado com efluente hidrolisado (pré-tratado enzimaticamente).

Os experimentos foram conduzidos nos reatores onde foram adicionados o lodo adaptado (30 mL) e o efluente bruto ou pré-tratado enzimaticamente (90 mL). As trocas do meio eram realizadas em até sete dias, sendo o monitoramento dos parâmetros realizados por meio de amostragem diária (cerca de 3 mL/dia) do conteúdo dos reatores ao longo da semana. Nas trocas, todo o sobrenadante acima do lodo era retirado e substituído por novo meio. O efluente de alimentação foi neutralizado e padronizado na concentração desejada de óleos e gorduras. A hidrólise do efluente foi realizada nas condições otimizadas para cada enzima e no menor nível de quantidade de enzima (0,1% p/v), utilizando-se as condições de maior conversão visando avaliar o efeito da quantidade de enzima na biodegradação anaeróbia dos óleos e graxas do efluente. O reator controle foi alimentado com a enzima inativa no meio reacional utilizado (efluente), para simular a mesma composição química do meio introduzido no reator hidrolisado. As condições utilizadas na hidrólise do efluente a ser posteriormente usado na biodegradação anaeróbia são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Condições utilizadas na hidrólise do efluente catalisada pelas duas enzimas

Enzima	Quantidade de enzima % (p/v)	T (°C)	Agitação (rpm)	pH
Lipase FMS	5	45	200	7,8
Lipolase 100T	5	37,6	130	11
Lipase FMS	0,1	45	200	6
Lipolase 100T	0,1	45	200	6

O acompanhamento do tratamento foi feito através de análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO). Buscou-se manter o pH da entrada em torno de 7,0, ajustando-o quando necessário, por meio de adição de NaOH. Os reatores foram alimentados com efluente com concentrações crescentes de O&G (250; 500; 1.200 e 3.000 mg/L).

3.2.8 Métodos analíticos

a) Medida da atividade enzimática

Para a dosagem da atividade lipásica utilizou-se como substrato uma emulsão com óleo de oliva 10 % p/v e goma arábica 5 % p/v em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão são adicionados 2 mL da amostra. Após incubação por 15 minutos à 37°C com agitação de 160 rpm, a reação era interrompida e os ácidos graxos extraídos através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). No caso da Lipase FMS foi necessário efetuar a extração da enzima. Para tal pesou-se 2,55 g do preparado enzimático (valor do ponto central do planejamento) adicionou-se 100mL de tampão e incubou-se por 30 minutos a 35°C e 200 rpm. Após a extração a amostra foi filtrada e procedeu-se à dosagem de atividade no sobrenadante. A enzima Lipolase 100T não foi submetida à extração por ser solúvel, sendo utilizadas 2,55 g de enzima à qual adicionou-se 100 mL de tampão.

Os ácidos graxos liberados durante a reação foram então titulados até pH 11,0 com solução 0,02 N de NaOH. Os brancos reacionais eram preparados da mesma forma sem adição da enzima. As dosagens de atividade foram feitas em duplicata. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima. A atividade foi determinada através da equação 2 (Freire *et al.*, 1997).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c} \quad (2)$$

Onde:

A = Atividade lipásica (U/mL);

V_a = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b = Volume de NaOH gasto na titulação do branco (mL);

V_c = Volume da amostra usada na reação (mL);

t = Tempo de reação (minutos);

N = Normalidade da solução de NaOH (0,02N).

b) Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio é a medida do oxigênio equivalente ao conteúdo de matéria orgânica de uma amostra que é suscetível à oxidação por um forte oxidante químico. Para análise de DQO dos efluentes foi utilizado o método do refluxo fechado com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido (H_2SO_4), segundo a metodologia descrita no Standard Methods (APHA, 1995). Após a digestão, o remanescente não reduzido de dicromato de potássio é titulado com sulfato ferroso amoniacal ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), possibilitando quantificar a matéria orgânica oxidável que é calculada em termos de oxigênio equivalente. Neste trabalho utilizou-se também o método padrão colorimétrico. Para a coleta das amostras, o conteúdo dos reatores foi agitado, e deixado em repouso para decantação das células, coletando-se uma amostra do sobrenadante após 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 20 minutos e o sobrenadante foi submetido à análise de DQO. Um teste em branco foi realizado para cada batelada de análises utilizando água Milli-Q no lugar da amostra. No método colorimétrico utilizou-se padrões de biftalato de potássio para obtenção da curva de calibração, realizando-se as leituras em um colorímetro (Hach DR870).

c) Determinação do teor de Óleos e Graxas (O&G)

O teor de óleos e graxas no efluente foi determinado por extração em Soxhlet pelo princípio da extração contínua a quente, utilizando n-hexano como solvente, segundo procedimento padrão (APHA, 1995). Um determinado volume de efluente (10 mL) era acidificado com H_2SO_4 e filtrado em papel filtro Whatman número 4 com uma camada de terra diatomácea (Celite) obtida pela filtração a vácuo de uma suspensão de terra diatomácea em água a 5% (p/v). O papel de filtro e a torta contendo gorduras retidas eram empacotados e colocados em cartucho de extração previamente seco em estufa a 105°C por 15 minutos. O cartucho era colocado no extrator e iniciava-se a extração com n-hexano durante 1,5 horas. O solvente era recuperado e o copo contendo as gorduras extraídas era seco em estufa a 105°C durante 1,5 horas, dessecado por 30 minutos e, então, pesado. O teor de óleos e graxas foi calculado através da equação 3.

$$O \& G = \frac{(B - A) \times 1000}{V_c} \quad (3)$$

Onde:

O&G= Teor de óleos e graxas (mg/L);

B= Massa do conjunto balão + resíduo de óleos e graxas seco (mg);

A= Massa do balão vazio seco (mg);

V_c= Volume da amostra usada na análise (mL).

d) Determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT)

A determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT) foi feita por método padrão (APHA, 1995). A amostra (2 mL) era digerida em meio ácido (12 mL de H₂SO₄ concentrado) na presença de 1 pastilha de 3,5mg de magnésio e 3,5 g sulfato de potássio durante 4 horas. Após neutralização com 40 mL de NaOH (40%p/v), 75 mL de água destilada foram adicionados. A amônia formada era destilada e absorvida em 25 mL de ácido bórico (4%p/v) sendo, em seguida, titulada com HCl 0,1N. No caso da determinação nos reatores anaeróbios durante a etapa de aclimação, a amostra era coletada após a alimentação (10mL) e centrifugada durante 20 minutos a 12.000g. Já no caso da caracterização do efluente coletado para realização dos experimentos, a coleta foi efetuada nos frascos de armazenamento previamente homogeneizados. A concentração de nitrogênio foi determinada através da equação 4:

$$NKT = \frac{14,01 \times V_a \times N}{P \times 10} \quad (4)$$

Onde:

NKT= (%) Nitrogênio Kjeldahl total;

V_a= Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

N= normalidade da solução de HCl padronizado (0,1N);

P= massa da amostra usado na análise (g).

e) Determinação dos sólidos

A determinação dos sólidos foi feita pelo método gravimétrico utilizando procedimentos padrão descritos no Standard Methods (APHA, 1995).

f) Acompanhamento da alcalinidade e pH

As amostras eram retiradas no início e ao final da alimentação. Procedia-se então à titulação potenciométrica das amostras com HCl 0,1N registrando-se o volume de ácido gasto em dois momentos:

⇒ Alcalinidade parcial – equivalente ao bicarbonato: pH 5,75

⇒ Alcalinidade intermediária – equivalente aos ácidos voláteis: pH 4,3

De posse destes valores a alcalinidade pode ser calculada da seguinte maneira (APHA, 1995):

$$AP = \frac{Va \times N \times 50000}{Vc} \quad e \quad AI = \frac{Vb \times N \times 50000}{Vc} \quad (5)$$

Onde:

AP= Alcalinidade parcial (mgCaCO₃/L);

AI= Alcalinidade intermediária (mgCaCO₃/L);

Va= Volume de HCl gasto na titulação para atingir pH 5,75;

Vb= Volume de HCl gasto na titulação para atingir pH 4,3;

N= Normalidade da solução de HCl (0,1N);

Vc= Volume de amostra usada na análise (mL).

g) Micronutrientes

A determinação de alguns micronutrientes específicos é considerada relevante para o acompanhamento de reatores anaeróbios durante a aclimação (CHERNICHARO, 1997). Estas dosagens foram efetuadas como um item de controle do bom funcionamento do mesmo. As amostras foram retiradas do reator antes de uma nova alimentação, após a decantação do lodo, para a determinação dos teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio.

As amostras foram digeridas por via úmida, adicionando-se a 75 mL de amostra coletada 3 mL de H_2SO_4 , 3 mL de HClO_4 e 4 mL de H_2O_2 . Esta mistura foi submetida a aquecimento em chapa de aquecimento até restar um volume de aproximadamente 40 mL da solução límpida, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com solução de HNO_3 1M. A leitura dos nutrientes foi realizada através de Espectrômetro de Absorção Atômica (Varian, SpectrAA 55).

Em todos os casos, para a leitura das amostras era necessária uma solução padrão em várias concentrações que abrangessem o valor a ser determinado da amostra. Partia-se sempre da solução estoque de 1.000 ppm, preparada em HNO_3 1M, através da qual fazia-se cinco diluições. Após a leitura dos padrões respectivos de cada micronutriente, obtinha-se a curva padrão, procedendo-se então à leitura das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão abordados os resultados obtidos na pesquisa, bem como os comentários a respeito destes, considerando-se o embasamento teórico obtido através da construção do Capítulo 2.

4.1 Caracterização do Efluente de Frigorífico

A caracterização do efluente de frigorífico de suínos e bovinos foi realizada em termos de teor de proteínas, gorduras, sólidos totais e voláteis e DQO. Estes dados são de extrema importância para se obter a normalização do efluente a ser utilizado nos experimentos, visando minimizar as variações devido a alterações nas características deste. A temperatura e o pH foram monitorados durante a coleta do efluente, sendo que o pH oscilava na faixa de 5 a 6 e a temperatura entre 35 e 40°C. A Tabela 9 apresenta os dados da caracterização realizada após a coleta composta.

Tabela 9. Caracterização do efluente de frigorífico de suínos e bovinos

Análises	Flotado	Pré-flotado
DQO (g/L)	2.000	32,00
Sólidos em Suspensão Voláteis (mg/L)	90.370	3.912
Sólidos Totais (mg/L)	107.927	8.462
Óleos e Graxas (g/L)	31,08	3,08
Proteína (%)	0,09	0,03
Vazão média (L/h)	-	70.000

A análise do efluente pré-flotado mostra uma elevada concentração de matéria orgânica expressa em termos de demanda química de oxigênio, fato normalmente verificado em efluentes com elevados teores de gorduras e sólidos em suspensão (Masse *et al.*, 2001a Masse *et al.*, 2003). Observa-se que os valores obtidos são bem superiores aos valores médios da DQO de efluentes líquidos de frigoríficos relatados na literatura, que podem chegar a 4,5 g/L (FEPAM, 1997).

No caso do tratamento deste efluente ser realizado através de processos biológicos, mesmo com um tratamento físico-químico preliminar, há possibilidade de acúmulo de O&G, causando problema no caso de digestão anaeróbia, como toxicidade aos microrganismos (Rinzema *et al.*, 1994) devido ao fato de as gorduras e proteínas presentes possuírem baixa

biodegradabilidade. Os processos físico-químicos, além do elevado custo dos reagentes, não possuem uma eficiência de remoção considerável e apresentam uma série de limitações devido à necessidade de um controle rigoroso da operação para evitar perda de eficiência devido a variações de carga orgânica e pH (Cammarota *et al.*, 2001). A aplicação de enzima em processos industriais surge como alternativa para sistemas com deficiência de operação, sendo as lipases uma das classes mais estudadas nesse sentido (Jung *et al.*, 2002, Pereira *et al.*, 2002), pois a hidrólise de partículas de gordura pode acelerar a biodegradação em processos biológicos (Jung *et al.*, 2002; Masse *et al.*, 2001a).

4.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática consistiu na utilização de lipases hidrolíticas para modificação de lipídios encontrados em efluente de frigorífico. A medida de atividade das enzimas foi realizada conforme metodologia apresentada no item 3.2.8 do Capítulo 3. Os valores obtidos para Lipase FMS e Lipolase 100T foram de 43 U/g e 2.800 U/g, respectivamente, utilizando 2,55 g/L dos preparados enzimáticos em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7. Este resultado mostra que, em condições padrão, a enzima comercial é mais ativa que a enzima obtida em laboratório (purificada e concentrada).

4.2.1 Hidrólise enzimática de óleos e graxas do efluente de frigorífico de suínos e bovinos

As reações de hidrólise enzimática foram conduzidas por 24 h e a cinética da hidrólise acompanhada pela dosagem dos ácidos graxos liberados (AGL). Um experimento foi realizado sem adição de enzima e denominado como branco da reação, tendo como objetivo a avaliação do aumento do teor de ácidos graxos livres no efluente sem o biocatalisador.

Os dados experimentais obtidos na degradação enzimática do efluente através da enzima Lipolase 100T e Lipase FMS são apresentados na Tabela 10. Os dados apresentados são referentes ao teor de ácidos graxos livres após 15 h de reação, pois o acompanhamento cinético do processo mostrou que, em praticamente todas as condições experimentais, a degradação máxima foi atingida neste tempo.

Tabela 10. Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} (valores reais e codificados) com as respostas de teor de AGL para as duas enzimas investigadas

Ensaio	Condições Experimentais				AGL ($\mu\text{mol/mL}$) ¹	
	T(°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Lipase FMS	Lipolase 100T
1	27 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	0,1 (-1)	6,17	17,57
2	27 (-1)	6 (-1)	200 (+1)	5 (+1)	47,19	13,74
3	27 (-1)	11 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	85,06	20,82
4	27 (-1)	11 (+1)	200 (+1)	0,1 (-1)	6,22	7,72
5	45 (+1)	6 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	98,06	34,95
6	45 (+1)	6 (-1)	200 (+1)	0,1 (-1)	16,68	24,44
7	45 (+1)	11 (+1)	0 (-1)	0,1 (-1)	6,43	6,97
8	45 (+1)	11 (+1)	200 (+1)	5 (+1)	75,98	40,94
9	36 (0)	8,5 (0)	100 (0)	2,55 (0)	71,79	39,90

¹Ácidos Graxos Livres em 15 h de reação

Os resultados da Tabela 10 permitem visualizar que a condição de maior conversão para a Lipase FMS foi a 45°C, quantidade de enzima de 5% (p/v) e nos níveis inferiores de agitação e pH. Quanto à Lipolase 100T, as condições experimentais do ensaio 8 e do ponto central foram as que apresentaram melhores resultados, fornecendo conversões similares. Desta forma, a condição central seria a mais atrativa economicamente por utilizar menor temperatura (36°C) e quantidade de enzima (2,55% p/v) obtendo-se praticamente o mesmo teor de AGL. Em geral, para obtenção dos valores maiores de conversões em termos de ácidos graxos livres, as duas enzimas necessitaram de níveis mais elevados de temperatura e quantidade de enzima, evidenciando a importância destas variáveis no processo de hidrólise de óleos e graxas do efluente frigorífico.

O erro da realização dos experimentos foi avaliado através da repetição, em dias aleatórios, da condição do ponto central e dos extremos do planejamento. A Tabela 11 apresenta os dados de conversões em ácidos graxos obtidas durante a realização destes três novos ensaios para cada enzima. A avaliação destes experimentos em comparação aos valores obtidos anteriormente demonstra que houve uma boa reprodutibilidade dos valores obtidos para as duas enzimas.

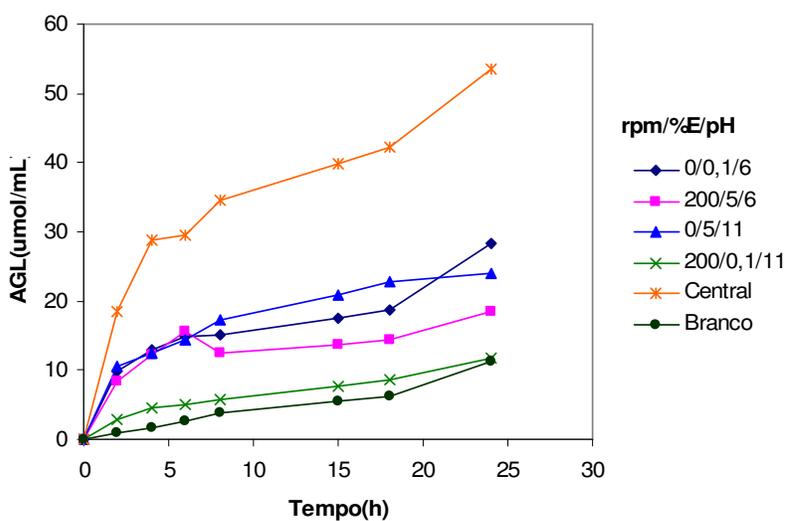
As Figuras 3 e 4 apresentam as cinéticas de hidrólise do efluente para as condições experimentais do planejamento para a Lipolase 100T e Lipase FMS, respectivamente. É possível observar que a temperatura e a quantidade de enzima realmente são fatores relevantes na hidrólise catalisada pela Lipolase 100T. Pode-se também notar que, em geral, o máximo de hidrólise é alcançado entre 9 a 15 horas de reação. Comportamento similar é

observado na análise das curvas cinéticas da hidrólise catalisada pela Lipase FMS, representadas na Figura 4.

Tabela 11. Avaliação da reprodutibilidade dos experimentos de hidrólise enzimática

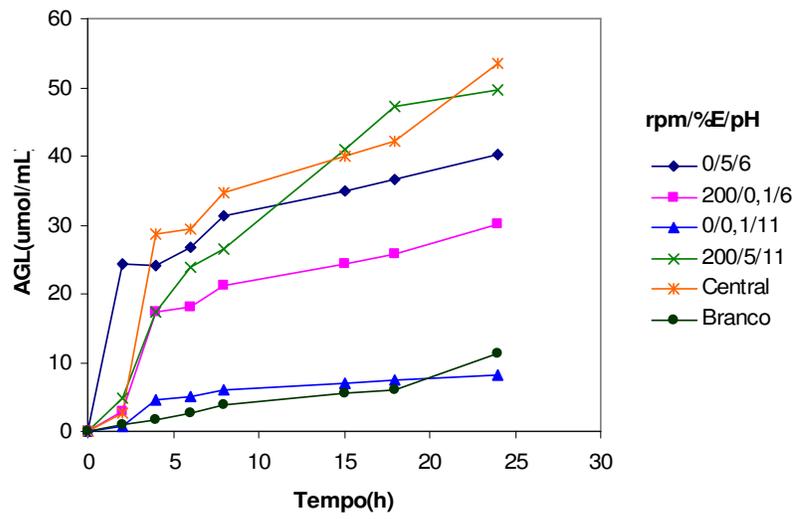
Ensaio	Condições Experimentais				AGL ($\mu\text{mol/mL}$) ¹	
	T(°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Lipase FMS	Lipolase 100T
1 ^a	27 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	0,1 (-1)	6,17	17,57
1b	27 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	0,1 (-1)	7,09	18,59
8 ^a	45 (+1)	11 (+1)	200 (+1)	5 (+1)	75,98	40,94
8b	45 (+1)	11 (+1)	200 (+1)	5 (+1)	66,05	42,47
9 ^a	36 (0)	8,5 (0)	100 (0)	2,55 (0)	71,79	39,90
9b	36 (0)	8,5 (0)	100 (0)	2,55 (0)	71,22	39,08

¹Ácidos Graxos Livres em 15 h de reação



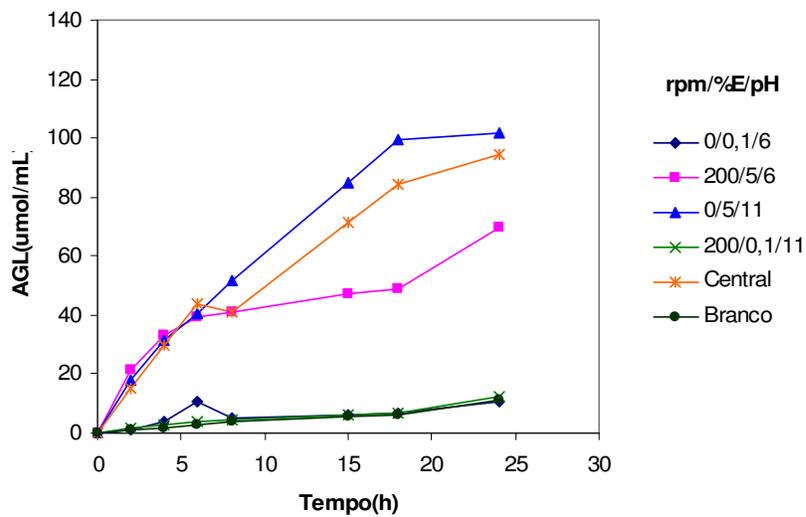
(a)

Figura 3. Cinética de hidrólise enzimática utilizando Lipolase 100T nas temperaturas de (a) 27°C e (b) 45°C



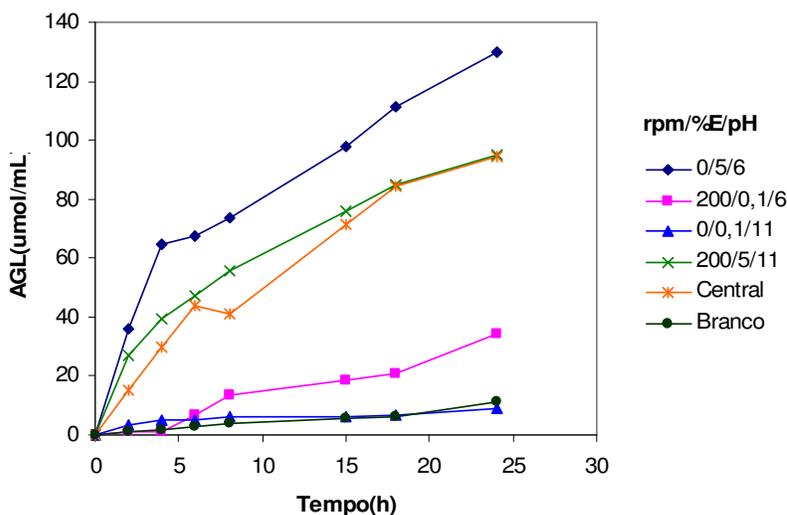
(b)

Figura 3 (cont.). Cinética de hidrólise enzimática utilizando Lipolase 100T nas temperaturas de (a) 27°C e (b) 45°C



(a)

Figura 4. Cinéticas de hidrólise enzimática utilizando Lipase FMS nas temperaturas de (a) 27°C e (b) 45°C



(b)

Figura 4(cont). Cinéticas de hidrólise enzimática utilizando Lipase FMS nas temperaturas de (a) 27°C e (b) 45°C

Estes resultados mostram que a hidrólise catalisada pela Lipase FMS resultou em conversões bem maiores se comparada à Lipolase 100T. De fato, este comportamento é peculiar, pois se for levada em consideração a atividade de cada enzima, o desempenho da Lipolase 100T deveria se sobressair em relação à Lipase FMS. No entanto, a diferença nos valores de conversão é clara, e possivelmente se deve ao fato das duas enzimas serem produzidas por diferentes microrganismos, apresentando, portanto, diferentes resistências à desnaturação protéica ou a efeitos inibitórios causados por componentes presentes no efluente real. Deve-se também considerar que a Lipolase 100T consiste em um preparado enzimático solúvel e foi utilizada na sua forma livre. A Lipase FMS, por sua vez, pode se encontrar ainda adsorvida ao substrato da fermentação (torta de babaçú) e ao microorganismo, podendo assim apresentar maior resistência às condições adversas do meio. Outros estudos relatam que a alta concentração de enzima livre no meio reacional pode causar diminuição na taxa de hidrólise por inibição ou adsorção da enzima na superfície das partículas de gordura. Este limite normalmente varia de acordo com a característica de cada lipase (Masse *et al.*, 2001b).

a) Avaliação da atividade microbiana nas condições experimentais de hidrólise catalisada pela Lipase FMS

A avaliação do consumo de ácidos graxos liberados durante a hidrólise enzimática pela flora microbiana presente no efluente foi avaliada através realização de ensaios com a adição de 50 ppm de azida sódica. Os resultados das cinéticas de hidrólise com e sem a adição do inibidor de atividade microbiana são apresentados na Figura 5.

É possível se observar que nenhuma das condições apresentou diferença expressiva entre os resultados dos ensaios com e sem a adição do inibidor microbiano. Desta forma conclui-se que não ocorreu atuação de microrganismos em proporções significativas no processo de hidrólise do efluente, nas condições analisadas, tanto no ponto central, onde a temperatura é a ideal para o desenvolvimento microbiano (36°C) como na faixa de temperatura da realização dos experimentos (27°C e 45°C).

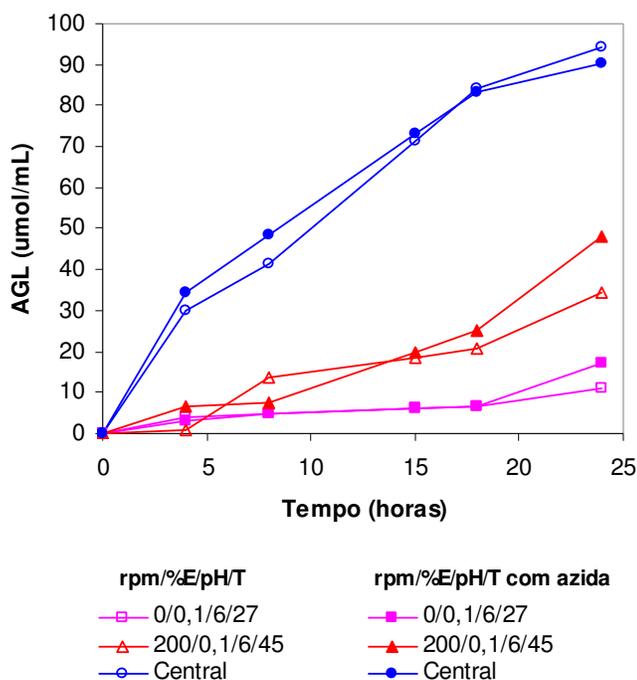


Figura 5. Cinéticas de hidrólise enzimática utilizando Lipase FMS, com e sem a adição de azida sódica

b) Análise estatística dos resultados do planejamento

Após a realização do planejamento com as duas enzimas e a constatação de que o tempo de 15 horas foi o de conversão máxima em ácidos graxos livres, avaliaram-se os efeitos das variáveis do processo através da análise estatística. Foram utilizados modelos empíricos, considerando-se os efeitos significativos em nível de 95% de confiança. A Tabela 12 apresenta a regressão estatística do sistema catalisado pela Lipolase 100T através do modelo empírico manipulado segundo as variáveis codificadas ajustado em função dos dados de AGL ($\mu\text{mol/mL}$) no tempo de 15 horas.

Tabela 12. Resultados da regressão para o sistema catalisado pela Lipolase 100T

Modelo: $\text{AGL} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot \text{pH} + a_3 \cdot E + a_4 \cdot E \cdot E + a_5 \cdot E \cdot T + a_6 \cdot E \cdot \text{pH}$							
Parâmetros	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6
Estimativa	40,182	5,937	-1,788	6,724	-19,282	4,405	5,043
Erro padrão	2,722	0,962	0,962	0,962	2,887	0,962	0,962

$R^2 = 0,989$

Através dos dados apresentados na Tabela 12 é possível verificar que a temperatura e a quantidade de enzima são as variáveis que mais influenciam a hidrólise dos óleos e graxas conforme já observado na análise preliminar dos resultados do planejamento. O pH tem um efeito negativo menos pronunciado e a agitação não exerce influência estatisticamente significativa no processo de hidrólise para o sistema catalisado pela Lipolase 100T.

A regressão estatística dos resultados obtidos para 15 h de hidrólise utilizando a enzima Lipase FMS é apresentada na Tabela 13. Observa-se que a quantidade de enzima apresentou efeito bastante pronunciado sobre a hidrólise, seguido da temperatura, que influencia positivamente, conforme o obtido para a lipase comercial. A agitação influencia a hidrólise negativamente e o pH, neste caso, não exerce influência estatisticamente significativa no processo de hidrólise.

Comparando-se os dois sistemas enzimáticos, observa-se que a variável que mais influencia a hidrólise em ambos os casos é a quantidade de enzima seguida da temperatura. Para a Lipase FMS a agitação exerce influência significativa e negativa, ao contrário da enzima comercial. Este efeito pode estar relacionado à extração da enzima da torta sólida para o meio aquoso, se tornando então mais suscetível aos efeitos adversos do meio.

Tabela 13. Resultados da regressão para o sistema catalisado pela Lipase FMS

Modelo: $AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot R + a_3 \cdot E + a_4 \cdot T \cdot R + a_5 \cdot E \cdot T + a_6 \cdot T \cdot pH + a_7 \cdot T \cdot T$								
Parâmetro	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7
Estimativa	71,793	6,563	-6,207	33,848	3,250	3,883	-8,781	-29,067
Erro Padrão	1,971	0,697	0,697	0,697	0,697	0,697	0,697	2,091

$R^2=0,999$

c) Otimização das condições operacionais da hidrólise enzimática de óleos e graxas do efluente

A otimização das condições operacionais seguiu procedimento iterativo, onde se obtinha um ponto de máximo do modelo de cada sistema, com auxílio de um programa de otimização em Fortran. A condição de máximo fornecida pela análise do modelo empírico era realizada experimentalmente e incluída no conjunto de dados para obtenção de um novo modelo, que era submetido à nova etapa de obtenção das condições de máximo. Este procedimento prosseguiu até se encontrar a condição que fornecia o maior teor de AGL no tempo de 15 h de reação e boa concordância do teor de AGL máximo experimental e do predito pelo modelo. Os resultados obtidos em cada etapa de otimização serão apresentados adiante.

LIPOLASE 100T

A Tabela 14 apresenta os experimentos realizados com o intuito de encontrar o ótimo da função objetivo, representado em termos de ácidos graxos livres formados durante a hidrólise do efluente catalisada pela Lipolase 100T. As curvas cinéticas dos experimentos descritos na Tabela 14 são apresentadas na Figura 6.

Tabela 14. Experimentos realizados para otimização das condições operacionais utilizando a Lipolase 100T – 1ª etapa

Modelo: $AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot pH + a_3 \cdot E + a_4 \cdot E \cdot E + a_5 \cdot E \cdot T + a_6 \cdot E \cdot pH$						
Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/mL}$) 15 horas	
	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
10	38	11	0	5	51,55	39,24
11	45	6	0	2,94	48,39	24,54
12	45	11	100	5	60,50	43,16
13	45	8,5	0	5	57,38	18,16

$R^2 = 0,989$

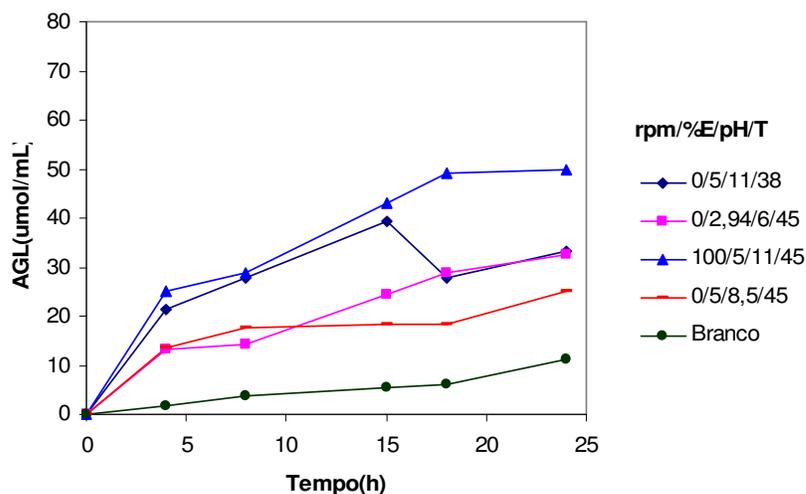


Figura 6. Cinética de hidrólise enzimática dos ensaios para otimização das condições experimentais, utilizando Lipolase 100T

Um novo modelo foi ajustado, acrescentando-se os resultados dos novos experimentos, buscando o máximo da função. A Tabela 15 representa a nova condição experimental obtida, bem como os resultados em termos de AGL obtido pelo modelo e pela realização do ensaio.

Tabela 15. Experimento realizado na otimização das condições operacionais utilizando a Lipolase 100T – 2ª etapa

Modelo:

$$AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot E + a_3 \cdot R \cdot pH + a_4 \cdot pH + a_5 \cdot T \cdot T + a_6 \cdot R \cdot R + a_7 \cdot E \cdot T + a_8 \cdot pH \cdot pH + a_9 \cdot T \cdot R + a_{10} \cdot E \cdot pH$$

Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres (μmol/mL) 15 horas	
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
14	38,0	6	100	5	62,60	51,06

R² = 0,992

Como uma boa concordância entre o valor predito pelo modelo e o obtido na realização da condição experimental não foi alcançada, o resultado obtido através da realização do ensaio, foi acrescentado ao conjunto anterior e um novo modelo ajustado,

bem como uma nova condição de máximo de AGL. A nova condição experimental e o novo modelo encontrado são apresentados na Tabela 16.

Considerando-se os erros experimentais, o valor encontrado na realização do ensaio apresentou boa concordância com o valor predito pelo modelo, como apresentado na Tabela 16, indicando a chegada ao ponto de máxima hidrólise no sistema investigado. Outro fato que indica a chegada do ótimo é a obtenção das mesmas condições experimentais da Tabela 16 quando se realizou uma nova interação.

Tabela 16. Experimento realizado na otimização das condições operacionais utilizando a Lipolase 100T – 3^a etapa

Modelo:

$$AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot E + a_3 \cdot R \cdot pH + a_4 \cdot pH + a_5 \cdot T \cdot T + a_6 \cdot R \cdot R + a_7 \cdot pH \cdot T + a_8 \cdot pH \cdot pH + a_9 \cdot T \cdot R + a_{10} \cdot R + a_{11} \cdot E \cdot pH$$

Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres (μmol/mL) 15 horas	
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
15	37,5	11	130	5	55,46	52,13

$R^2 = 0,988$

Na Figura 7 encontram-se as curvas cinéticas dos experimentos descritos nas Tabelas 15 e 16, durante a hidrólise do efluente utilizando a Lipolase 100T. Observa-se que as cinéticas de hidrólise apresentam pouca diferença entre si, assim como as condições experimentais nas quais foram obtidas.

Na análise dos resultados do planejamento de experimentos observou-se que a condição do ponto central e a condição onde todas as variáveis se encontravam nos níveis máximos (ensaio 8) foram as que apresentaram máxima conversão em termos de AGL. Após a otimização encontrou-se outra condição experimental com conversão similar. As cinéticas das condições mencionadas são apresentadas na Figura 8. Apesar das condições do ensaio 15 permitirem se obter o maior grau de hidrólise utilizando Lipolase 100T na faixa de estudo, em um processo industrial os custos com a enzima podem ser consideráveis. Desta forma, uma condição como a do ponto central pode ser interessante, uma vez que esta utiliza menos enzima sem grande perda do grau de hidrólise, comparado com base no teor de AGL final. Cabe ainda lembrar que um maior grau de hidrólise do efluente não levaria necessariamente ao melhor desempenho da estabilização biológica do efluente, conforme será demonstrado mais adiante.

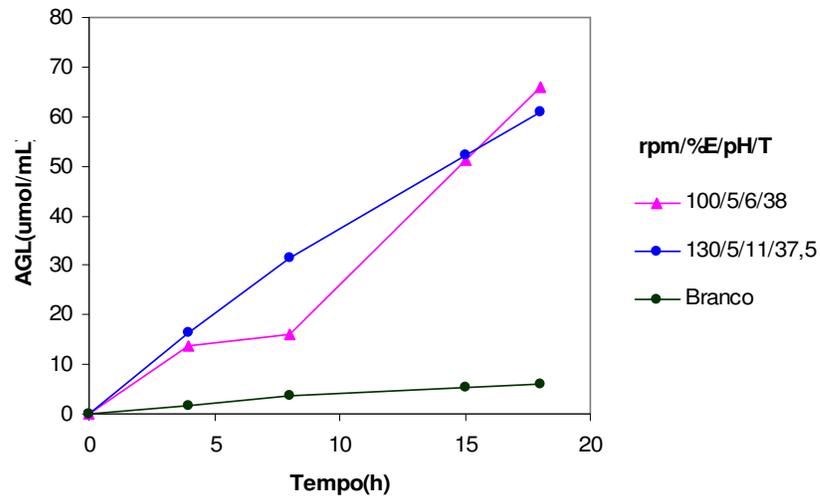


Figura 7. Cinética de hidrólise enzimática dos ensaios para otimização das condições experimentais utilizando Lipolase 100T

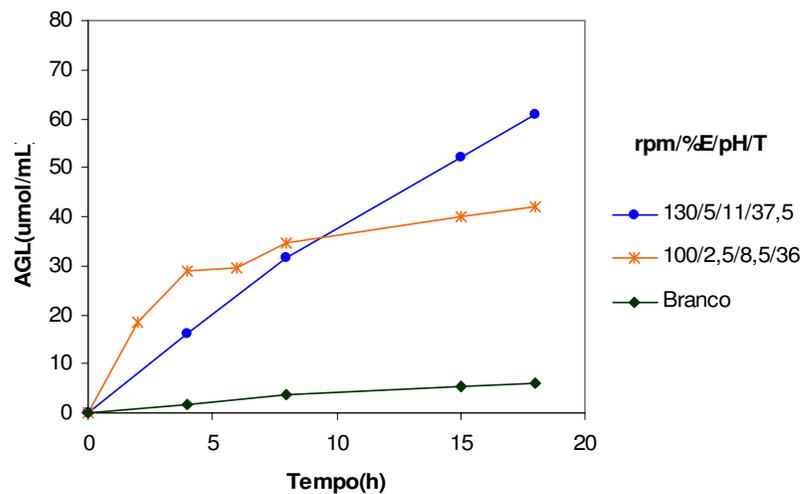


Figura 8. Cinéticas de hidrólise das melhores condições experimentais utilizando a Lipolase 100T

LIPASE FMS

A Tabela 17 apresenta as condições dos experimentos realizados na busca da condição ótima, com base no modelo empírico ajustado aos dados de AGL do planejamento de experimentos, utilizando a Lipase FMS. Nesta tabela também são apresentados os resultados de AGL máximos previstos pelo modelo empírico e os obtidos experimentalmente. As curvas cinéticas dos experimentos da Tabela 17 são apresentadas na Figura 9.

Tabela 17. Experimentos realizados na otimização das condições operacionais utilizando a Lipase FMS – 1ª etapa

Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres (μmol/mL) 15 horas	
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
10	38,5	6	0	5	84,98	88,79
11	45	6	0	4,1	73,28	93,26
12	45	6	100	5	95,88	92,78
13	45	8,1	0	5	90,65	82,63

$R^2 = 0,999$

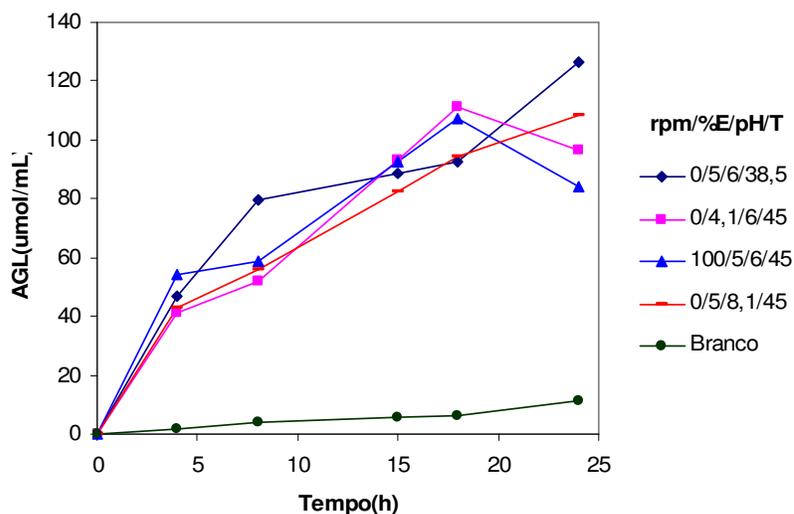


Figura 9. Cinética de hidrólise enzimática dos ensaios para otimização das condições experimentais utilizando Lipase FMS

Os dados da Tabela 17 foram acrescentados ao conjunto de dados do planejamento de experimentos e um novo modelo foi ajustado, visando se encontrar uma única condição experimental que represente o máximo da função. A Tabela 18 apresenta a nova condição experimental obtida com os respectivos valores de AGL encontrados pelo modelo e após a realização do ensaio.

Tabela 18. Experimento realizado na otimização das condições operacionais utilizando a Lipase FMS – 2ª etapa

Modelo: $AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot E + a_3 \cdot pH \cdot pH + a_4 \cdot R + a_5 \cdot T \cdot R + a_6 \cdot T \cdot E + a_7 \cdot pH \cdot T + a_8 \cdot R \cdot E + a_9 \cdot pH \cdot R + a_{10} \cdot E \cdot E$

Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres (μmol/mL) 15 horas	
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
14	27	10,2	200	5	260,08	101,29

$R^2 = 0,999$

Avaliou-se o valor encontrado através da realização do experimento em termos de ácidos graxos livres, e constatou-se que não houve aproximação do valor predito pelo modelo ao obtido experimentalmente. Desta forma, a realização de uma nova iteração fez-se necessária, cuja condição experimental obtida é apresentada na Tabela 19.

Tabela 19. Experimento de otimização realizado utilizando a Lipase FMS – 3ª etapa

Modelo: $AGL = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot E + a_3 \cdot pH \cdot pH + a_4 \cdot R + a_5 \cdot T \cdot R + a_6 \cdot T \cdot E + a_7 \cdot pH \cdot T + a_8 \cdot R \cdot E + a_9 \cdot pH \cdot R + a_{10} \cdot E \cdot E + a_{11} \cdot pH \cdot E$

Ensaio	Condições Experimentais				Teor de ácidos graxos livres (μmol/mL) 15 horas	
	T (°C)	pH	A (rpm)	E (%p/v)	Predito	Experimental
15	45	7,8	200	5	101,56	100,07

$R^2 = 0,998$

O valor encontrado através da realização do experimento demonstrou boa concordância com o modelo, indicando assim que a condição de máxima hidrólise utilizando a Lipase FMS foi alcançada, dentro da faixa de estudo das variáveis.

A Figura 10 apresenta as curvas cinéticas dos experimentos das Tabelas 18 e 19. Observa-se que as condições experimentais diferem quanto à temperatura e pH, obtendo-se, no entanto, conversões similares em 15 h de reação. A quantidade de enzima é a mesma nos dois experimentos, ressaltando a importância desta variável frente às demais

como indicado pela análise estatística. Nota-se que se pode obter a mesma conversão utilizando temperaturas bem distintas.

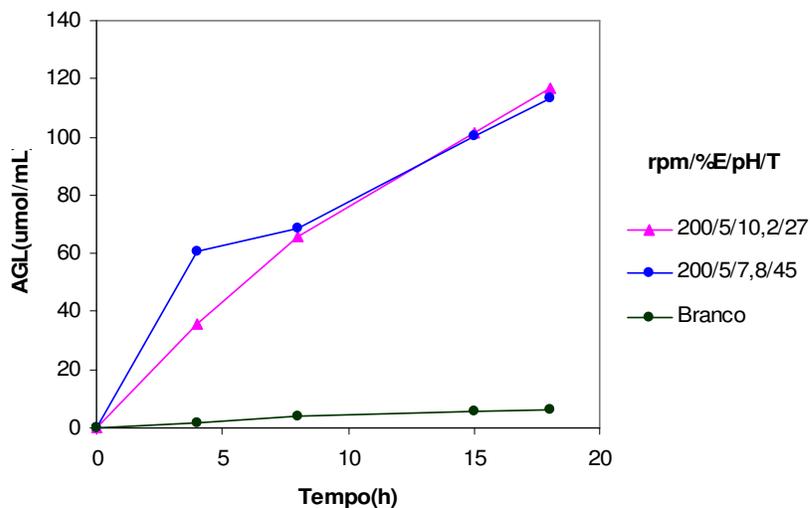


Figura 10. Cinética de hidrólise enzimática dos ensaios para otimização das condições experimentais utilizando Lipase FMS

As cinéticas das condições de maior conversão, obtidas no planejamento e após a otimização, utilizando a lipase FMS, são apresentadas na Figura 11. Observa-se que o valor de conversão máximo em termos de ácidos graxos livres encontrados no planejamento (ensaio 5 - 98,1 µmol/mL) comparado com o obtido através da otimização (ensaio 15 - 100,1 µmol/mL) são similares no tempo de 15 horas de reação. Para os demais testes com esta enzima optou-se por usar a condição de otimizada (ensaio 15), onde o valor obtido experimentalmente apresentou boa concordância com o modelo, embora caiba ressaltar que outras condições podem fornecer conversões semelhantes.

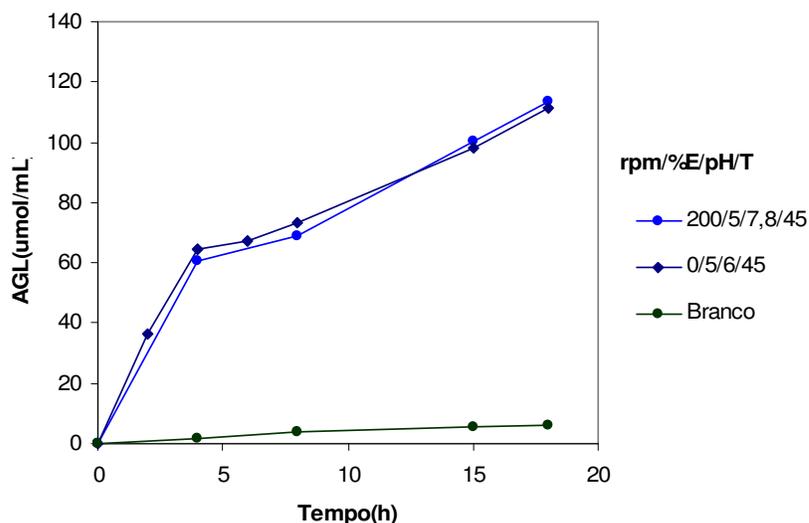


Figura 11. Cinéticas de hidrólise das melhores condições experimentais utilizando Lipase FMS

4.3 Avaliação da Concentração do Substrato

A avaliação do efeito da concentração de substrato é importante em um sistema enzimático para obtenção dos parâmetros cinéticos, que por sua vez serão úteis no dimensionamento do processo em escala industrial. Desta forma, realizou-se uma série de experimentos em batelada com efluentes contendo diferentes concentrações de óleos e graxas, mantendo-se fixa a quantidade de enzima, pH e agitação nas condições otimizadas para a Lipolase 100T e Lipase FMS. A análise foi baseada na produção de AGL após 15 h de reação e a concentração do substrato foi acompanhada através de análise de gordura por Soxhlet.

LIPOLASE 100T

O comportamento da hidrólise utilizando a Lipolase 100T frente à variação da concentração de óleos e graxas inicial do efluente é apresentado na Figura 12. É possível visualizar as diferenças entre as taxas de conversão de óleos e graxas em ácidos graxos, que aumentam com o teor de óleos e graxas, conforme o esperado.

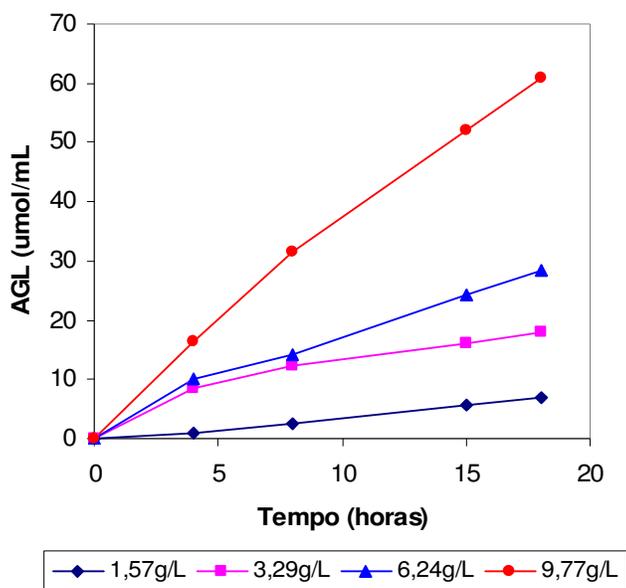


Figura 12. Cinética de hidrólise para diferentes concentrações iniciais de substrato utilizando Lipolase 100T

LIPASE FMS

Na Figura 14 são apresentadas as curvas cinéticas para diferentes concentrações iniciais de óleos e graxos no efluente, utilizando a Lipase FMS. Assim como no caso anterior é possível se evidenciar a diferença acentuada entre as taxas de conversão em ácidos graxos para diferentes concentrações iniciais de substrato.

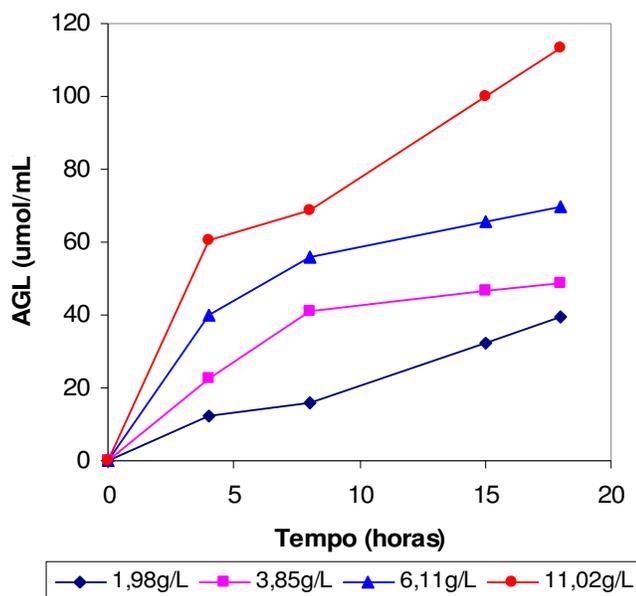


Figura 14. Cinética de hidrólise para diferentes concentrações iniciais de substrato utilizando Lipase FMS

Comparação cinética das duas enzimas frente à concentração de gordura

Os dados obtidos possibilitaram a construção da curva da variação da velocidade inicial de reação com a concentração de substrato, apresentada na Figura 13. A comparação das duas enzimas mostra que a Lipase FMS apresenta velocidade inicial de até 3,5 vezes maior do que a Lipolase 100T. Estes resultados concordam com o observado nos planejamentos de experimentos, que mostraram que valores bem maiores de AGL podem ser obtidos utilizando-se a Lipase FMS para as mesmas condições operacionais. Conforme já discutido, este comportamento pode estar relacionado à inibição ou desativação da Lipolase 100T por compostos presentes no efluente.

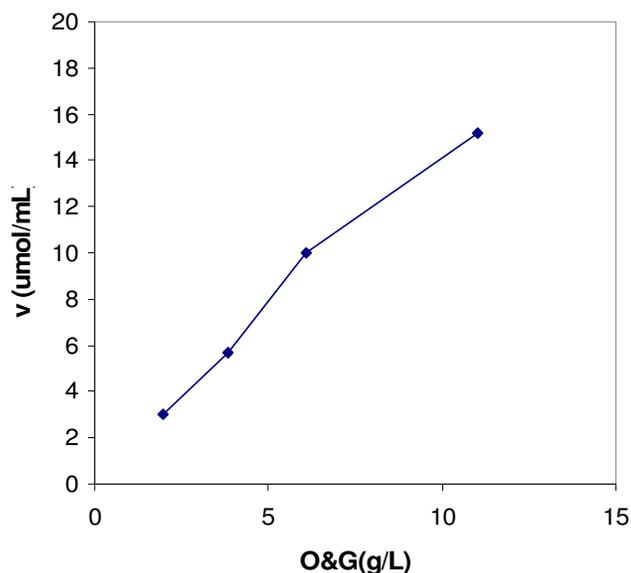


Figura 15. Variação da velocidade da reação enzimática com a concentração do substrato utilizando Lipase FMS

4.4 Testes de Biodegradação Anaeróbia

A degradação anaeróbia de efluentes industriais ocorre através da metanização de orgânicos solúveis antes que os sólidos em suspensão sofram a hidrólise e a completa degradação das partículas, o que aumenta o tempo de retenção hidráulica necessário, sendo as partículas de lipídios as maiores causadoras deste problema. Caso os sólidos não sejam degradados, ocorre um acúmulo destes dentro da camada de biomassa, especialmente gorduras, resultando em um sério impacto no desempenho de reatores anaeróbios. A aplicação de pré-tratamento a fim de proporcionar a hidrólise de partículas de gordura pode acelerar a biodegradação em reatores anaeróbios de efluentes como o de frigoríficos e plantas de embalagens de carne (Masse *et al.*, 2001a).

Desta forma, a etapa de avaliação da biodegradabilidade do efluente de frigorífico de suínos e bovinos com e sem o pré-tratamento enzimático é de extrema importância. A utilização de um processo anaeróbio surge pelo fato deste ser indicado para casos em que o resíduo a ser tratado contenha altas cargas de DBO e de sólidos em suspensão. No entanto, a biodegradação anaeróbia de resíduos ricos em gordura é mais lenta do que em resíduos ricos em carboidratos (Vidal *et al.*, 2000).

A visualização do desempenho do sistema frente à degradação do efluente bruto (controle) e do pré-tratado enzimaticamente (hidrolisado) é o desafio da pesquisa. O processo enzimático entra como um forte coadjuvante para o aumento da biodegradação em tratamento biológico anaeróbio, com a utilização de lipases (Mongkoltharuk e Dharmstithi, 2002).

4.4.1 Aclimação do lodo anaeróbio

Para a avaliação da biodegradabilidade do efluente em questão foi necessário trabalho prévio de aclimação do lodo a ser utilizado no sistema anaeróbio em termos de gordura e extrato enzimático. O lodo adaptado tem por objetivo evitar problemas de choques na biomassa do reator e, conseqüentemente, manter a eficiência de remoções de carga orgânica do resíduo devido à flora microbiana estar adaptada aos componentes da mistura efluente-extrato enzimático da Lipase FMS (Leal, 2000, Aguilar *et al.*, 1995, Alves *et al.*, 2001). O acompanhamento do processo de aclimação do lodo anaeróbio foi realizado através de algumas análises padrões de monitoramento de processos anaeróbios.

a) pH, alcalinidade

O pH é um fator de extrema importância para os microrganismos anaeróbios que constituem o lodo sob processo de aclimação. O pH pode ser uma razão de desequilíbrio dos digestores anaeróbios, sendo o ideal para produção de metano entre 6,8 e 7,2 (Sterling Jr. *et al.*, 2001, Rajeshwari *et al.*, 2000) embora seja possível conseguir estabilidade na formação de metano numa faixa mais ampla de pH, entre 6,0 e 8,0 (Chernicharo, 1997). A Figura 16 expressa a evolução do pH durante o período de aclimação do lodo anaeróbio no reator utilizado.

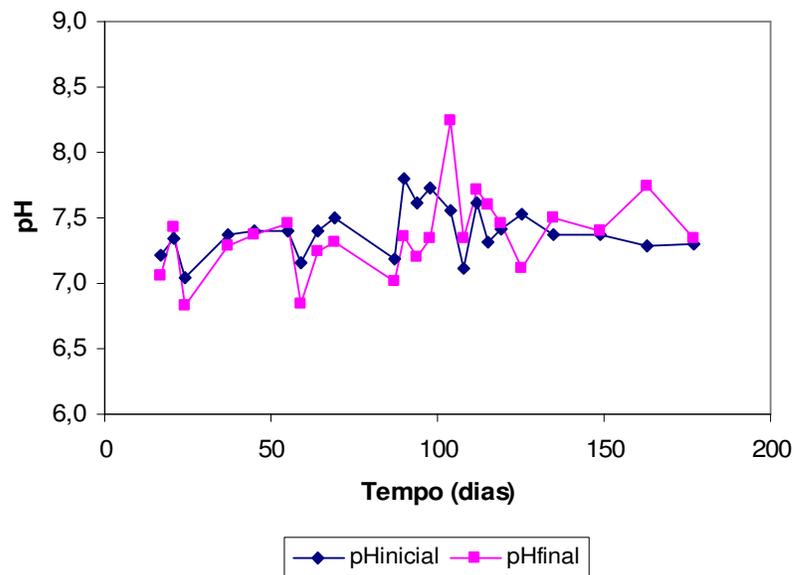


Figura 16. Evolução do pH durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio

Observa-se que o pH durante a operação dos reatores se encontra dentro da faixa recomendada para a digestão anaeróbia (Chernicharo, 1997). Vale ainda salientar que mesmo em pH baixos como 4,5, ainda ocorre atividade das bactérias produtoras de ácidos, mesmo com a produção de metano praticamente interrompida, ocasionando falha no processo (Chernicharo, 1997). As concentrações de ácidos graxos voláteis produzidos na biodegradação de efluentes gordurosos podem afetar a regularização da faixa de pH, pois, se houver um mau funcionamento do sistema e inibição das arqueas metanogênicas, ocorre um acúmulo de ácidos voláteis que continuam sendo produzidos pelas bactérias acidogênicas, comprometendo o tamponamento do meio (Vidal *et al.*, 2000). No entanto, no reator em estudo, a faixa de pH regular indica que o meio está bem tamponado, havendo possivelmente um equilíbrio entre as diferentes populações microbianas.

A alcalinidade é um fator intimamente relacionado com o pH e os ácidos voláteis, sendo igualmente importante para o controle e a operação adequada do processo anaeróbio. É ideal que se mantenha a alcalinidade do meio elevada para evitar quedas acentuadas do pH em virtude da geração de ácidos voláteis (Chernicharo, 1997). A Figura 17 apresenta o comportamento da alcalinidade parcial inicial (na alimentação) e final (após 3 a 4 dias de biodigestão) durante o processo de aclimação do sistema anaeróbio.

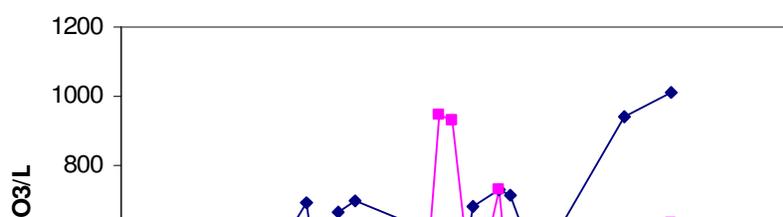


Figura 17. Evolução da alcalinidade parcial inicial e final durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio

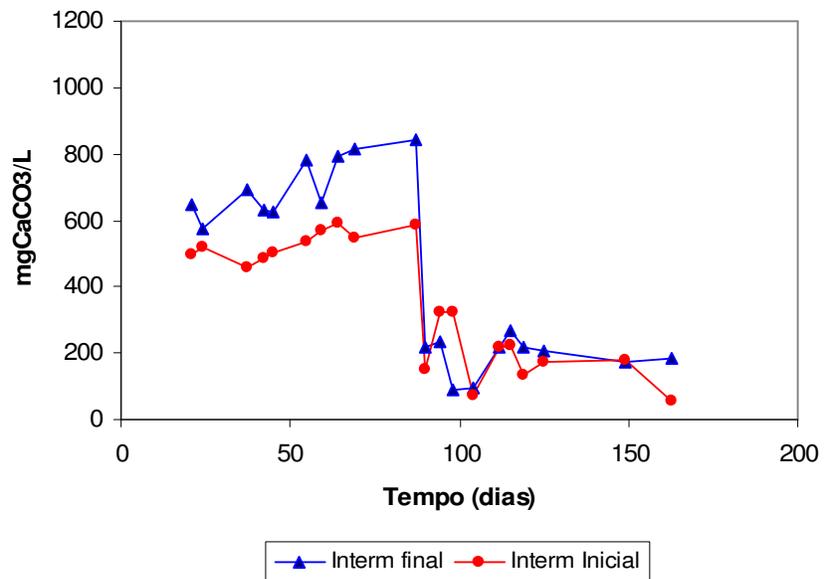


Figura 18. Evolução da alcalinidade intermediária inicial e final durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio

A Figura 18 apresenta a alcalinidade intermediária inicial e final do reator durante o processo de aclimação do lodo do sistema anaeróbio em termos de gordura e extrato enzimático da Lipase FMS. Durante a avaliação dos resultados da alcalinidade intermediária observa-se uma queda pronunciada em torno de 90 dias de operação, provavelmente devido a distúrbios no equilíbrio entre as espécies microbianas no sistema, que poderia ter levado ao acúmulo de ácidos voláteis. No entanto, observa-se que mesmo com esta queda, o tamponamento do sistema foi garantido, uma vez que o pH do meio manteve-se ainda na faixa ideal, bem como a relação entre a alcalinidade intermediária e parcial (0,3) (Chernicharo,1997).

Ainda é importante ressaltar que após a aclimação do lodo à gordura deu-se início a aclimação deste ao extrato enzimático da Lipase FMS, mantendo-se a mesma concentração de gordura. Grandes alterações de alcalinidade não foram observadas após 100 dias de aclimação, mesmo durante a etapa de adaptação a quantidades crescentes deste extrato enzimático inativo para as condições do meio reacional, o efluente frigorífico.

b) Sólidos em Suspensão Voláteis

A quantidade de biomassa no reator pode ser avaliada pela quantidade de sólidos em suspensão voláteis presentes no mesmo (Von Sperling, 1996; Masse *et al.*,2001b, Cammarota *et al.*, 2001; Teixeira, 2001). A análise da quantidade de sólidos em suspensão voláteis no caso analisado é de extrema importância para evidenciar o desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios durante o processo evolutivo da aclimação do lodo anaeróbio. A Figura 19 apresenta a evolução dos sólidos em suspensão voláteis durante o processo de aclimação do reator. Evidenciou-se um aumento significativo da concentração dos sólidos em suspensão voláteis após 142 dias de aclimação, conseqüente de um aumento da massa celular.

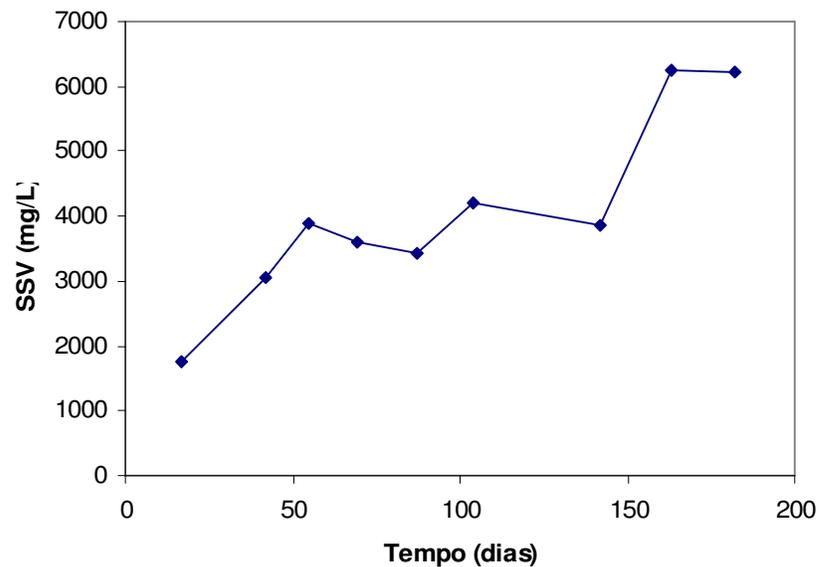


Figura 19. Evolução dos sólidos em suspensão voláteis durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio

c) Nitrogênio

A presença de bicarbonato de amônio é estimulante aos processos anaeróbios e normalmente é resultante da digestão de resíduos ricos em compostos protéicos ou uréia. O seu benefício se dá pelo fato de ser fonte de nitrogênio e tampão para as mudanças de pH. Entretanto, tanto o íon amônio quanto a amônia livre podem se tornar inibidores quando presentes em elevadas concentrações (Chernicharo, 1997). A produção de nitrogênio amoniacal em conteúdos de 50 a 200 mg/L é estimulante para as arqueas metanogênicas (Vidal *et al.*, 2000).

A partir dos 128 dias de aclimação de gordura, iniciou-se a aclimação das concentrações de extrato enzimático da Lipase FMS o que proporcionou um aumento na concentração de nitrogênio, devido à adição de proteínas ao meio, que foi evidenciado e representado nos últimos dois pontos na Figura 20.

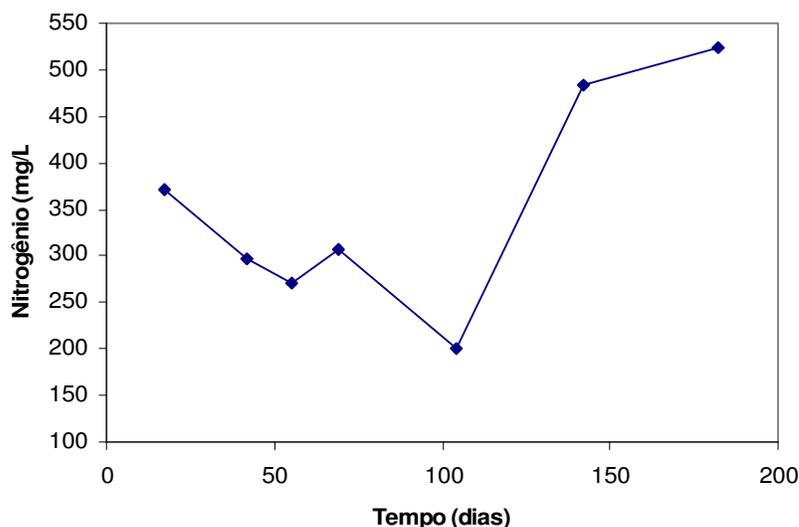


Figura 20. Evolução da concentração de nitrogênio durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio

Os valores máximos de nitrogênio obtidos foram em torno de 500 mg/L, que podem ser considerados altos quando comparados à faixa considerada benéfica às arqueas metanogênicas (Chernicharo, 1997). No entanto, esta concentração de nitrogênio total parece não ter afetado o processo.

d) Micronutrientes

Nos processos biológicos, os nutrientes devem encontrar-se em concentrações adequadas para exercerem efeitos benéficos aos microrganismos. No entanto, concentrações elevadas podem ser prejudiciais ao processo (Chernicharo, 1997, Rajeshwari *et al.*, 2000). Na Tabela 20 encontram-se as concentrações de alguns micronutrientes durante o processo de aclimação. Pode-se observar que todas as concentrações dos micronutrientes encontram-se abaixo das faixas moderadamente ou fortemente inibidora para sistema anaeróbio (Chernicharo, 1997), favorecendo o bom funcionamento do reator.

Tabela 20. Evolução das concentrações dos micronutrientes durante a aclimação do reator anaeróbio

Tempo (dias)	Sódio (mg/L)	Magnésio (mg/L)	Potássio (mg/L)	Cálcio (mg/L)
--------------	--------------	-----------------	-----------------	---------------

55	342,8	3,6	45,6	13,0
69	630,4	3,5	24,6	10,7
87	592,1	3,7	25,5	10,3
142	486,4	5,9	^a	12,9
163	510,9	9,3	^a	12,9

^a Valores não disponíveis

e) Demanda Química de Oxigênio e eficiência de remoção de DQO

A forma definida para o acompanhamento diário da aclimação do lodo anaeróbio foi a análise de DQO do afluente e efluente do reator. Na Figura 21 são apresentados os valores de DQO inicial e final no reator ao longo deste período. Observa-se uma oscilação da DQO inicial dentro da faixa 400 a 1.000 mg/L, em função das diferentes concentrações de gorduras alimentadas ao biorreator. A partir dos 120 dias nota-se que a DQO final permanece em valores baixos entre 100 e 400 mg/L, apesar do aumento da DQO da alimentação, o que indica a adaptação do lodo. Após a adaptação do lodo às concentrações de gordura, deu-se início à aclimação do lodo ao extrato enzimático da Lipase FMS a partir do 128º dia, havendo um aumento mais pronunciado da DQO da alimentação, do que da DQO final, assinalando a aclimação do lodo ao efluente.

A porcentagem de remoção de DQO, bem como cada troca de concentração de gordura e de extrato enzimático da Lipase FMS no processo de adaptação do lodo são apresentadas na Figura 22. A remoção de DQO neste período foi o fator levado em consideração nas trocas de concentrações de gordura e extrato enzimático da Lipase FMS. Pode-se observar grandes oscilações na remoção a cada troca de alimentação (indicadas pelas setas), devido provavelmente a pequenos choques de carga orgânica. Quando se observou uma certa estabilidade da remoção de DQO após atingida a máxima concentração de gordura, deu-se início à aclimação do extrato enzimático da Lipase FMS (representadas pelas setas verdes).

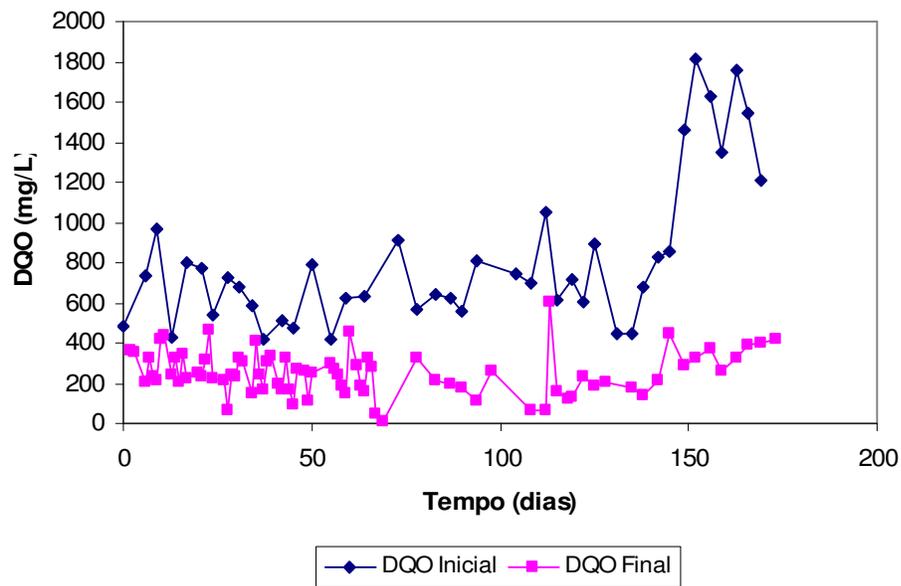


Figura 21. Evolução da aclimação do lodo do reator anaeróbio em termos de DQO inicial e final

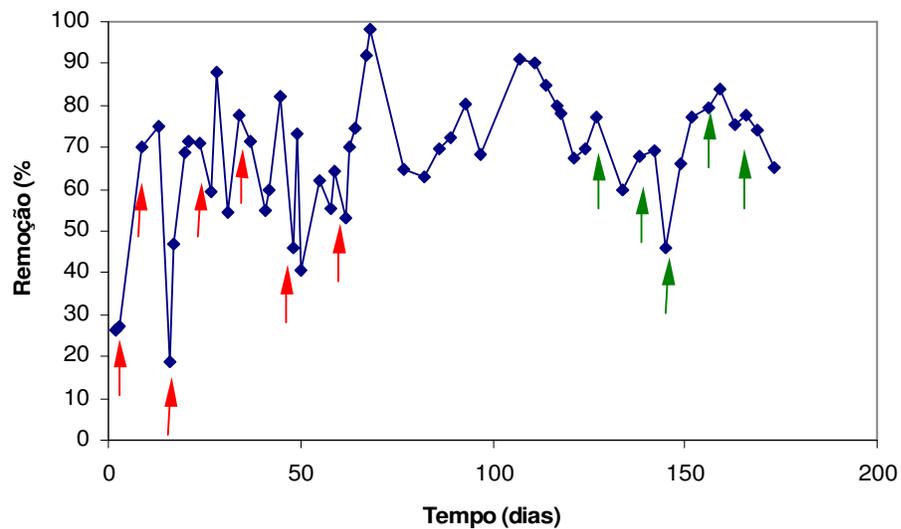


Figura 22. Remoção de DQO durante a aclimação do lodo do reator anaeróbio com crescentes concentrações de óleos e graxas (setas vermelhas) e de extrato enzimático da Lipase FMS (setas verdes).

4.4.2 Tratamento anaeróbio do efluente

Os testes de biodegradação foram iniciados com 30 mL de lodo contendo uma concentração celular de 6.210 mg/L aclimatada em termos de óleos e graxas e extrato enzimático. O lodo foi adicionado a novos reatores: Controle e Hidrolisado para Lipolase FMS e Controle e Hidrolisado para Lipolase 100 T, nas duas quantidades de enzimas.

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados da biodegradação do efluente nos reatores anaeróbios nas diferentes concentrações de óleos e graxas, avaliando-se a eficiência de remoção de DQO ao longo do tempo.

a) Comparação da remoção de DQO nas diferentes concentrações de óleos e graxas e de enzimas

As condições otimizadas de hidrólise foram aplicadas no tratamento anaeróbio para avaliar o efeito da hidrólise no tratamento biológico. Utilizou-se um efluente bruto para comparação da eficiência de remoção do hidrolisado, no sistema biológico anaeróbio, representado na Figura 23.

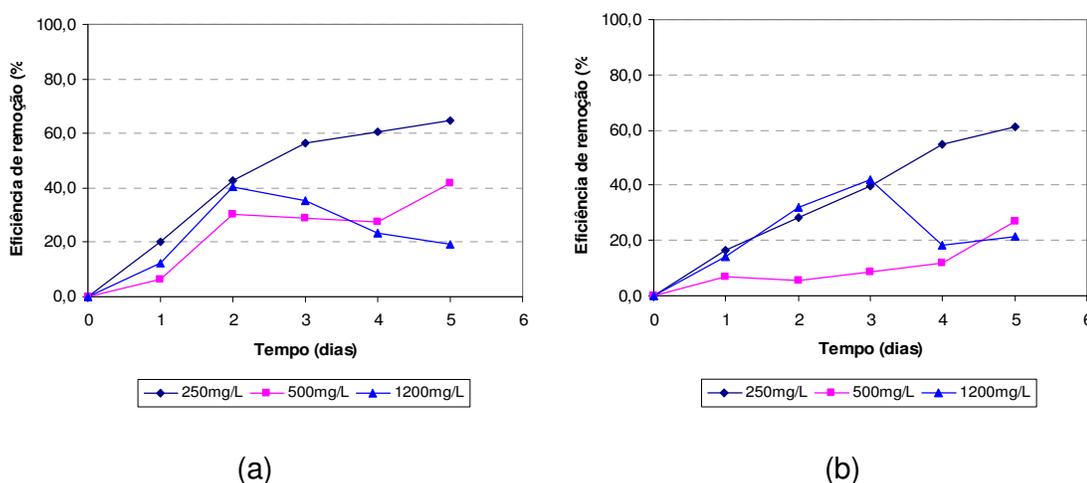


Figura 23. Evolução da eficiência de remoção de DQO no reator controle (a) e hidrolisado (b), ao longo do tempo em diferentes concentrações de óleos e graxas e 5%(p/v) de enzima Lipolase 100T

Observou-se na Figura 23 o comportamento da conversão de remoções do reator controle e hidrolisado. A hidrólise não demonstrou vantagem em termos de remoção de

DQO frente ao não hidrolisado. Ambos os sistemas obtiveram teores de remoções baixos, em torno de 60% ao final de cinco dias de tratamento biológico para a concentração de 250 mg/L de óleos e graxas. As demais concentrações, 500 e 1.200 mg/L, permitiram obter remoções menores que a alcançada com 250 mg/L, indicando o mau funcionamento do sistema e o início do processo inibitório pelas gorduras. Devido a este fato, a concentração de óleos e graxas de 3.000 mg/L não foi empregada ao sistema. Os dados apresentados a seguir serão na forma de DQO normalizada, possibilitando assim uma análise mais criteriosa dos resultados obtidos. O efeito do pré-tratamento enzimático sobre a cinética de remoção da matéria orgânica do efluente em cada concentração de óleos e graxas para as diferentes enzimas nas quantidades de 0,1 e 5% (p/v) pode ser observado nas Figuras 24 a 27.

LIPOLASE 100T

⇒ Concentração de 5%(p/v) de enzima Lipolase 100T

A Figura 24 apresenta a evolução da DQO ao longo do tempo para os sistemas controle e hidrolisado utilizando 5% (p/v) de enzima Lipolase 100T, para cada concentração de óleos e graxas utilizada.

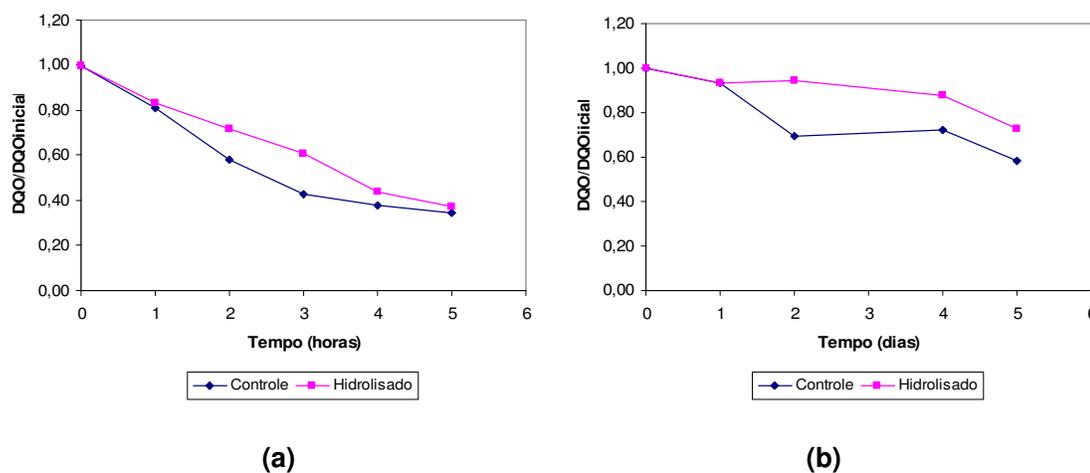
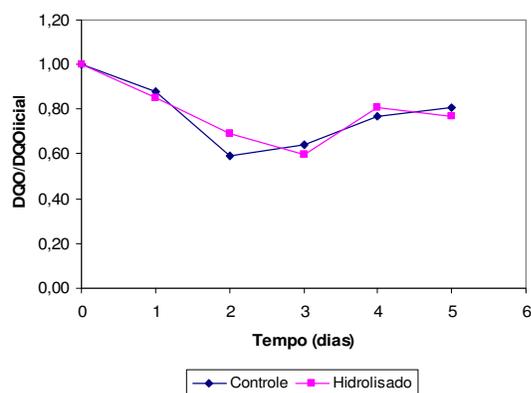


Figura 24. Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L, (b) 500mg/L , e (c)1.200mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 5% (p/v) de Lipolase 100T



(c)

Figura 24 (cont.). Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L, (b) 500mg/L, e (c) 1.200mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 5% (p/v) de Lipolase 100T

A análise destes resultados demonstra que somente na concentração de 250 mg/L de óleos e graxas os reatores apresentaram uma remoção razoável de DQO. Quando a concentração de O&G foi aumentada, a eficiência de remoção diminuiu consideravelmente. Esta situação enfatiza o efeito da gordura na biodegradabilidade. O pré-tratamento enzimático não apresentou efeito relevante utilizando-se 5% (p/v) de enzima Lipolase 100T.

⇒ **Concentração de 0,1% (p/v) de enzima Lipolase 100T**

O efeito do pré-tratamento enzimático com a Lipolase 100T (0,1% p/v) sobre a cinética de remoção da matéria orgânica do efluente (avaliada como DQO) para as concentrações de óleos e graxas de 250, 500, 1.200 e 3.000mg/L pode ser observado na Figura 25.

A diminuição da concentração da enzima apresentou-se promissora, em relação ao aumento da taxa de degradação de óleos e graxas do efluente. Na Figura 25 pode-se observar que até nas mais elevadas concentrações de óleos e graxas a eficiência de remoção foi pouco afetada, apresentando uma pequena tolerância do pré-tratamento ser mais promissor para biodegradação a 3.000mg/L de óleos e graxas.

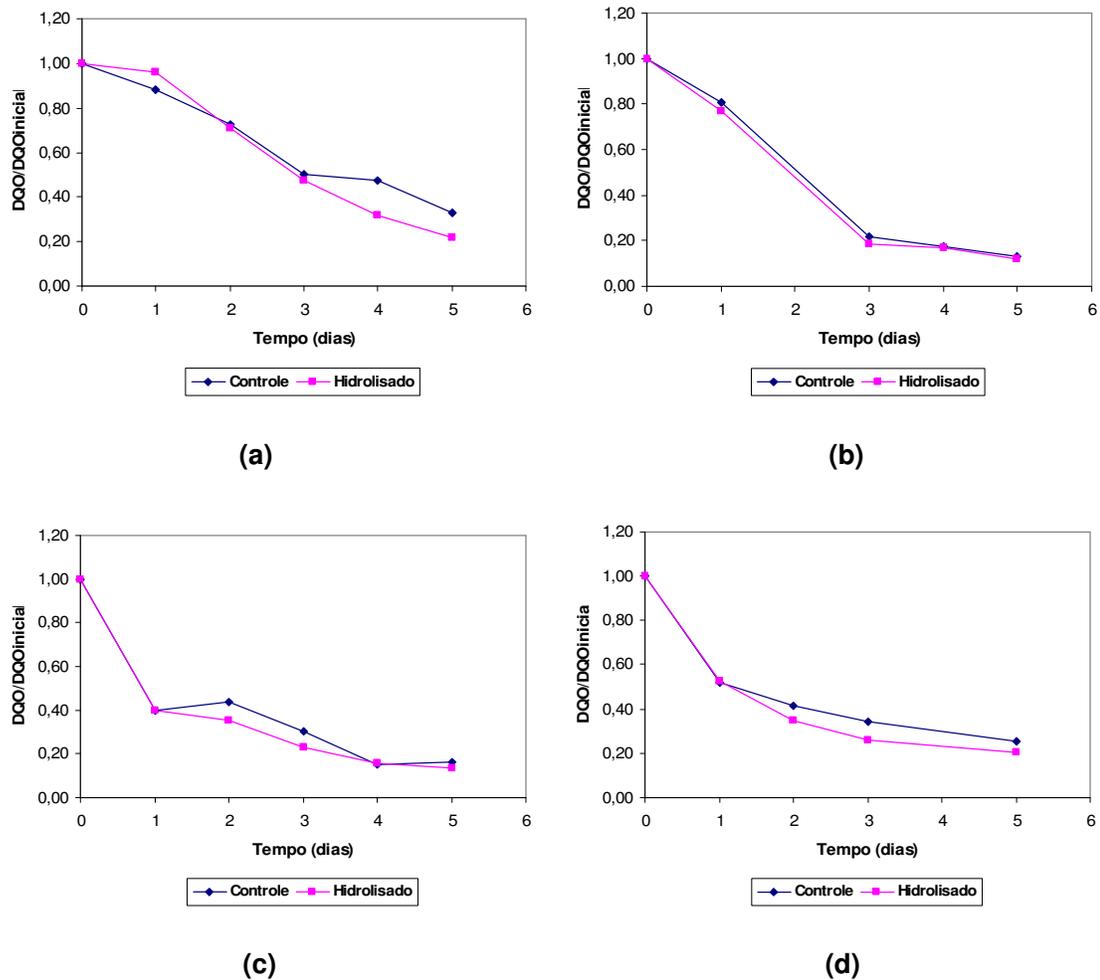


Figura 25. Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L , (b) 500mg/L , (c)1.200mg/L e (d) 3.000mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 0,1% (p/v) de Lipolase 100T

A diferença da eficiência em relação à quantidade de enzima pode estar relacionada com a inibição desta no meio biológico. Esta inibição pode ocorrer provavelmente por haver uma camada excessiva de enzima adsorvida nas partículas de gordura (Masse *et al.*, 2001b), devido provavelmente ao fato desta enzima ser facilmente solubilizada no meio, o que pode ser comprovado pelos valores de DQO inicial (mg/L) serem muito maiores quando comparados com os obtidos ao utilizar-se a Lipase FMS. A enzima livre poderia então aumentar a concentração de matéria orgânica, dificultando desta forma a biodegradação do resíduo. **Outro fator que pode ainda ter levado a este resultado é o fato de que o lodo foi aclimatado com o a Lipase FMS e não com a própria enzima comercial.**

LIPASE FMS

⇒ Concentração de 5%(p/v) de enzima Lipase FMS

A Figura 26 apresenta a evolução da DQO ao longo do tempo para os sistemas controle e hidrolisado utilizando 5% (p/v) de enzima Lipase FMS para cada concentração de óleos e graxas utilizada.

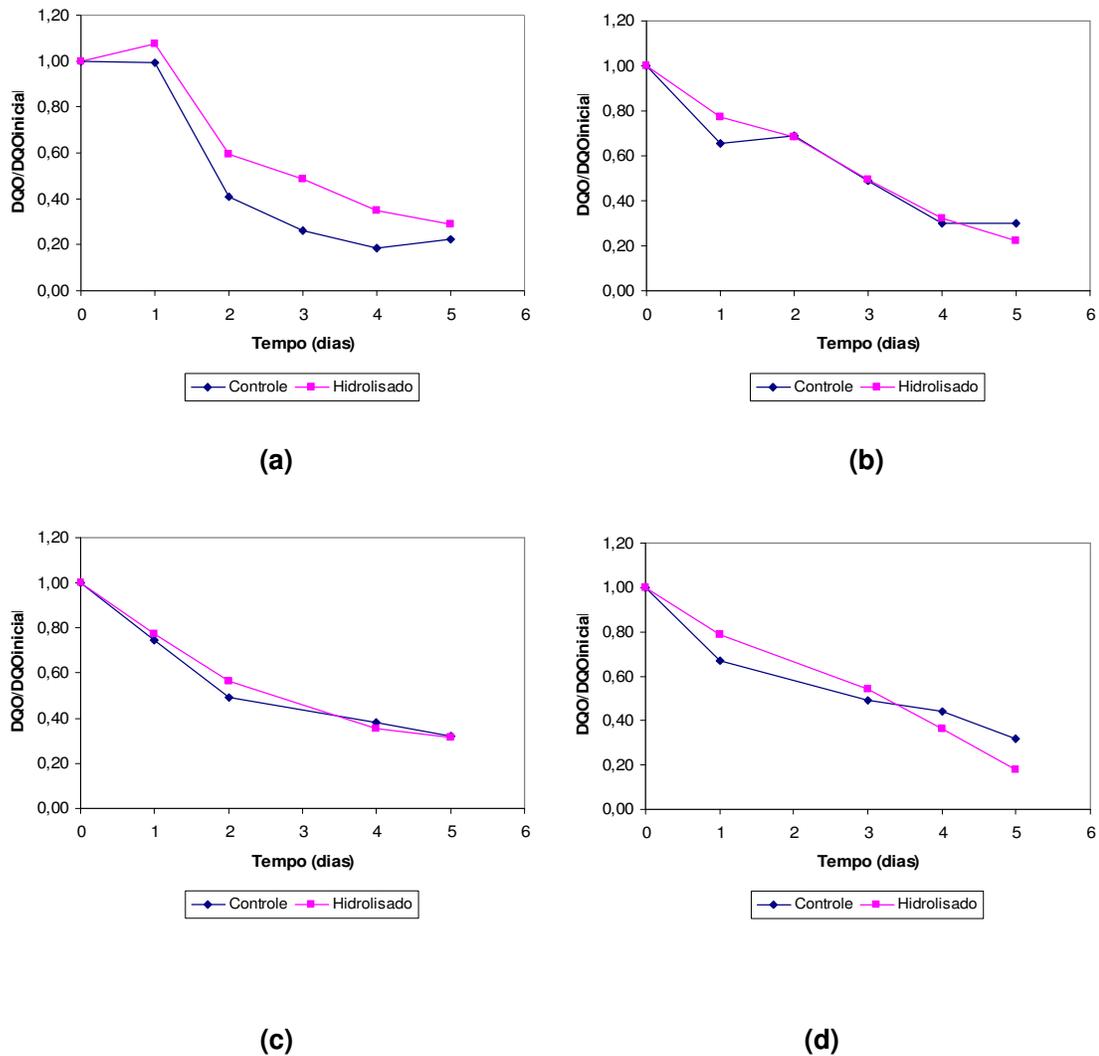


Figura 26. Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L, (b) 500mg/L, (c) 1.200mg/L e (d) 3.000mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 5% (p/v) de Lipase FMS

Na Figura 26, observa-se que ao aumentar-se a concentração de óleos e graxas, não houve mudanças na eficiência de remoção, mesmo para alimentação do reator com efluente bruto (3.000 mg/L), o que é um indicativo de que o lodo estava muito bem aclimatado, com uma seleção de microrganismos anaeróbios. A aclimação do lodo durante a avaliação da biodegradação ocorreu provavelmente devido ao fato do aumento da concentração da gordura ter sido realizada de forma gradual minimizando o choque de carga. Possivelmente um aumento mais pronunciado da carga de gordura em cada etapa, poderia levar a uma diferenciação mais nítida do comportamento do reator controle e hidrolisado.

Pesquisas já relatavam que o lodo aclimatado ou com microrganismos específicos são eficientes aliados no tratamento de resíduos com altas concentrações de DQO (Leal, 2000, Aguilar *et al.*, 1995, Alves *et al.*, 2001).

⇒ Concentração de 0,1%(p/v) de enzima Lipase FMS

O pré-tratamento enzimático com a Lipase FMS (0,1% p/v) avaliado quanto à remoção da matéria orgânica do efluente nas concentrações de óleos e graxas de 250, 500, 1.200 e 3.000mg/L pode ser observado na Figura 27.

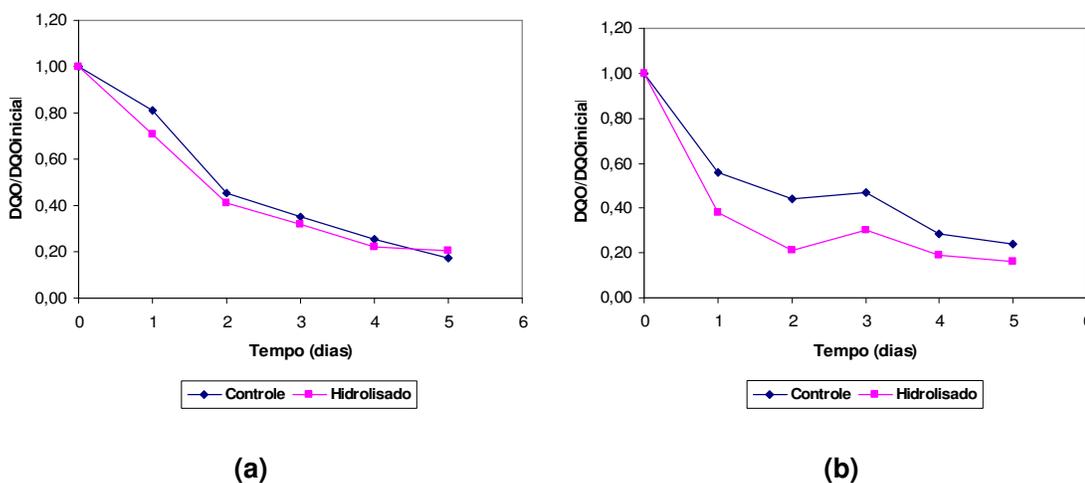


Figura 27. Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L, (b) 500mg/L, (c) 1.200mg/L e (d) 3.000mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 0,1% (p/v) de Lipase FMS

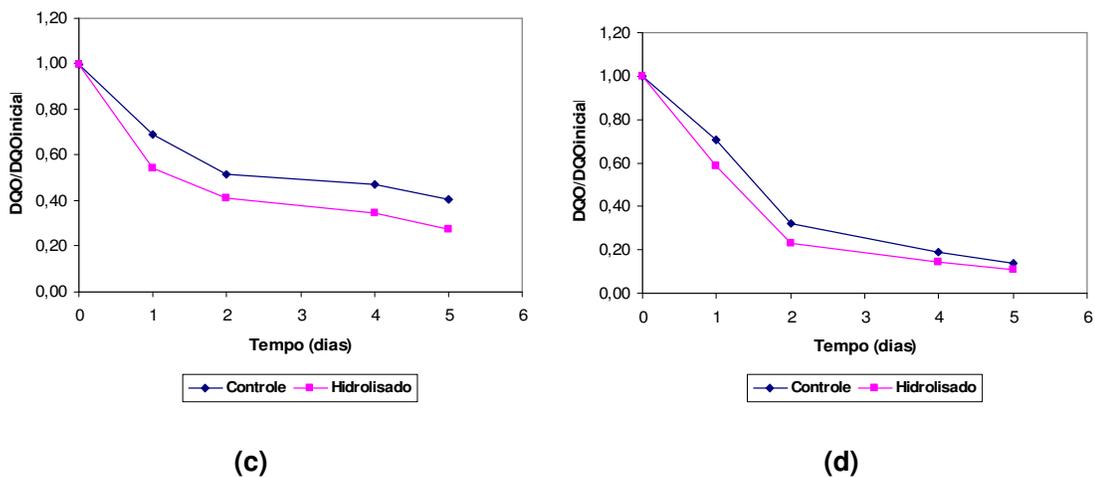


Figura 27 (cont.). Evolução comparativa da DQO ao longo do tempo para efluente com teor de óleos e graxas de (a) 250mg/L, (b) 500mg/L, (c) 1.200mg/L e (d) 3.000mg/L, sem tratamento e pré-tratado com 0,1% (p/v) de Lipase FMS

A utilização de 0,1% (p/v) de enzima permitiu manter-se a alta eficiência de remoção de DQO. Observa-se um aumento na remoção de DQO do efluente tratado enzimaticamente quando comparado ao efluente bruto (controle), principalmente para as concentrações de O&G de 500 e 1.200 mg/L. Na concentração de 3.000 mg/L de O&G as curvas de evolução de DQO voltam a se aproximar, como no caso da concentração de 250 mg/L, mais um forte indicio, de aclimação do lodo no decorrer do aumento das concentrações de óleos e graxas.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

- ⇒ A máxima conversão em ácidos graxos livres para ambas enzimas foi obtida em alta quantidade de enzima (5% p/v), e nas temperaturas de 37,6°C (AGL= 52,13 $\mu\text{mol/mL}$) e 45°C (AGL=100,07 $\mu\text{mol/mL}$) para Lipolase 100T e Lipase FMS. Estas foram as variáveis que mais influenciaram o processo de hidrólise, como demonstrado na análise estatística;
- ⇒ Para a Lipase FMS, boas conversões de ácidos graxos livres (AGL= 101,29 $\mu\text{mol/mL}$) podem também ser obtidas no nível inferior de temperatura (27°C);
- ⇒ A Lipolase 100T apresentou menor afinidade pelos óleos e graxas e menor velocidade inicial de reação do que a Lipase FMS; que, desta forma, apresentou maiores conversões de ácidos graxos livres em relação à enzima comercial nas condições operacionais do planejamento;
- ⇒ A utilização de quantidades elevadas de enzima prejudica a biodegradabilidade do efluente, sendo que a Lipolase 100T apresenta um efeito mais pronunciado que a Lipase FMS, provavelmente devido à sua solubilização;
- ⇒ O pré-tratamento enzimático no menor nível de quantidade de enzima (0,1 %p/v) se mostrou promissor para o aumento da eficiência de biodegradação do efluente industrial, chegando a remoções de 95%.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar alguns pontos que podem ainda ser explorados, como:

- ⇒ Utilização de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos triglicerídeos consumidos e os ácidos graxos livres formados durante a hidrólise, obtendo-se uma melhor sensibilidade na avaliação da cinética da reação.

- ⇒ Avaliação da biodegradação do efluente utilizando maiores choques de carga, para simular de maneira mais realista o comportamento do efluente industrial e evitar a aclimatação do lodo durante o teste.
- ⇒ Investigação de quantidades de enzimas intermediárias **as que foram utilizadas (0,1-5%p/v) para realização desta pesquisa.**
- ⇒ **A realização de ensaios de hidrólise em longa duração com efluente em tempo real.**
- ⇒ Avaliação da eficiência do pré-tratamento enzimático em sistemas de lodo ativado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR A., CASAS C., LEMA J.M., 1995. "Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and inhibition", *Water Research*, v.29, n. 2, pp. 505-509.
- AITKEN M.D., MASSEY I.J., CHEN T., HEILER., 1994. "Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants", *Water Research*, v. 28, n.9, pp. 1879-1889.
- ALVES M.M., MOTA J.A.V., ÁLVARES R.M.P., PEREIRA M.A., MOTA M., 2001. "Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: Oleic acid toxicity and biodegradability", *Water Research*, v.35, n. 1, pp. 264-270.
- APHA- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION 1995. *Standart methods for the examination of water and wastewater*, 19th ed. Washington.
- BALCÃO V.M., PAIVA A.L., MALCATA F.X., 1996. "Biorreactors with immobilized lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, pp. 392-416.
- BERARDINO D.S., COSTA S., CONVERTI A., 2000. "Semi-continuous anaerobic digestion of a food industry wastewater in an anaerobic filter", *Bioresource Technology*, v.71, pp. 261-266.
- BJÖRNSSON L., MURTO M., JANTSCH T.G., MATTIASSON B., 2001. "Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion", *Water Research*, v. 35, n. 12, pp. 2833-2840.
- BOUWER S.T., CUPERUS F.P., DERKSEN T.P., 1997. "The performace of enzyme-membrane reactors with immobilized lipase", *Enzyme and Microbial Technology*, v.21, pp. 291-296.
- CHERNICHARO C.A.L., 1997. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.5, *Reatores anaeróbios*, 1ª edição, DESA-UFMG, Minas Gerais.
- CAMMAROTA M.C., TEIXEIRA G.A., FREIRE D.M.G., 2001. "Enzymatic pré-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents", *Biotechnology Letters*, v 23, pp. 1591-1595.

- CARNESECA, L.F., 2001. "Planejamento e Administração de Recursos Hídricos", *Revista Engenharia*, DAEE/SP, Engenho Editora Técnica, edição 548.
- CAVALCANTI J.E.W.A., BRAILE P.M., 1993. *Manual de tratamento de águas residuárias industriais*, 2ª edição, CETESB, São Paulo.
- DE FELICE B., PONTECORVO G., CARFAGNA M., 1997. "Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC20255 and *Pseudomonas putida*", *Acta Biotechnologia*, v.17, pp. 231-239.
- DEL POZO R., DIEZ V., BELTRÁN S., 2000. "Anaerobic pre-treatment of slaughterhouse wastewater using fixed-film reactors", *Bioresource Technology*, v.71, pp. 143-149.
- FEPAM-Fundação Estadual de Proteção Ambiental, 2003. Licença de operação LO N° 2815/2003-DL.
- FEPAM-Fundação Estadual de Proteção Ambiental, 1997. Relatório Técnico.
- FADIOGLU S., SOYLEMEZ Z., 1997. "Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. *Food Research International*", v.30 n. 3/4, pp. 171-175.
- FREIRE, D.M.G., GOMES, P.M., BON, E.P.S., SANT'ANNA Jr., G.L., 1997. "Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*", *Journal of the Brazilian Society for Microbiology*, v 28, pp. 6-12.
- FREIRE, D. M. G.; CAMAROTTA, M. C.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA Jr, G. L.; FREIRE, D. D. C.; RUSSO, C. Production process and composition of an enzymatic preparation, and its use for the treatment of domestic and industrial effluents of high fat, protein and/or carbohydrate content. 2003. Patente: Privilégio e Inovação. n. 01973858.2-2405, "Production process and composition of an". 15 de out. de 2001 (Depósito); 12de jun. de 2003 (Exame).
- HAWKES F.R., DONNELLY T., ANDERSON G.K., 1995. "Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater", *Water Research*, v.29, pp. 525-533.
- HENZE M, 1997. "Trends in Advanced Wastewater Treatment", *Water Science and Technology*, v.35 (10), pp. 1-4.
- HWU C.-S., VAN LIER J.B., LETTINGA G., 1998b. "Physicochemical and biological performance of expanded granular sludge bed reactors treating long-chain fatty acids", *Process Biochemistry*, v. 33, n.1, pp. 75-81.

- HWU C.-S., TSENG S.-K., YUAN C.-Y., KULIK Z., LETTINGA G., 1998a. "Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process", *Water Research*, v. 32, n. 5, pp. 1571-1579.
- HWU C.-S., LETTINGA G., 1997. "Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, pp. 297-301.
- HWU C.-S., DONLON B., LETTINGA G., 1996. "Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various", *Water Science and Technology*, v.34, pp. 351-358.
- HU W.C., THAYANITHY K., FORSTER C.F., 2002. "A kinetic study of anaerobic digestion of ice-cream wastewater", *Process Biochemistry*, v.37, pp. 965-971.
- JUNG F., CAMMAROTA M.C., FREIRE D.M.G. 2002. "Impact of enzymatic pré-hidrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters". *Biotechnology Letters*, v.24, pp. 1797-1802.
- KARLSSON I., 1990. "Carbon source for denitrification from pre-precipitated sludge", *Chemical Water and Wastewater Treatment*. Springer, Berlin.
- KARAM J., NICELL J.A.,1997. "Potential applications of enzymes in waste", *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v.69, pp. 141-153.
- KONDYLI E., MASSOURAS T., KATSIARI M.C., VOUTSINAS L.P., 2003. "Free fatty acids and volatile compounds in low-fat kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures", *International Dairy Journal*, v.13, pp. 47-54.
- KOLOSSVÁRY G.J., 1996. "Optimization of lipase activity from *Rhizopus sp.* In triglyceride hydrolysis using a modified simplex method", *Process Biochemistry*, v.31, n. 6, pp. 595-600.
- LALMAN J.A., BAGLEY D.M., 2000. "Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid", *Water Research*, v.34, n.17, pp. 4220-4228.
- LALMAN J.A., BAGLEY D.M., 2001. "Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids", *Water Research*, v.35, n. 12, pp. 2975-2983.
- LEAL M.C.M.R., 2000. *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. Tese Mestrado em Ciências, Engenharia Química, COPPE/UFRJ.

- LEAL M.C.C.R., CAMMAROTA M.C., FREIRE D.M.G., SANT'ANA Jr. G.L., 2002. "Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters", *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, n.2, pp. 175-180.
- LINKO Y.Y., LAMSA M., WU X., UOSUKAINEN E., SEPPALLA J., LINKO P., 1998. "Biodegradable products by lipase biocatalysis" *Journal of Biotechnology*, v.66, pp. 41-50.
- MAARTENS A., SWART P., JACOBS E.P., 1996a. "An enzymatic approach to the cleaning of ultrafiltration membranes fouled in abattoir effluent", *Journal of Membrane Science*, v.119, pp. 9-16.
- MAARTENS A., SWART P., JACOBS E.P., 1996b. "Characterisation techniques for organic foulants adsorbed onto flat-sheet UF membranes used in abattoir effluent", *Journal of Membrane Science*, v.119, pp. 1-8.
- MACÊDO J.A.B., 2001. *Águas & Águas*. Livraria Varela, São Paulo.
- MALCATA F.X., REYES H.R., GARCIA H.S., HILL Jr. C.G., AMUNDSON C.H., 1992. "Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases", *Enzyme Microbiology Technology*, v.14.
- MASSE L., KENNEDY K.J., CHOU S., 2001a. "The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction on fat particles in slaughterhouse wastewater", *J. Chemical Technology Biotechnology*, v. 76, pp. 629-635.
- MASSE L., KENNEDY K.J., CHOU S., 2001b. "Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater". *Bioresource Technology*, v.77, pp. 145-155.
- MASSÉ D.I., MASSE L., 2001. "The effect of temperature on slaughterhouse wastewater treatment in anaerobic sequencing batch reactors", *Bioresource Technology*, v.76, pp. 91-98.
- MASSE L., MASSÉ D.I., KENNEDY K.J., 2003. "Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater", *Process Biochemistry*, v. 38, pp. 1365-1372.
- MATA-ALVAREZ J., MACÉ S., LLABRÉS P., 2000. "Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives", *Bioresource Technology*, v.74, pp. 3-16.

- MENDES A.A., DE CASTRO H.F., 2003. "Biotratamento para redução de teor de Lipídeo presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos". Em: *SINAFERM- XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, UFSC-EQA, Florianópolis/SC.
- MICHAUD S., BERNET N., BUFFIÈRE P., ROUSTAN M., MOLETTA R., 2002. "Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors", *Water Research*, v.36, pp. 1385-1391.
- MONGKOLTHANARUK W., DHARMSTHITI S., 2002. "Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium", *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 50, pp. 101-105.
- NIKOLAEVA S., SÁNCHEZ E., BORJA R., TRAVIESO L., WEILAND P., MILÁN Z., 2002. "Treatment of piggery waste by anaerobic fixed bed reactor and zeolite bed filter in a tropical climate: a pilot scale study", *Process Biochemistry*, v. 38, pp. 405-409.
- NOVO NORDISK, 1992. *A ação das enzimas*. Boletintécnico B209C.
- OLIVEIRA A.L.A., GIOIELLI L.A., OLIVEIRA M.N.,1999. "Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19 n. 2.
- OSWAL N., SARMA P.M., ZINJARDE S.S., PANT A., 2002. "Palm oil Mill effluent treatment by a tropical marine yeast", *Bioresource Technology*, v. 85, pp. 35-37.
- PAREDES C., BERNAL M.P., CEGARRA J., ROIG A., 2002. "Bio-degradation of olive Mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes", *Bioresource Technology*, v.85, pp. 1-8.
- PEREIRA E.B., TEIXEIRA R.M., DE CASTRO H.F., FURIGO Jr. A., 2002. "Tratamento enzimático utilizando lipases em rejeitos industriais frigoríficos". *COBEQ- XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Natal/RN.
- PEREIRA E.B., DE CASTRO H.F., FURIGO Jr. A., 2003. "Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Cândida rugosa*". *SINAFERM- XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, UFSC-EQA, Florianópolis/SC.
- RAJESHWARI K.V., BALAKRISHNAN M., KANSAL A., LATA K., KISHORE V.V.N., 2000. "State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industria wastewater treatment", *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v.4, pp. 135-15.

- RINZEMA A., ALPHENAAR A., LETTINGA G., 1993. "Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors", *Process Biochemistry*, v.28, pp. 527-537.
- RINZEMA A., BOONE M., VAN KNIPPENBERGK., LETTINGA G., 1994. "Bacterial effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion", *Water Enviromen Research*, v. 66, pp 40-90.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J., RODRÍGUEZ-GARZA I., PEDRAZA-FLORES E., BALAGURUSAMY N., SOSA-SANTILLAN G., GARZA-GARCÍA Y., 2002. "Kinética of anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in batch and upflow anaerobic sludge blanket reactor", *Bioresource Technology*, v.85, pp. 235-241.
- SARTI A., VIEIRA L.G.T., FORESTI E., ZAIAT M., 2001. "Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a packed-bed bioreactor for wastewater treatment", *Bioresource Technology*, v.78, pp. 231-238.
- SALMINEN E., RINTALA J., 2002. "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review", *Bioresource Technology*, v. 83, pp. 13-26.
- STERLING Jr. M.C., LACEY R.E., ENGLER C.R., RICKE S.C., 2001. "Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure", *Bioresource Technology*, v.77, pp. 9-18.
- TEIXEIRA G.A., 2001. *Tratamento seqüencial de efluentes da indústria de laticínios: hidrólise de gorduras e tratamento biológico*. Tese Mestrado em Ciências, Engenharia Química, COPPE/UFRJ.
- TEIXEIRA R.M., PEREIRA E.B., PEREIRA F.F., REGINATO V.S., SOARES H.M., FURIGO Jr. A., 2002. "Remoção de nitrogênio de efluente agroindustrial utilizando biorreatores". *COBEQ- XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Natal/RN.
- TELES F.R.R., CABRAL J.M.S., SANTOS J.A.L., 2001. "Enzymatic degreasing a solid waste from the leather industry by lipases", *Biotechnology Letters*, v.23, pp. 1159-1163.
- UHLIG H., 1998. *Industrial Enzymes and their Applications*. John Wiley & Sons, INC., Canadá.
- VARGAS G.D.L.P., 2004. *Estudo da produção de lipase por Penicillium simplicissimum utilizando torta de soja como substrato*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. URI Campus de Erechim/RS.

- VEDANA A., BENINCÁ C., RIGO E.S., RIGO E., STESENS J., CONSOLI M.R., VENDRUSCOLO M.V., 1999. "Tratamentos de águas residuárias na indústria de carnes". *Revista Perspectiva*, v23, n. 84, pp. 09-45.
- VIDAL G., CARVALHO A., MÉNDEZ R., LEMA J.M., 2000. "Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewater", *Bioresource Technology*, v74, pp. 231-239.
- VONDERWULBECKE T., KIESLICH K., HELMUT E., 1992. "Comparison of lipases by different assays". *Enzyme Microbiology Technology*, v.14.
- VON SPERLING M., 1996. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 2 *Princípios básicos do tratamento de esgotos*. 1ª edição, DESA-UFMG. Minas Gerais.
- VON SPERLING M., 1997. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 4 *Lodos ativados*. 1ª edição, DESA-UFMG, Minas Gerais.
- VORKAMP K., HERRMANN R., HVITVED-JACOBSEN T., 2001. "Characterisation of organic matter from anaerobic digestion of organic waste by aerobic microbial activity", *Bioresource Technology*, v.78, pp. 257-265.