



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

***HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E BIODIGESTÃO DE
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS
AVÍCOLAS***

Gisanara Dors

Florianópolis, SC, Brasil.
Fevereiro/2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GISANARA DORS

***HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E BIODIGESTÃO DE
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS AVÍCOLAS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

ORIENTADOR: Prof. D.Sc. Agenor Furigo Junior

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira


Florianópolis, SC, Brasil.
Fevereiro/2006

Hidrólise Enzimática e Biodigestão de Efluentes da Indústria de Produtos Avícolas


Por

Gisanara Dors


Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
orientador



Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
co-orientador



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Coordenador do CPGENQ

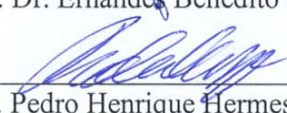
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.



Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira



Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo



Prof. Dr. Júlio César dos Santos

Florianópolis, 24 de Fevereiro de 2006

"Nunca perca a fé na humanidade, pois ela é como um oceano. Só porque existem algumas gotas de água suja nele, não quer dizer que ele esteja sujo por completo".

Mahatma Ghandi

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

Aos meus Pais, por todo o apoio e amor que foram a mim dedicados através de ensinamentos, conselhos, lições de vida, finanças e colaboração em todos os sentidos. Agradeço a vocês por tudo. É a vocês, principalmente, que eu dedico esta conquista.

As minhas irmãs, Giniani e Janaina, que sempre me apoiaram e ajudaram. Vocês são e sempre serão, além de irmãs, minhas melhores amigas.

Ao Marcelo, por todo amor e dedicação, por compartilhar comigo as horas difíceis e as conquistas.

Ao professor Agenor pela oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.

Ao professor Ernandes pela orientação, paciência, amizade e aos ensinamentos para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), pelo apoio, ajuda e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Tratamento de Efluentes (LTE), obrigada pelas análises de DQO.

Ao Gustavo, Murilo, Ana Cláudia, pela amizade e a todos os colegas da Turma 2004 da Pós – graduação da Engenharia Química da UFSC.

Ao Edevilson por sempre estar disposto a ajudar e compreender.

Ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, seus professores e funcionários, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, D.Sc. Pedro Henrique Hermes de Araújo e Dr. Júlio Cesar dos Santos, por terem gentilmente aceitado fazerem parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento.

A CAPES pelo suporte financeiro.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Introdução.....	4
3.2 Efluentes da indústria de produtos avícolas.....	4
3.2.1 Água no abatedouro: procedência e tratamento.....	6
3.2.2 Características do efluente do abatedouro	7
3.3 Biodegradabilidade.....	7
3.4 Lipídeos em águas residuárias.....	11
3.5 Problemas relacionados aos elevados teores de lipídeos no tratamento anaeróbio de águas residuárias	13
3.6 Tratamento de águas residuárias utilizando enzimas	16
3.7 Enzimas.....	20
3.8 Lipases	21
3.8.1 Fontes	22
3.8.2 Características e propriedades	23
3.8.3 Reações catalisadas pelas Lipases.....	23
3.8.4 Fatores que interferem no processo de hidrólise.....	24
3.8.5 Aplicações das Lipases	27
3.8.5.1 Detergentes.....	27
3.8.5.2 Indústria alimentícia	28
3.8.5.3 Indústria farmacêutica e química fina.....	28
3.8.5.4 Hidrólise de óleos e graxas	28
3.8.5.5 Outras aplicações.....	30
3.9 Tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos utilizando lipases	30

4 Material e Métodos	33
4.1 Introdução.....	33
4.2 Material.....	33
4.2.1 Reagentes.....	33
4.2.2 Enzimas.....	33
4.2.3 Substrato.....	34
4.2.4 Inóculo.....	34
4.3 Equipamentos.....	34
4.4 Procedimentos Experimentais.....	34
4.4.1 Caracterização físico-química do efluente.....	34
4.4.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das preparações enzimáticas.....	35
4.4.2.1 Determinação da atividade hidrolítica.....	35
4.4.2.2 Influência do pH na atividade da enzima.....	36
4.4.2.3 Influência da temperatura na atividade da enzima.....	36
4.4.3 Hidrólise e biodigestão do efluente.....	36
4.5 Análises.....	39
4.5.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	39
4.5.2 Determinação do teor de ácidos graxos livres.....	40
4.5.3 Determinação do índice de acidez total.....	40
4.5.4 Determinação do índice de saponificação.....	41
4.5.5 Determinação de amônia.....	41
4.5.6 Determinação da concentração de óleos e graxas.....	42
4.5.7 Determinação da alcalinidade total.....	42
4.5.8 Determinação da concentração de glicerol.....	43
4.5.9 Determinação dos sólidos suspensos totais.....	43
5 Resultados e Discussão	45
5.1. Caracterização físico-química do efluente.....	45
5.2. Caracterização das propriedades catalíticas e físico-químicas das Lipases.....	46
5.2.1. Influência do pH na atividade das lipases.....	46
5.2.2. Influência da temperatura na atividade das lipases.....	48
5.3. Tratamento anaeróbio e enzimático do efluente.....	50
5.3.1. Hidrólise e biodigestão do lodo e do efluente bruto.....	51
5.3.2. Hidrólise e biodigestão do efluente tratado com a enzima LKM.....	51
5.3.3. Hidrólise e biodigestão do efluente tratado com a enzima LNU.....	54
5.3.4. Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade de efluente tratado com as enzimas LKM e LNU.....	59
5.3.5. Análises para avaliar o efeito do tratamento enzimático.....	62
5.3.5.1 pH.....	62
5.3.5.2 Ácidos graxos livres e glicerol.....	64
5.3.5.3 DQO.....	66
5.4 Considerações finais.....	66
6 Conclusão	68
7 Sugestões	70

8 Referências Bibliográficas	71
Apêndices	79
Apêndice A - Características físico-químicas do efluente da indústria Macedo Koerich S/A – SC.....	79
Apêndice B - Padrões de emissão de efluentes líquidos da Legislação Ambiental do Estado de Santa Catarina	80
Apêndice C - Ficha técnica da Lipase Pancreatica Kin Master	81
Apêndice D - Curvas Padrão para quantificação de compostos por espectrofotometria.....	84
D.1 - Curva padrão de DQO	84
D.2 - Curva padrão de Amônia	84
Apêndice E - Caracterização das propriedades catalíticas e físico-químicas das preparações enzimáticas.....	85
E.1 - Influência do pH na atividade das lipases.....	85
E.2 - Influência da temperatura na atividade das lipases	85
Apêndice F - Análises.....	86
F.1 - Ácidos graxos livres.....	86
F.2 - Glicerol	86
F.3 - DQO	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de dejetos e subprodutos produzidos nas diferentes etapas do processamento avícola.	6
Tabela 2. Razões da variação do pH em um digestor anaeróbio e sua possível correção.	9
Tabela 3. Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias.	12
Tabela 4. Composição de ácidos graxos em diferentes óleos e gorduras.	12
Tabela 5. Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes.	18
Tabela 6. Classificação das enzimas segundo IUBMB.	21
Tabela 7. Obtenção industrial de enzimas.	22
Tabela 8. Aplicação industrial das lipases no setor de óleos e gorduras.	29
Tabela 9. Caracterização do efluente.	46
Tabela 10. Caracterização das preparações de lipases LKM e LNU.	50
Tabela 11. Velocidades iniciais de produção de metano.	62
Tabela 12. Medidas de pH.	63
Tabela 13. Eficiência de remoção de DQO.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da degradação anaeróbia dos componentes orgânicos presentes nos efluentes e dos principais grupos de bactérias.	14
Figura 2. Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.	24
Figura 3. Etapas envolvidas na reação de hidrólise de óleos e gorduras.....	25
Figura 4. Gasômetro tipo frasco invertido 1 - Entrada de Biogás; 2 - Frasco de segurança; 3 - Frasco Duran; 4 - Coletor de NaOH.....	37
Figura 5. Fluxograma dos ensaios de Biodegradabilidade.	38
Figura 6. Aparato experimental utilizado nos ensaios de biodegradabilidade.	39
Figura 7. Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - azeite de oliva, 37°C, Agitação - 100 rpm).....	47
Figura 8. Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - efluente bruto, 37°C, Agitação - 100 rpm).....	48
Figura 9. Influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - azeite de oliva, 37°C, Agitação - 100 rpm).	49
Figura 10. Influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU. (Substrato - efluente bruto, 37°C, Agitação - 100 rpm).	49
Figura 11. Produção de metano do lodo (Volume de lodo - 50 mL, Agitação - 100 rpm, 35°C, 33 dias).	51
Figura 12. Produção de metano do efluente bruto (Volume de lodo - 50 mL, Volume de efluente bruto - 250 mL, Agitação - 100 rpm, 35°C, 33 dias).....	51
Figura 14. Produção de metano do efluente tratado com 0,10% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).	52
Figura 15. Produção de metano do efluente tratado com 0,15% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).	52
Figura 16. Produção de metano do efluente tratado com 0,20% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).	52
Figura 17. Produção de metano do efluente tratado com 0,25% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).	52
Figura 18. Produção de metano do efluente tratado com 0,30% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).	52

Figura 19. Produção de metano do efluente tratado com 0,35% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).....	52
Figura 20. Produção de metano do efluente tratado com 0,10% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).....	55
Figura 21. Produção de metano do efluente tratado com 0,15% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).....	55
Figura 22. Produção de metano do efluente tratado com 0,20% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).....	55
Figura 23. Produção de metano do efluente tratado com 0,25% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).....	55
Figura 24. Produção de metano do efluente tratado com 0,30% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).....	55
Figura 25. Produção de metano do efluente tratado com 0,35% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).....	55
Figura 26. Enzima LNU precipitada durante os ensaios de biodegradabilidade.....	56
Figura 27. Volume de metano produzido pelas enzimas (a) LKM e (b) LNU nos ensaios de biodegradabilidade.	57
Figura 28. Velocidade média de produção de metano (a) Lodo (b) Efluente bruto.	59
Figura 29. Representação do perfil cinético dos testes de biodegradabilidade utilizando a enzima LKM.	60
Figura 30. Representação do perfil cinético dos testes de biodegradabilidade utilizando a enzima LNU.	61
Figura 31. Concentração de ácidos graxos livres ao final dos ensaios de biodegradabilidade e velocidade final de geração de metano para as lipases LNU (a) e LKM (b).	64
Figura 32. Quantidade de glicerol antes do início e ao final dos ensaios de biodegradabilidade para as lipases LNU (a) e LKM (b).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.E.	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
A.T.	Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)
AG	Ácidos Graxos
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AOV	Ácidos Orgânicos Voláteis
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
C _i	Concentração do componente "i" (moles.L ⁻¹)
C _{DQO}	Concentração de DQO (mg de O ₂ .L ⁻¹)
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DG	Diacilglicerídeos
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDTA	Etileno Diamino Acetato Dissódico
ICEPA	Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
LKM	Lipase Kin Master
LNU	Lipase Nuclear
m _a	Massa da amostra (g)
MG	Monoacilglicerídeos
MM	Massa molar (g.mol ⁻¹)
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Solúveis Voláteis
t	Tempo de reação (min)
TG	Triacilglicerídeos
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
V	Volume (L)

RESUMO

O presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de tecnologia para redução da concentração de lipídeos contidos em águas residuárias da indústria avícola, importante setor industrial de Santa Catarina, por meio de ação de enzimas, particularmente lipases pancreáticas comerciais. Para tanto, foram caracterizadas as lipases comerciais empregadas, LKM e LNU, utilizando dois substratos (azeite de oliva e o efluente bruto), e a água residuária, proveniente da indústria Macedo Koerich S/A - SC. Os testes de biodegradabilidade, utilizando biomassa anaeróbia de uma estação de tratamento de esgotos domésticos, foram realizados simultaneamente com o tratamento enzimático, sendo que as concentrações de enzimas variaram de 0,10% a 0,35% p/v. O efluente foi biodegradado por aproximadamente trinta dias em um banho-maria a uma temperatura de 35°C com agitação de 100 rpm. A eficiência do tratamento foi verificada através da remoção de DQO e da formação de gás metano. A atividade enzimática foi influenciada pelo tipo de substrato uma vez que, quando se utilizou o azeite de oliva como substrato a atividade máxima ficou acima de 3000 U.mg⁻¹, enquanto que, utilizando o efluente bruto como substrato a atividade máxima das enzimas diminuiu para valores abaixo de 700 U.mg⁻¹. A temperatura que proporcionou atividade máxima foi de 37°C para as enzimas estudadas em ambos os substratos, com exceção da enzima LNU, cujo valor ótimo foi de 45°C quando o efluente bruto foi utilizado como substrato. Verificou-se que o pH ótimo para a atividade hidrolítica de ambas as enzimas, nos substratos avaliados, estava na faixa de 7.0 a 8.0. A realização dos ensaios de biodegradabilidade e hidrólise simultâneos foi possível, proporcionando volumes de produção de metano superiores aos encontrados na literatura, nos quais os testes foram realizados de forma seqüencial. Houve uma remoção de DQO de 2,3 a 2,86 vezes maiores do que a remoção obtida no efluente bruto sem o tratamento enzimático. A concentração de enzima, dentro da faixa estudada, não interferiu consideravelmente na velocidade de remoção da matéria orgânica.

ABSTRACT

The objective of the present work was to contribute to the development of technologies to reduce the lipids concentration in slaughterhouse wastewater, important industrial sector of Santa Catarina, by using enzymes, specifically commercial pancreatic lipases. Therefore, used the commercial lipases, LKM and LNU, were characterized by two different substrates (olive oil and brut effluent) and the wastewater was obtained from Macedo Koerich S/A - SC industry. The biodegradability tests, using anaerobic biomass from a domestic sewerage treatment station, were carried out simultaneously with the enzymatic treatment, with one enzyme concentration varying from 0,10% to 0,35% w/v. The effluent was biodegraded for approximately 30 days in a bath at 35°C and 100 rpm stirring rate. The efficiency of the treatment was verified by the CDO removal and the methane production. The enzyme was influenced by the substrate, since the maximum activity decreased significantly. Using the olive oil as substrate, the maximum activity was above 3000 U.mg⁻¹, whereas using the brut effluent the maximum activity was below 700 U.mg⁻¹. The temperature that resulted in maximum activity was 37°C, except for the enzyme LNU using brut effluent as substrate, which showed maximum activity at 45°C. The pH values that maximized the lipase activity were between 7.0 and 8.0. The biodegradability and hydrolysis experiments were made simultaneously, providing volumes of methane yield above those found in the literature, which were obtained from experiments carried out in sequence. The value CDO removal was 2,3 to 2,86 times higher than that obtained for the brut effluent without enzymatic treatment. The enzyme concentration in the studied range did not interfere significantly in the velocity of organic matter removal.

1 Introdução

A atividade avícola no Brasil tem se desenvolvido satisfatoriamente nos últimos anos e isso pode ser comprovado pelos números do setor. Em setembro de 2005, as exportações brasileiras de carne de frango *in natura* totalizaram 247,725 mil toneladas, volume que representou aumento de cerca de 18% sobre o mesmo mês de 2004. No mesmo período, a avicultura disponibilizou para o mercado interno 538,6 mil toneladas de carne de frango e a produção total foi de 786 mil toneladas. Estima-se que até o final de 2005 a produção total alcance 6,3 milhões de toneladas, 5,5% a mais que o produzido no ano de 2004 (AVISITE, 2005). O estado de Santa Catarina destaca-se no mercado de abate de aves no Brasil e até o mês de agosto de 2005 foram abatidos 454,10 milhões de cabeças de aves, segundo dados do ICEPA, 2005.

O processo de abate e industrialização de frangos gera subprodutos que, se mal destinados ou processados, se constituem em potenciais poluentes ambientais. O processamento e/ou tratamento dos resíduos e efluentes do abatedouro tem sido uma das grandes preocupações da indústria avícola, principalmente em decorrência das restrições que o mercado consumidor vem impondo as questões de meio ambiente e da sua reutilização (SROKA et al., 2004).

Estes resíduos líquidos são ricos especialmente em proteínas e lipídeos (AMANTE et al., 1999), os quais são os principais responsáveis pelas alterações dos parâmetros de controle ambiental como pH, sólidos totais, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), entre outros (PEREIRA, 2004). Os lipídeos contidos nesses efluentes, além de representarem uma perda industrial importante, interferem negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes.

Desta forma, processos alternativos têm sido utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos nesses efluentes, por meio de ação de enzimas, particularmente as lipases. Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor destes materiais.

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster - carboxílicas, presentes em acilgliceróis. A sua utilização reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e desobstrui filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos (MENDES et al., 2005). Além disso, a alta especificidade permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos; condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos. Estas são algumas vantagens que tornam este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental e econômico.

A utilização de enzimas no tratamento de efluentes com elevados teores de gordura tem sido estudada nos últimos anos por grupos de pesquisa brasileiros, entre os quais se destacam os trabalhos Pereira (2004) e Mendes (2004). Pereira (2004) utilizou lipases para avaliar a hidrólise e a biodigestão de resíduos gerados pela indústria de produtos avícolas, enquanto Mendes (2004) tratou efluentes da indústria de produtos lácteos. Uma característica comum entre os trabalhos é que as etapas de tratamento enzimático e ensaios de biodegradabilidade foram estudados separadamente, de maneira seqüencial.

Este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de tecnologia de tratamento de águas residuárias da indústria de abate de frangos, setor importante para o Estado de Santa Catarina, contribuindo com a literatura existente através da análise dos efeitos causados pela realização das etapas de hidrólise e biodigestão simultâneas no tratamento desses resíduos, e analisando os efeitos do efluente na alteração da atividade da enzima em relação à sua atividade quando utilizado azeite de oliva.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias avícolas utilizando lipases pancreáticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do efluente gerado em indústrias avícolas;
- Caracterização das propriedades catalíticas das lipases pancreáticas LKM e LNU, utilizando como substratos azeite de oliva e o efluente bruto da indústria avícola;
- Avaliação da influência da concentração das lipases pancreáticas na remoção da matéria orgânica;
- Avaliação da influência da realização simultânea das etapas de hidrólise e biodigestão na degradação da matéria orgânica, expressa pela formação de metano e redução da DQO.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo tem como objetivo fundamentar conceitos teóricos utilizados neste trabalho. Nesta revisão bibliográfica são citados vários trabalhos desenvolvidos na caracterização e aplicação de enzimas no tratamento de águas residuárias, em especial as lipases.

3.2 EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS AVÍCOLAS

A indústria de abate de animais se destaca na região sul do Brasil, onde os locais de abate variam de simples pranchas de abate até matadouros muito modernos. O processo de abate inicia com a morte do animal, em seguida, o sangue, o couro ou pele, intestinos e órgãos internos são retirados. A carcaça é transformada em diferentes produtos cárneos através de: corte, migagem, cura ou enlatamento (CETESB, 2003).

São produzidas grandes quantidades de despojos comestíveis e não comestíveis. A maior parte destes produtos poderia sofrer processamento e ser utilizada, mas isto nem sempre acontece. Os subprodutos são freqüentemente desperdiçados e atirados ou descarregados nas águas de superfície (CETESB, 2003).

No processo de abate os seguintes subprodutos e resíduos ficam disponíveis: I) estrume, conteúdos do rúmen e intestinos; II) produtos comestíveis como o sangue e fígado; III) produtos não comestíveis como pêlo, ossos e penas; IV) gordura retirada das águas residuais; e V) águas residuais. Do ponto de vista econômico e ambiental muito destes produtos residuais poderiam ser transformados em subprodutos úteis (para consumo humano, comida para animais, indústria de rações ou fertilizantes) (CETESB, 2003).

Abate feito em más condições, falta de equipamento para processamento dos subprodutos e baixo valor final destes, contribui para a produção de resíduos dos matadouros. O uso liberal da água leva a grande quantidade de águas residuais. A descarga direta de águas residuais não tratadas nas águas superficiais ou no sistema público de esgotos causa mau cheiro, água pobre em oxigênio, problemas sanitários e ambientais (CETESB, 2003).

Os efluentes deste tipo de indústria contêm uma DBO elevada (variando de 800 a 32.000 mg.L⁻¹), grande presença de óleos e graxas, material flotável (gordura), alta concentração de sólidos sedimentáveis (podem chegar até 15g.L⁻¹) e sólidos suspensos, alta concentração de nitrogênio orgânico, presença de sólidos grosseiros e microrganismos patogênicos (SCARASSATI et al., 2003).

Esses despejos são altamente putrescíveis, entrando em decomposição poucas horas depois de seu aparecimento, liberando odor característico. O aspecto do despejo possui cor avermelhada, pelancas, pedaços de gordura em suspensão; são praticamente opacas e em sua parte coloidal apresentam microrganismos patogênicos. Isso ocorre sempre que os animais abatidos não estiverem em perfeito estado de saúde (CETESB, 2003).

O elevado teor de lipídeos presente nesses efluentes, além de representar uma perda industrial importante, interfere negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes. Quando biológicos, dificultam a sedimentação do lodo, demandam maior tempo de retenção e aeração, a operação do reator de digestão anaeróbia (UASB) apresenta diversos problemas operacionais devido à formação de espuma, colmatação de camadas de lipídeos, formação de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, levando à perda da eficiência e até mesmo ao colapso do reator (LEAL, 2000; HU et al., 2002); e quando físico-químicos, demanda maior quantidade de produtos flocculantes com significativo aumento na geração do lodo (LIE & MOLIN, 1991).

Neste contexto, processos alternativos que têm por objetivo a recuperação ou diminuição da carga orgânica de efluentes são de extremo interesse para a indústria. A aplicação de um pré-tratamento visando à hidrólise dos sólidos solúveis, especialmente gorduras, pode melhorar a digestão anaeróbia de efluentes gerados em indústrias de processamento de aves e animais.

O processo alternativo de redução da carga de matéria orgânica e aceleração da biodegradação de óleos e gorduras em compostos mais simples

consiste em utilizar lipases para promover a reação de hidrólise por via seqüencial dos grupos acila no glicerídeo (HARALDSSON, 1991 apud PEREIRA, 2004). A aplicação desta técnica permite a redução do tempo de residência hidráulico e conseqüentemente do volume do reator, pois acelera a velocidade de hidrólise de gorduras, além de evitar problema de colmatação e entupimento do leito de lodo em reatores anaeróbios do tipo de fluxo ascendente.

3.2.1 Água no abatedouro: procedência e tratamento

O consumo de água varia muito dentro de um matadouro, segundo dados obtidos com fabricantes e técnicos do setor de equipamentos para matadouros e frigoríficos. Porém utiliza-se como base de cálculo de 25 a 50 litros de água por cabeça de ave abatida (CETESB, 2003).

Esses resíduos líquidos são ricos especialmente em proteínas e lipídeos, os quais são os principais responsáveis pelas alterações dos parâmetros de controle ambientais como o pH, sólidos totais, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), entre outros (AMANTE et al., 1999). Os tipos de dejetos e subprodutos produzidos nos diferentes estágios do processamento são mostrados na Tabela 1, e incluem a manutenção das aves desde o momento em que elas chegam à plataforma de recepção até a obtenção do produto final.

Tabela 1. Tipos de dejetos e subprodutos produzidos nas diferentes etapas do processamento avícola.

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

Fonte: RIBEIRO, 1995 apud PEREIRA, 2004.

O tratamento da água utilizada na planta tem o objetivo de possibilitar a introdução dos efluentes tratados no ambiente sem levar à poluição do mesmo. Considerando que este processo deve ser realizado a um custo que seja

compatível e não inviabilize a operação lucrativa da planta de processamento.

Os efluentes são, normalmente, peneirados para remoção de pedaços de carne, penas e vísceras que foram lavados no processo. Posteriormente, usam-se retentores de gordura em tanques. Lagoas ou tanques de sedimentação auxiliam na remoção de sólidos, os quais ficam no fundo e devem ser removidos periodicamente. Uma filtração final para retirar partículas finas em suspensão e um tratamento químico e/ou biológico posterior visa reduzir a quantidade de elementos indesejáveis, os níveis de DBO da água e a presença de microrganismos para dentro de limites aceitáveis para a descarga no sistema de tratamento público, ou mesmo para possibilitar o reaproveitamento da água pela própria planta. Possíveis tratamentos químicos incluem a adição de cal, formalina, persulfato de amônia ou ácido fórmico, entre outros. Ao final, uma cloração desta água pode ser realizada para eliminar os microrganismos patogênicos (NASCIMENTO et al., 2000).

3.2.2 Características do efluente do abatedouro

A quantidade e concentração dos despejos de uma determinada indústria variam dentro de amplos limites, dependendo dos processos de fabricação empregados e dos métodos de controle dos despejos. Com isto, a caracterização de efluentes é uma tarefa básica para o equacionamento adequado do problema de tratamento dos mesmos. É a etapa de trabalho que gera informações quanto à composição e vazão da água residual, levando em conta as suas variações ao longo do tempo, em função das atividades responsáveis por sua geração. Com base nessas informações, podem ser adotados métodos físicos, químicos ou biológicos de tratamento (GLAZER & NIKAIDO, 1995 apud PEREIRA, 2004).

O Apêndice A apresenta uma composição típica de águas residuárias proveniente do processo industrial de escaldagem e depenagem, da lavagem do frango, das vísceras, dos equipamentos, dos pisos e outros, da Indústria Macedo Koerich S/A – SC. No Apêndice B encontram-se os padrões de emissão de efluentes líquidos previstos pela Legislação Ambiental do Estado de Santa Catarina.

3.3 BIODEGRADABILIDADE

O objetivo principal da biodegradabilidade é avaliar o potencial de

biodegradação de um resíduo ou substância química em condições anaeróbias.

A caracterização dos efluentes, por meio de testes de biodegradabilidade, é de fundamental importância, uma vez que os efluentes apresentam grande variabilidade quanto à qualidade, quantidade, demanda química de oxigênio (DQO) e presença de compostos orgânicos refratários. Adiciona-se a isso, outras características importantes ao tratamento anaeróbio: pH, alcalinidade, nutrientes inorgânicos, temperatura e a eventual presença de compostos potencialmente tóxicos (SOARES & HIRATA, 1999).

Os testes de biodegradabilidade consistem em colocar uma quantidade adequada de lodo anaeróbio previamente estabilizado em um reator, alimentando-o com o resíduo ou substância que se quer testar. O processo é acompanhado por medidas periódicas de metano produzido, de AOV e de DQO solúvel no meio (SOARES & HIRATA, 1999).

Algumas recomendações importantes devem ser consideradas: a concentração do lodo normalmente adequada é de 5 g.L^{-1} . Caso o lodo tenha uma atividade metanogênica maior que $0,2 \text{ gDQO-CH}_4 \cdot (\text{gSSV} \cdot \text{dia})^{-1}$, pode-se usar uma concentração menor, porém no mínimo $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. Outro fator a ser avaliado é a concentração de substrato (DQO) que deve ser alta o suficiente para que as medidas de metano e AOV possam ser feitas com precisão, porém não alta demais que possa causar inibição. Geralmente 5 gDQO.L^{-1} é uma concentração adequada. Se o resíduo tiver algum inibidor da metanogênese, a concentração deve ser abaixada (2 g.L^{-1}) e deve-se utilizar um reator maior que dois litros (SOARES & HIRATA, 1999).

Entre os parâmetros importantes da digestão anaeróbia podemos citar:

- *Temperatura:* as bactérias metanogênicas são bastante sensíveis a variações, especialmente a elevações de temperatura, as quais devem, portanto, sempre ser evitadas. O processo pode ocorrer nas faixas mesofílica (15°C a 45°C) ou termofílica (50°C a 65°C) de temperatura. Na faixa mesofílica a digestão anaeróbia se desenvolve bem em temperaturas desde 30°C até 40°C (temperatura ótima entre 35°C e 37°C). Muito mais importante, porém, do que operar na temperatura ótima é operar sem variações significativas na temperatura. Na faixa termofílica, a temperatura ótima está entre 57°C e 62°C . A velocidade de digestão é maior a temperaturas termofílicas em relação as mesofílicas. A operação na faixa termofílica resulta em lodos mais facilmente desidratáveis e em maior remoção de

patogênicos. Os custos relativos ao aquecimento, em geral não compensam a utilização de temperaturas termofílicas. As temperaturas mais distantes da ambiente provocam variações muito grandes e afetam o processo. Para resíduos que já são gerados a temperaturas relativamente elevadas, pode ser bastante interessante à utilização do processo termofílico de digestão anaeróbia (CETESB, 2003).

- *pH*: de acordo com Viera e Souza (1981 apud CETESB, 2003), o pH é um dos fatores mais importantes a ser mantido para se obter uma boa eficiência do processo. Na digestão anaeróbia, a faixa de pH ótimo é o resultado das diversas reações que ocorrem no processo. O pH no digestor é função do conteúdo de CO₂ no gás, da concentração de ácidos voláteis, além da própria alcalinidade da matéria prima. As bactérias envolvidas no processo de fermentação são altamente sensíveis às mudanças no pH do meio (pH na solução do digestor). Sua queda revela um acúmulo de intermediários ácidos num nível superior ao tolerado pela capacidade tampão do meio, o que pode ser resultado de um desequilíbrio entre a produção e o consumo dessas substâncias, decorrente da falta de equilíbrio entre as populações. Segundo Batista (1981 apud CETESB, 2003) a faixa de operação dos digestores é em pH entre 6.0 e 8.0, tendo como ponto ótimo pH 7.0 – 7.2. Fora destes limites, a digestão pode realizar-se, mas com menor eficiência. As possíveis causas de variação do pH em um digestor e suas possíveis correções se resumem na Tabela 2.

Tabela 2. Razões da variação do pH em um digestor anaeróbio e sua possível correção.

Condição	Possíveis razões	Correções
Demasiado ácido (pH: 6.0 ou menor).	Velocidade de alimentação demasiadamente rápida.	Reduzir a velocidade de alimentação. Adicionar amoníaco.
	Flutuação ampla da temperatura.	Estabilizar a temperatura.
	Formação de espuma.	Eliminar espuma.
	Presença de substâncias tóxicas.	Eliminar espuma.
Demasiado básico	Material demasiadamente alcalino.	Esperar (não acidificar o digestor).

Fonte: CETESB, 2003.

- *Agitação*: permite melhorar a produtividade assegurando boa homogeneidade do conteúdo do digestor e facilitando as trocas térmicas. Além disso, ela permite assegurar, em parte, a degaseificação dos resíduos. Essa

agitação pode ser feita mecanicamente ou por simples recirculação do gás ou do efluente (SCRIBAN, 1985).

Dentre os principais parâmetros de controle do processo de biodigestão estão:

- *Ácidos orgânicos voláteis (AOV)*: é um dos parâmetros mais importantes para o acompanhamento e controle da digestão anaeróbia, pois este mede o equilíbrio entre as populações de microrganismos acidogênicos e metanogênicos. O acúmulo dos mesmos indica desequilíbrio do processo e conseqüentemente a falha. Vários métodos estão disponíveis para sua medida, das quais podemos destacar a cromatografia em fase gasosa ou em fase líquida, por fornecer informações mais detalhadas, rapidez no resultado podendo ser aplicada “em linha” e de grande precisão analítica (HIRATA, 1999 apud SOARES & ZAIAT, 2005).

- *Alcalinidade*: a medida da alcalinidade mostra o nível da capacidade tampão, sendo por isso importante para a prevenção de quedas de pH. Existem diversas espécies químicas que conferem alcalinidade ao meio: bicarbonato, sais de ácidos voláteis e outros (SOARES & ZAIAT, 2005).

- *Relação AOV/Alcalinidade*: é o parâmetro mais adequado para o monitoramento do processo, pois permite prever e evitar a queda do pH, que poderia provocar uma falha do sistema. Os valores recomendados ficam entre 0,1 e 0,35 M/M, que correspondem a 0,06 e 0,2 quando ambos os parâmetros estão expressos em mg.L⁻¹. Com estes valores pode-se estimar a quantidade de bicarbonato necessária para neutralizar os possíveis ácidos formados a partir de determinada concentração de matéria orgânica da água residuária. (HIRATA, 1999 apud SOARES & ZAIAT, 2005).

- *Volume total de gás e porcentagem de metano no biogás*: os principais produtos finais do processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica são o metano e o dióxido de carbono. Ambos são compostos que, nas condições ambientais do processo, são produtos gasosos que podem ser separados e quantificados facilmente. A medida do volume total de gás produzido e sua composição refletem a condição do processo, ambos indicando o equilíbrio entre as várias populações de microrganismos. Esta medida é rápida, simples e eficaz para indicar a falha de um processo anaeróbio. A quantidade de biogás e o seu percentual de metano, relativamente ao de dióxido de carbono, é dependente da composição da matéria orgânica alimentada no sistema. Além da diferente

estequiometria de degradação dos compostos orgânicos, a dissolução dos gases no meio líquido é diferenciada e varia conforme a composição do meio. O metano é um gás muito pouco solúvel em água nas condições ambientais ($2,86 \text{ mL.L}^{-1}$ a 20°C) enquanto que o dióxido de carbono é muito mais solúvel (1770 mL.L^{-1} a 20°C). Além da maior solubilidade comparada ao metano, a solubilidade do CO_2 varia com a alcalinidade e o pH do meio, tornando-se ainda mais solúvel. Portanto, a medida da quantidade de metano produzido é mais consistente para ser utilizada como parâmetro de controle do processo. (SOARES & ZAIAT, 2005).

- *Outros gases de interesse:* além do metano e do dióxido de carbono, outros gases são gerados na degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios, como o hidrogênio e o monóxido de carbono. No entanto, estes gases em condições de equilíbrio do sistema, se apresentam em concentrações muito baixas, pois são compostos intermediários em toda cadeia metabólica da biodigestão. (SOARES & ZAIAT, 2005).

- *Atividade metanogênica específica:* mede a relação entre a quantidade de substrato consumido e a quantidade de biomassa, por unidade de tempo. Ela mede exatamente a capacidade máxima do consórcio de microrganismos existente em um biodigestor em degradar um substrato específico, levando-o até metano e dióxido de carbono. (SOARES & ZAIAT, 2005).

Há uma série de outros parâmetros de controle de processo baseados na resposta do sistema que estão reportados na literatura, porém mostram-se pouco eficazes ou difíceis de serem usados, ou ainda estão em fase de desenvolvimento (SWITZENBAUM et al., 1991; SPEECE, 1996 apud SOARES e ZAIAT, 2005).

3.4 LIPÍDEOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

A fração de lipídeos é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres e que, juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias de diversas indústrias de alimentos (MENDES et al., 2005).

Lipídeos são compostos que causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para esse meio e o mais importante, promovem a mortandade da vida aquática (MONGKOLTHANARUK & DHARMISTHITI, 2002). Os lipídeos encontram-se, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis e uma pequena parte

como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL).

As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros, os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de “fast food” (MENDES et al., 2005). Os valores de concentração de lipídeos, nesses efluentes, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias.

Tipos de efluentes	Concentração de lipídeos (mg.L ⁻¹)
Doméstico	40 - 100
Matadouros e avícolas	Acima de 500
Laticínios	4.680
Restaurantes	98
Azeite de oliva	16.000
Sorvetes	845

Fonte: MENDES et al., 2005.

Na Tabela 4 é apresentada a composição em ácidos graxos de diferentes óleos e gorduras. Observa-se que a gordura de frango possui uma composição em ácidos graxos similar à encontrada no azeite de oliva, possibilitando a utilização desse material como substrato referencial nas hidrólises de lipídeos presentes no efluente proveniente de indústria avícola (PEREIRA, 2004).

Tabela 4. Composição de ácidos graxos em diferentes óleos e gorduras.

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

Fonte: LEE & FOGLIA, 2000 apud PEREIRA, 2004.

Nas estações de tratamento desses efluentes, a elevada concentração de triacilgliceróis necessita inicialmente ser hidrolisada para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para as bactérias e, posteriormente, ser convertido em biomassa (lodo ativado) (DUEHOLM, 2001).

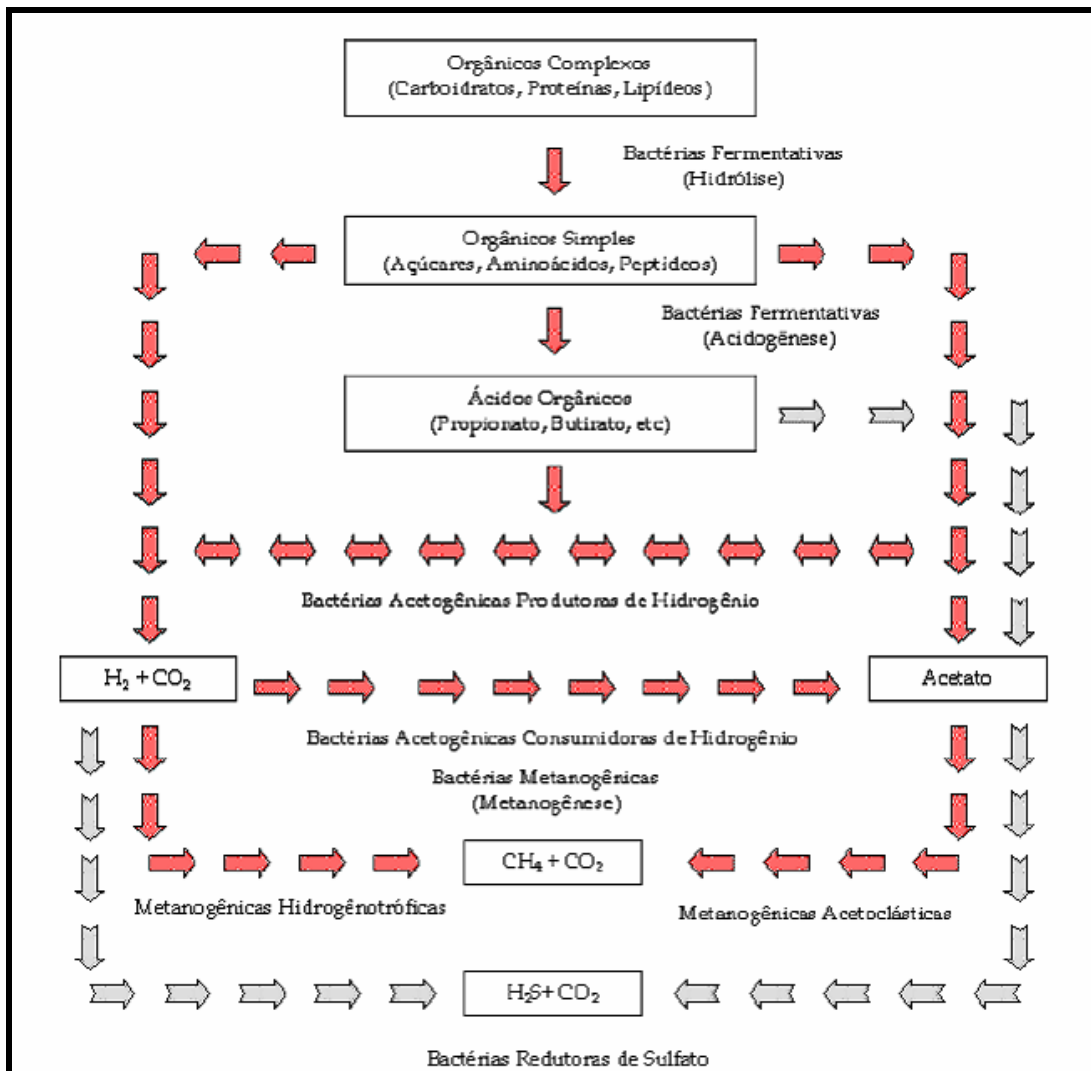
A transformação de lipídeos em lodo ativado é necessária por duas razões: os lipídeos contribuem com 30 - 40% da matéria orgânica presente nos efluentes e esses compostos estimulam o crescimento de microrganismos filamentosos, importantes na remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio, promovendo a sustentação do lodo formado. Com baixa concentração desses microrganismos, a probabilidade de formação de grânulos maiores de lodo é reduzida, acarretando sua flotação (MENDES et al., 2005).

3.5 PROBLEMAS RELACIONADOS AOS ELEVADOS TEORES DE LIPÍDEOS NO TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Os efluentes gerados pela indústria de processamento de alimentos contêm freqüentemente gorduras e proteínas em quantidades significativas. Parte da carga orgânica pode ser removida pelo tratamento físico-químico, entretanto, o custo destes reagentes é elevado e a eficiência da remoção de DQO é baixa. As gorduras e as proteínas presentes nestes efluentes têm um baixo coeficiente de biodegradabilidade. Além disso, as gorduras podem solidificar em temperaturas mais baixas e causar danos operacionais como obstruir e desenvolver odores desagradáveis, representando um problema sério para os processos biológicos anaeróbios. Flotação e o desenvolvimento de lodos com características físicas diferentes causam perda de atividade da biomassa, diminuindo sua quantidade dentro do reator, interferindo na eficiência do tratamento. Além disso, o óleo e a graxa adsorvida na superfície do lodo anaeróbico podem limitar o transporte de substrato solúvel para a biomassa e conseqüentemente reduzir a taxa da conversão do substrato (CAMAROTA et al., 2001).

Segundo Chernicharo (1997 apud MORAES, 2000), as etapas da biodegradação de lipídeos e de outros compostos encontrados em efluentes, como proteínas e carboidratos, são descritas e apresentadas na Figura 1. O esquema ilustrativo (Figura 1) permite visualizar os diferentes estágios de interação entre os substratos e os grupos de bactérias, desde a sua entrada, como matéria orgânica composta, até sua decomposição em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico,

e amônia, além de novas células bacterianas.



Fonte: CHERNICHARO, 1997 apud MORAES, 2000.

Figura 1. Etapas da degradação anaeróbica dos componentes orgânicos presentes nos efluentes e dos principais grupos de bactérias.

De acordo com Chernicharo (1997 apud MORAES, 2000) na hidrólise, a matéria orgânica complexa afluente é convertida em materiais mais simples, dissolvidos através da ação de exoenzimas produzidas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas. Na acidogênese, os produtos solúveis oriundos da fase anterior são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em diversos compostos mais simples, que são excretados. Como os ácidos graxos voláteis são os principais produtos das bactérias fermentativas, estas são designadas bactérias fermentativas acidogênicas. Na acetogênese, bactérias acetogênicas oxidam os produtos gerados na fase

acidogênica em substratos apropriados (ácido acético) para as bactérias metanogênicas, fazendo parte, assim, de um grupo metabólico intermediário. A etapa final do processo é efetuada pelas bactérias metanogênicas que são divididas em dois grupos principais, em função de sua afinidade por diferentes substratos: as acetoclásticas, que utilizam ácido acético ou metanol na produção de metano e as hidrogenotróficas que utilizam hidrogênio e dióxido de carbono na formação de metano. Quando há presença de sulfato no afluente, muitos dos compostos intermediários passam a ser utilizados pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), provocando uma alteração das rotas metabólicas no reator anaeróbio. Dessa forma, as BRS passam a competir com as bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas pelos substratos disponíveis.

Nos processos anaeróbios ou, nos sistemas de biodigestão anaeróbia, a degradação da matéria orgânica envolve a atuação de microrganismos procarióticos anaeróbios facultativos e obrigatórios, cujas espécies pertencem ao grupo de bactérias hidrolíticas-fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio e metanogênicas. A bioconversão da matéria orgânica poluente com produção de metano requer a cooperação entre culturas bacterianas. Na atividade microbiana anaeróbia em biodigestores, o que se observa é a ocorrência da oxidação de compostos complexos, resultando nos precursores do metano, acetato e hidrogênio (VAZOLLER, 1996).

A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor um determinado substrato é específica, dependendo principalmente das enzimas que possui. As enzimas, responsáveis pelas reações do processo de decomposição, apresentam alto grau de especificidade. A eficiência global de conversão da matéria orgânica em produtos estabilizados depende da eficiência de cada reação e do equilíbrio entre as diversas espécies e entre os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (LEMA et al., 1991 apud PEREIRA, 2004).

A hidrólise de lipídeos é a etapa limitante na digestão anaeróbia de sólidos presentes em diversos tipos de efluentes, devido ao baixo consumo de ácidos graxos de cadeia longa pelas bactérias (KOMATSU et al., 1991; QUÉMÉNUER & MARTY, 1994 apud MENDES et al., 2005) e à necessidade de uma pequena concentração de hidrogênio, formado nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL. O acúmulo deste gás pode afetar o equilíbrio das reações de decomposição dos AGCL que são termodinamicamente desfavoráveis. Desta

forma, a acumulação de AGCL pode causar problemas na digestão anaeróbia de efluentes, como toxicidade a microrganismos acetogênicos e metanogênicos e a formação de espumas, devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (SALMINEN & RINTALA, 2002; HANAOKI et al., 1981 apud MENDES, 2005).

Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) dentro das células microbianas são incorporados a complexos lipídicos, como a membrana plasmática ou catabolizados para a formação de compostos de baixa massa molar (CO_2 , CH_4 e H_2O) (WENG e JERIS, 1976 apud MENDES, 2005).

Os AGCL, em concentrações milimolares, podem se tornar inibidores dos microrganismos anaeróbios, pois impedem a adsorção de microrganismos causando flotação da biomassa e impedindo a formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios de fluxo ascendente. A flotação do lodo é decorrente da dificuldade de liberação de gases produzidos na digestão anaeróbia (HWU et al.; 1998, PETRUY & LETTINGA, 1997).

3.6 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO ENZIMAS

O uso de enzimas no tratamento de despejos industriais foi proposto em 1930. Entretanto, só recentemente seu desenvolvimento como alternativa ao tratamento convencional de efluentes tem despertado grande interesse de pesquisa, em função das vantagens apresentadas, entre as quais podem ser citadas (MENDES et al., 2005):

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

Enzimas são catalisadores biológicos e seu uso no tratamento de efluentes apresenta várias vantagens potenciais, tais como:

- Simplicidade e facilidade no controle do processo;
- Não há necessidade de aclimatação de biomassa;

- Não há efeitos de choque por carga de poluentes;
- Podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes;
- Operam em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade.

Entretanto, o uso de enzimas apresenta alguns problemas que muitas vezes limitam a sua utilização no tratamento de efluentes: instabilidade térmica, suscetibilidade ao ataque por proteases, inibição da atividade, além do elevado custo desses biocatalisadores (LEAL, 2000).

Em contraste com os catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque quantidades mínimas de produtos secundários são produzidas, o que representa benefícios econômicos e ambientais com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos e com redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais (AITKEN, 1993 apud PEREIRA, 2004).

Entre várias possibilidades, os biocatalisadores podem ser usados no tratamento de efluentes gerados nas indústrias petrolífera, têxtil, papel, derivados de celulose e alimentícias em geral, como mostra a Tabela 5.

Na indústria de abate de frango, um dos principais problemas é a degradação das penas de aves, subproduto do abate de frangos e de difícil biodegradação anaeróbia. As penas são constituídas de queratina, proteína com alto grau de ligações cruzadas entre grupamentos dissulfeto, presentes na cisteína (aminoácido) que confere rigidez à cadeia polipeptídica. Estudos têm sido realizados para a obtenção de linhagens capazes de biodegradar essa macromolécula por meio de enzimas proteolíticas, como endopeptidases, obtidas, principalmente, das espécies bacterianas *Fervidobacterium pennavorans* e *Bacillus licheniformis* (SALMINEN & RINTALA, 2002). Uma outra aplicação promissora de enzimas proteolíticas é a hidrólise de proteínas contidas em águas residuárias provenientes, principalmente, das indústrias de laticínios (JUNG et al., 2002).

Tabela 5. Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes.

Enzimas e Fontes	Poluentes e efluentes
Azorredutase (<i>Pseudomonas luteola</i>)	Indústrias de tintas.
Celulase - (<i>Trichoderma harzianum</i>) (<i>Trichoderma viride</i>)	Polpa de açúcar de beterraba. Pré-tratamento termoquímico de celulignina.
Cianidase (<i>Fusarium solani</i>)	Cianídeo.
Cianidase hidratase (<i>Trichoderma</i> sp.)	Cianídeo.
Monooxigenase e Iminodiacetato deidrogenase (gêneros <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxílicos, por ex. EDTA, em efluentes municipais.
Oxirredutases e NTA Deidrogenase (gêneros <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxílicos, por ex. EDTA, em efluentes municipais.
Polifosfatase e Fosfotransferase	Remoção de fosfato biológico de efluentes.
Nitrogenase (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	Remoção de excesso de lodo e proteínas em estações de tratamento de efluentes.
Protease Protease pronase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Cianídeo. Inativação de vírus bacteriófago Cox A9 de efluentes, para reutilização da água.
Enzimas Oxirredutases (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Remoção de compostos fenólicos e catecol.
Acetilcolinesterase e enzimas antioxidantes	Degradação de pesticidas de ambientes marinhos.
Carbaril Hidrolase (<i>Arthrobacter</i> sp. RC100)	Degradação de inseticidas à base de N-metilcarbamato.
Naftaleno-dioxigenase	Remoção de naftaleno.
Catalase (<i>Bacillus</i> sp.)	Remoção de H ₂ O ₂ presente em efluentes de branqueamento de tecidos.
β-Glicosidase e Manganês peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Pleurotus sajorcaju</i>)	Remoção de corantes azo da indústria de alimentos e da indústria têxtil.
Lipase - (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Redução do teor de lipídeos em efluentes de restaurantes.

(Pancreática - PL250)	Redução do tamanho das partículas de lipídeos, de efluente de matadouros, em até 60%.
(<i>Penicillium P4</i>)	Redução do teor de DQO de efluente da indústria de óleo de oliva, em 60%.
(<i>Penicillium restrictum</i>)	Remoção de DQO, em termos de lipídeos, de efluente da indústria de derivados lácteos.
(<i>Yarrowia lipolytica</i>)	Redução de DQO, em até 80%, de efluente da indústria de extração de óleo de oliva.
(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP602 e <i>Anicetobacter calcoaceticus</i> LP609)	Redução do teor de lipídeos e DBO de efluente.
(<i>Anicetobacter</i> sp.)	Redução do teor de lipídeos de efluentes de restaurantes.
(<i>Candida rugosa</i>)	Redução do teor de lipídeos e DQO de efluentes de abatedouros de frango.
(pâncreas de porco)	Redução do teor de lipídeos e de sólidos suspensos de efluentes da indústria de derivados lácteos.
Lacase - (<i>Coriolus versicolor</i> e <i>Funalia trogii</i>)	Tratamento de efluentes da indústria têxtil.
(<i>Chalara</i> (syn. <i>Thielaviopsis</i>) <i>paradoxa</i>)	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de oliva.
(<i>Trametes versicolor</i>)	Remoção de pesticidas à base de uréia, N', N'-(dimetil)-N-(2-hidroxifenil) uréia (2-HF).
Lacase e Manganês peroxidase (<i>Trametes versicolor</i>)	Remoção de hidrocarbonetos aromáticos.
(<i>Panus triginus</i>)	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de oliva.
(<i>Geotrichum</i> sp. CCM1 1019)	Remoção de compostos azo, tintas, presentes em efluentes da indústria têxtil.
(<i>Phanerochaete flavido-alba</i>)	Remoção de compostos fenólicos e cor.
Peroxidase - Lignina peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	Tintas, clorofenóis, dibenzo[p]dioxinas, metoxifenóis, metilfenóis, 2-nitrofenol, fenol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e licor de madeira pinus obtido por explosão à vapor.
Manganês peroxidase (<i>Phanerochaete flavido-alba</i>)	Efluentes de indústrias de extração de óleo de oliva, ricos em compostos fenólicos.
Peroxidase de soja	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de soja.
Tirosinase (<i>Agaricus bisporus</i>)	Degradação de compostos fenólicos.

Fonte: MENDES et al., 2005.

A utilização de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante por sermos responsáveis pela preservação dos nossos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constitui em ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade brasileira no cenário mundial (BON e PEREIRA, 1999 apud MENDES et al., 2005).

3.7 ENZIMAS

As enzimas, conhecidas industrialmente como biocatalisadores, são em sua maioria proteínas, formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas. A maioria das enzimas sintetizadas por células são retidas para funções intracelulares. As enzimas extracelulares são subseqüentemente secretadas para fora dos limites da membrana celular. Enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Além disto, participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples. (ZANOTTO, 2003).

De acordo com Sharma et al. (2001) quase 4000 enzimas são conhecidas, e destas, aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo que a maioria é de origem microbiana. A demanda mundial de enzimas é satisfeita por 12 produtores principais e por 400 fornecedores menores. Ao redor de 60% da fonte total de enzimas industriais são produzidas na Europa. Em torno de 75% de todas as enzimas industriais (incluindo as lipases) são de ação hidrolítica. Segundo a Novozymes (2005) o mercado mundial de enzimas gira em torno de US\$ 2,4 bilhões, com um crescimento médio anual entre 4 e 5%.

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. A Tabela 6 apresenta esta classificação.

Tabela 6. Classificação das enzimas segundo IUBMB.

Classes	Função catalítica	Subclasses
1 - Oxidorredutases	Catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenações e remoção ou adição de átomos de hidrogênio.	Desidrogenases Oxidases Hidrogenases Peroxidases
2 - Transferases	Enzimas que mediam a transferência de grupos tais como aldeídos, cetonas, etc.	Metiltransferases Transaminases Carboidrases
3 - Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.	Esterases Lipases Fosfatases Proteases
4 - Liases	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como: C=C, C=N e C=O, e também os processos reversos.	Descarboxilases Cetoacidolises Hidratases
5 - Isomerases	Catalisam processos de isomerização, tais como racemização.	Racemases Isomerases Mutases
6 - Ligases	Mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.	Sintetases

Fonte: FABER, 2000 apud SANTOS, 2003.

Na classe das Hidrolases destacam-se as Lipases, que são glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. Elas têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, e podem ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microrganismos (fungos e bactérias) (SANTOS, 2003).

3.8 LIPASES

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster - carboxílicas presentes em acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol (JAEGER et al., 1994 apud LEAL, 2000). Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesteroesterase,

tioesterases e outras) (CARVALHO et al., 2003).

As lipases catalisam a reação de hidrólise de triacilglicerídeos (TG) resultando na formação de diacilglicerídeos (DG), monoacilglicerídeos (MG), ácidos graxos (AG) e glicerol. Entretanto, dependendo das condições reacionais, as lipases podem também catalisar a síntese reversa, ou seja, pode ocorrer a síntese do MG, DG ou TG a partir de ácidos graxos e glicerol (SAXENA et al., 1999).

A maioria das pesquisas sobre lipases está focalizada na caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, cinética, sequenciamento e clone de genes das lipases e características gerais do seu desempenho (SHARMA et al., 2001).

As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: I) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; II) não requerem a presença de co-fatores; III) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, IV) exibem uma alta enantiosseletividade (CASTRO et al., 2004).

3.8.1 Fontes

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Suas características diferem em função de sua origem e das formas empregadas para a sua obtenção (LEAL, 2000). Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis a as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento (NASCIMENTO et al., 2004).

Na Tabela 7 apresenta as fontes, principais origens e métodos de obtenção de enzimas.

Tabela 7. Obtenção industrial de enzimas.

Fonte	Origens	Método de obtenção
Vegetais	Sementes, Sucos, Polpas, Raízes.	Trituração de tecidos
Animais	Mucosas, Pâncreas, Fígado, Sangue.	Trituração de tecidos
Microrganismos	Bactérias, Fungos, Leveduras.	Cultura submersa ou semi - sólida.

Fonte: VICENZI, 2004.

3.8.2 Características e propriedades

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4.0 a 9.0 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São enzimas usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C (VULFSON, 1994 apud MENDES, 2004). Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE & HAMMOND, 1985 apud PEREIRA, 2004).

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990. Desde então, mais de onze estruturas de lipases já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana. Estas enzimas mostram uma característica padrão conhecida como o entrelaçado de α/β hidrolase (CASTRO et al., 2004).

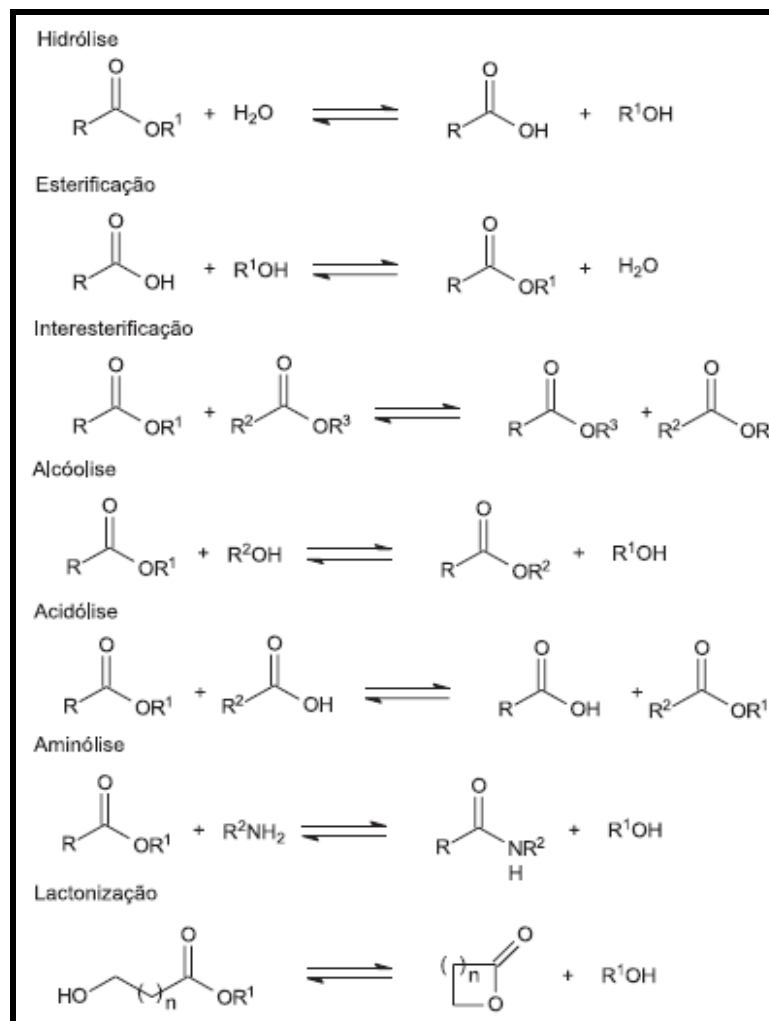
Segundo Faber (2000 apud PAQUES & MACEDO, 2006) as lipases são divididas da seguinte forma:

- Regiosseletivas - subdivididas em:
 - Lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;
 - Lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3.
- Tipo-seletivas - com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila.
- Enantiosseletivas.

3.8.3 Reações catalisadas pelas Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações, podem ser empregadas tanto em meio aquoso como em meio orgânico proporcionando assim diversas aplicações. De fato, embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster a partir

de álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (PEREIRA, 1999). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (NASCIMENTO, 2004). A Figura 2 mostra que além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações como a esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES & MACEDO, 2006).



Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006.

Figura 2. Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.

3.8.4 Fatores que interferem no processo de hidrólise

A hidrólise de ésteres de triacilgliceróis ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura

reacional contém não somente triacilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (HARALDSSON, 1991), conforme mostrado na Figura 3.

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a adsorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas (PEREIRA, 2004).

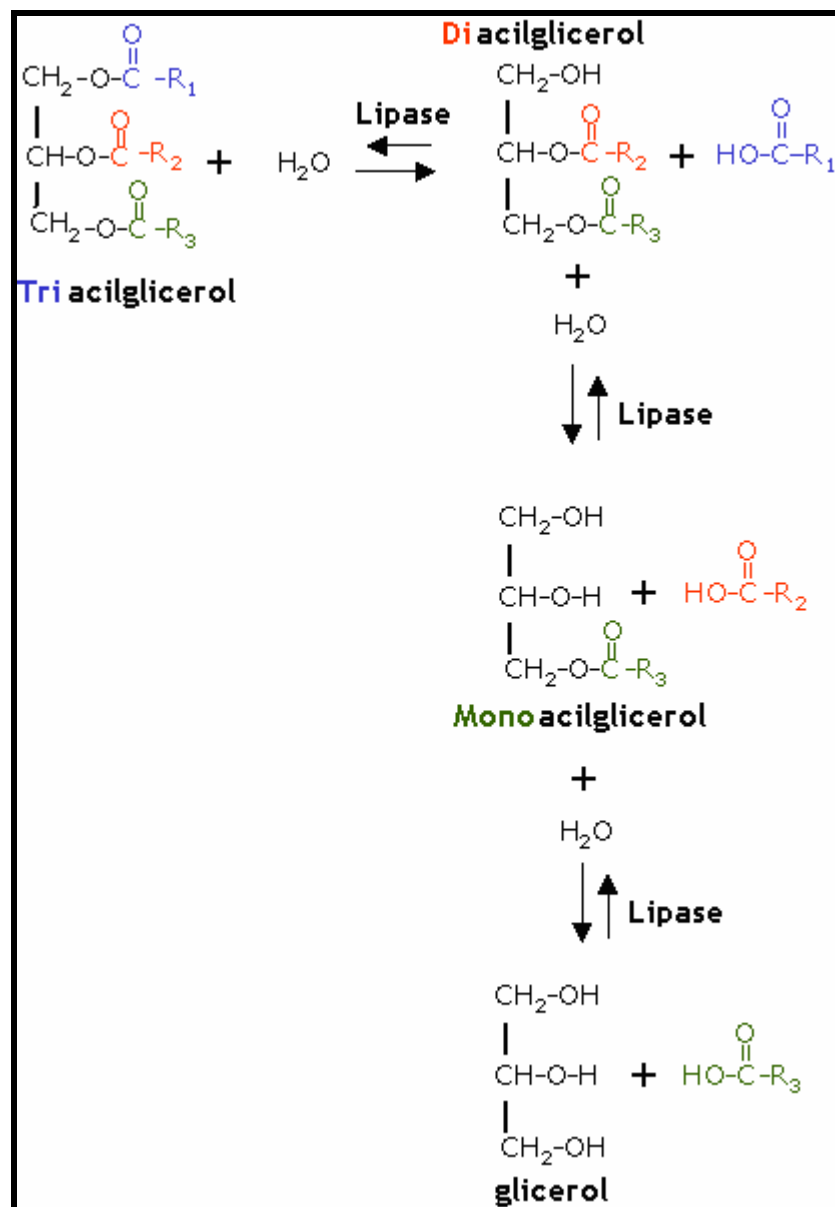


Figura 3. Etapas envolvidas na reação de hidrólise de óleos e gorduras.

Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de

óleos e gorduras e, conseqüentemente diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de óleos e gorduras usando lipases como catalisadores. Dentre esses parâmetros podemos citar:

- Relação fase aquosa / fase oleosa;
- Eventual ação inibitória dos produtos formados;
- Influência do tipo de agente emulsificante: apesar do efeito dos agentes emulsificantes em lipases não ter sido extensivamente estudado, a goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (VEERARAGAVAN, 1990). O uso de tensoativo para estabilizar emulsões na determinação de atividade lipolítica, deve ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo, como da sua concentração (MOZAFFAR et al., 1994).

- Efeito da agitação na velocidade de reação: para o caso da lipase situada na interface óleo-água, a agitação mostra-se um fator essencial para aumentar a freqüência das colisões entre a enzima e o substrato, de modo a acelerar o desenvolvimento da reação enzimática (GROSS, 1996).

- Concentração de substrato: a velocidade de uma reação catalisada por enzimas aumenta conforme a concentração de substrato, até atingir uma velocidade máxima. A obtenção de um platô na velocidade de reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis na enzima (CHAMPE & HARVEY, 1997).

- pH: a maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima, chamado pH ótimo da enzima, acima ou abaixo do qual a atividade decresce. O pH ótimo está associado ao tipo de substrato, estado de pureza da lipase, tampão e métodos de ensaio. Entretanto, grande parte das lipases tem uma atividade ótima em pH alcalino (CHAMPE & HARVEY, 1997). A lipase de pâncreas de porco tem uma atividade ótima em pH entre 8.0 e 9.0, mas dependendo do substrato e do tipo de agente emulsificante, pode desenvolver atividade em pH entre 6.0 e 7.0 (SHAHANI, 1975).

- Temperatura: o aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de enzima e substrato, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Uma elevação adicional da temperatura resulta em uma redução na velocidade de reação, como resultado da desnaturação da enzima induzida pela temperatura (CHAMPE & HARVEY, 1997). A temperatura

ótima das lipases microbianas e pancreáticas se encontra normalmente entre 30°C - 40°C (SHAHANI, 1975).

3.8.5 Aplicações das Lípases

3.8.5.1 Detergentes

Os detergentes são caracterizados por serem compostos que possuem em sua estrutura uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. Os sais dos ácidos graxos têm na cadeia hidrocarbonada a porção hidrofóbica e na carboxila dissociada (carga negativa neutralizada por sódio ou potássio), a porção hidrofílica (SANTOS, 2005). A ação de limpar e a habilidade de emulsificar de um detergente dependem de sua capacidade de formar partículas de óleo “estáveis” e reduzir a tensão interfacial, facilitando a penetração da água.

As lipases utilizadas em detergentes são selecionadas a fim de satisfazer as seguintes exigências: ter uma baixa especificidade em relação ao substrato, isto é, uma habilidade de hidrolisar gorduras de várias composições, habilidade de suportar as condições de lavagem relativamente severas (pH 10-11, 30-60 °C), habilidade de resistir a surfactantes e enzimas que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (SHARMA et al., 2001).

As principais razões do interesse crescente do uso de enzimas, utilizadas como aditivo nas formulações de novos detergentes, situa-se basicamente na possibilidade de eliminar manchas de gorduras nas baixas temperaturas de lavagem e conseguir a redução do consumo de surfactantes por razões ambientais (TATARA *et al.*, 1985 apud LEAL, 2000).

As projeções indicam que combinações variadas de misturas de enzimas venham a substituir, cada vez mais, os ingredientes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental, nas formulações de detergentes. Um exemplo está na fabricação de detergentes de máquinas de lavar louças automáticas, no mercado europeu. A substituição de muitos dos ingredientes que agrediam o meio ambiente por enzimas tornou possível a manutenção do mesmo desempenho (OLIVEIRA, et al., 2004).

3.8.5.2 Indústria alimentícia

As lipases são empregadas em diversos campos da manufatura de alimentos. Estas são utilizadas com a finalidade de aprimorar o aroma e a textura dos mesmos.

Na indústria de laticínios, as lipases são largamente utilizadas na hidrólise da gordura do leite (SAXENA et al., 1999), na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores. A adição de lipases ao leite de vaca gera um sabor similar ao do leite de cabra, e com este leite são fabricados os chamados queijos modificados enzimaticamente.

Gorduras e óleos são componentes importantes da alimentação. O valor nutricional e as propriedades físicas de um triglicerídeo são muito influenciados por fatores como a posição do ácido graxo na estrutura principal do glicerol, o comprimento de cadeia do ácido graxo e seu grau de insaturação. As lipases permitem modificar as propriedades de lipídeos alterando a posição do ácido graxo na estrutura do glicerídeo e substituindo um ou mais dos ácidos graxos por novos (SHARMA et al., 2001).

3.8.5.3 Indústria farmacêutica e química fina

Este tipo de indústria vem utilizando intensivamente lipases em seus processos produtivos. As características de enantio seletividade das lipases permitem a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos. Além disto, estas enzimas, em geral, apresentam excelente estabilidade em presença de solventes orgânicos, nos quais os substratos destas reações são solúveis (KATZ et al., 1993 apud LEAL, 2000).

3.8.5.4 Hidrólise de óleos e graxas

A gama de aplicações de lipases na indústria oleoquímica é enorme, e o emprego dos biocatalisadores proporciona diminuição de gastos com energia e minimiza a degradação térmica dos compostos, quando comparados às vias químicas tradicionais (LEAL, 2000).

O procedimento usual para a hidrólise de óleos e graxas, catalisada pela

lipase, consiste em misturar a gordura com a lipase solubilizada em água. O processo enzimático para a hidrólise de óleos e graxo tem um custo elevado, por isso é grande a busca por processos de produção de enzimas a custo reduzido (LEAL, 2000).

A Tabela 8 apresenta um resumo das principais aplicações no setor de óleos e gorduras.

Tabela 8. *Aplicação industrial das lipases no setor de óleos e gorduras.*

Setor	Efeito utilizado	Produto
<i>Alimentício</i>		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos.
Panificação	Melhoramento do sabor / qualidade, prolongamento do tempo de prateleira.	Confeitos e bolos.
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos.	Bebidas alcoólicas
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes.
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais. Hidrólise de óleos (ácidos graxos, DG e MG).	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
<i>Químico</i>		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gordura	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes.

Fonte: (CASTRO et al., 2004).

3.8.5.5 Outras aplicações

A versatilidade catalítica das lipases proporciona a estas enzimas uma diversidade de aplicações. As lipases podem ser empregadas na produção de cosméticos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de lipídeos (GHANDI, 1997; SHARMA et al., 2001). A indústria de cosméticos e de perfumes pode empregar lipases para a produção de aromas e de surfactantes, ou de emolientes usados em cremes para a pele e cremes bronzeadores (SAXENA et al., 1999). Na indústria de couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para a remoção de gordura subcutânea e pelos.

Na indústria de polpa e papel, triglicerídeos e ceras contidas na madeira na remoção do "pitch" que dificultam o processo de produção de papel podem ser removidos pelo emprego de lipases (JAEGER & REETZ, 1998).

Atualmente, o tratamento de resíduos também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, seja na prevenção ou limpeza de filmes gordurosos, seja na biodegradação de plásticos, ou seja, no pré-tratamento de efluentes contendo compostos gordurosos como os gerados em atividades zootécnicas (LIE & MOLIN, 1991; GROSS, 1996; TEIXEIRA, 2001; MASSE et al., 2001; LEAL et al., 2002; MENDES, 2004; PEREIRA, 2004).

3.9 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS COM ELEVADOS TEORES DE LIPÍDEOS UTILIZANDO LIPASES

Os microrganismos hidrolisam os triacilglicerídeos em meio extracelular, por ação de lipases, produzindo ácidos graxos e glicerol. As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica - aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster - carboxílicas, presentes em acilgliceróis (SAXENA et al., 2003).

Essas enzimas clivam triacilgliceróis específicos, entretanto, podem não ser totalmente específicas e catalisar as reações de hidrólise de triacilglicerídeos que contêm, em sua composição, diferentes ácidos graxos, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura (SAXENA et al., 2003).

As lipases têm sido usadas na remoção de gorduras de aeradores de

estações de tratamento que empregam lodo ativado. Esta camada de gordura impede a transferência de oxigênio, comprometendo a reposição de oxigênio necessário à biomassa na degradação da matéria orgânica. A empresa japonesa Meito Sangyo Co. vem produzindo lipase de *Candida rugosa* (Lipase - MY), que é empregada em estações de tratamento de efluentes nos Estados Unidos, para a remoção de gorduras em equipamentos. O tempo de vida útil de equipamentos industriais e de estações de tratamento de efluentes eleva-se com a remoção de sólidos, como gorduras (MENDES et al., 2005).

As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (ROBLES et al., 2000).

Um complexo enzimático contendo hidrolases, como proteases, amilases, celulases e lipases, produzidas por *Bacillus subtilis*, foi testado em efluentes ricos em lipídeos por Cail et al. (1986). O pré-tratamento enzimático aumentou a remoção de DQO de 59% no controle para 78% no reator anaeróbio e reduziu os teores de lipídeos e sólidos de 70% para 47% e de 70% para 34%, respectivamente.

A hidrólise de lipídeos de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, empregando lipase microbiana de *Candida rugosa* foi realizada por Pereira et al. (2003). As porcentagens de hidrólise mais elevadas foram alcançadas em efluentes tamponados no pH ótimo de atuação dessa preparação enzimática (pH 7.0). Verificou-se a influência das concentrações de enzima, agente emulsificante e íons cálcio no desempenho da hidrólise dos lipídeos, por um período de 3 horas. A porcentagem de hidrólise máxima obtida foi de 20,9%, com influência significativa, em níveis máximos, das concentrações de enzima (0,4%) e agente emulsificante (3%). O ajuste do pH do efluente com soluções de NaOH ou NaHCO₃ em substituição à solução tampão e após 12 horas de tratamento, elevou a porcentagem de hidrólise dos lipídeos para 35%. A eficiência do pré-tratamento enzimático, verificada por meio de testes de atividade metanogênica, revelou uma redução no tempo de digestão anaeróbia da ordem de 33%.

Desta forma, pode-se afirmar que a enzima lipase tem uma grande

potencialidade para o tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista sua grande especificidade e capacidade de hidrolisar os lipídeos presentes nesses efluentes.

Para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. É necessário conhecer em detalhes os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes: suas variações ao longo do tempo, os insumos empregados, o regime de descarga dos efluentes, o procedimento para limpeza das instalações, sua freqüência e produtos utilizados para esse fim. Todos esses detalhes operacionais podem influenciar na qualidade dos efluentes. É necessário também fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise (MENDES et al., 2005).

4 Material e Métodos

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo estão apresentados o material e os métodos utilizados, bem como a descrição dos procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho. Os procedimentos experimentais relacionados a este trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, adquirido das empresas Nuclear, Synth, Quimex, Coleman e Vetec. Dentre esses, podem ser citados:

- Solventes (acetona, álcool etílico, hexano);
- Sais (fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio);
- Emulsificante (goma arábica);
- Bases (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio);
- Ácido (ácido sulfúrico, ácido clorídrico).

4.2.2 Enzimas

Foram utilizadas preparações enzimáticas comerciais de origem animal:

- Lipase pancreatina (LKM) – fornecida pela empresa Kin Master / RS. Os dados desta enzima estão no Apêndice C.

- Lipase pancreatina (LNU) - fornecida pela empresa Nuclear / SP.

4.2.3 Substrato

Como substratos foram usados:

- Azeite de Oliva – controle;
- Efluente da indústria de abate de frango – Indústria Macedo Koerich / SC.

O efluente foi coletado no tanque de equalização, proveniente do processo industrial de escaldagem e depenagem, da lavagem do frango, das víceras, dos equipamentos, dos pisos e outros. O efluente foi guardado em recipientes de plásticos não esterilizados e armazenado em freezer a 0°C, para conservação das suas características.

4.2.4 Inóculo

O inóculo utilizado foi obtido de reatores de manta de lodo com fluxo ascendente (UASB), utilizado para o tratamento de esgoto doméstico, pela Companhia de Saneamento básico do Estado de Santa Catarina (CASAN), na cidade de Florianópolis, e posteriormente foi estocado em recipientes plásticos armazenados a 20°C.

4.3 EQUIPAMENTOS

Dentre os equipamentos utilizados podemos citar:

- pHmetro modelo WTW pH 330i, fabricado por Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH & Co.KG – para medidas de pH;
- Espectrofotômetro modelo E-225D, fabricado por CELM – para análises de DQO;
- Banho Maria modelo Dubnoff digital NT 232, fabricado por Nova Técnica – para dosagens de atividade enzimática e testes de biodegradabilidade.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Caracterização físico-química do efluente

Alíquotas foram separadas e caracterizadas quanto aos parâmetros de

interesse para o processo: pH, demanda química de oxigênio (DQO), alcalinidade total, óleos e graxas, acidez, ácidos graxos livres, massa específica, amônia, índice de saponificação, segundo normas recomendadas por métodos oficiais (APHA, 1995).

4.4.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das preparações enzimáticas

As lipases pancreáticas LKM e LNU foram caracterizadas quanto à sua atividade específica em função do pH e da temperatura, realizada frente a dois substratos, o azeite de oliva e o efluente bruto.

4.4.2.1 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia adotada por Pereira (2004). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva ou efluente e 50 mL de goma arábica a 7% (p/v) quando o azeite de oliva era utilizado e 3% (p/v) quando se utilizava o efluente. Em frascos erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, anteriormente preparado, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7.0) e 1 mL da solução enzimática (5 mg.mL⁻¹). Os frascos foram incubados a 37°C por 10 minutos, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02M, utilizando fenolftaleína como indicador. Para cada análise de atividade, foi realizado um branco utilizando água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores de atividade específica foram obtidos através da Equação 4.1. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

$$A.E. (\mu\text{moles.min}^{-1}) = \frac{(V - V_b).C_{KOH}.10^6}{V_E.C_E.t} \quad (4.1)$$

Onde: C_{KOH} = concentração da solução de KOH (M);

t = tempo de reação (minutos);

V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL);

V_E = volume da solução enzimática (mL);

C_E = concentração de proteínas na solução enzimática ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

$A.E.$ = atividade específica ($\mu\text{moles}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$ ou $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$).

4.4.2.2 Influência do pH na atividade da enzima

As atividades das lipases foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise dos substratos (azeite de oliva e o efluente) na faixa de pH entre 5.8 a 10. Para este estudo foi empregada à mesma metodologia descrita no item 4.4.2.1. variando o pH do tampão fosfato de sódio (0,1M), a temperatura de 37°C.

4.4.2.3 Influência da temperatura na atividade da enzima

Foi verificada a influência da temperatura na atividade enzimática das lipases empregando-se a reação de hidrólise dos substratos (azeite de oliva e o efluente), conforme metodologia descrita no item 4.4.2.1, nas temperaturas de 30°C a 60°C, no pH ótimo de cada preparação de lipase.

4.4.3 Hidrólise e biodigestão do efluente

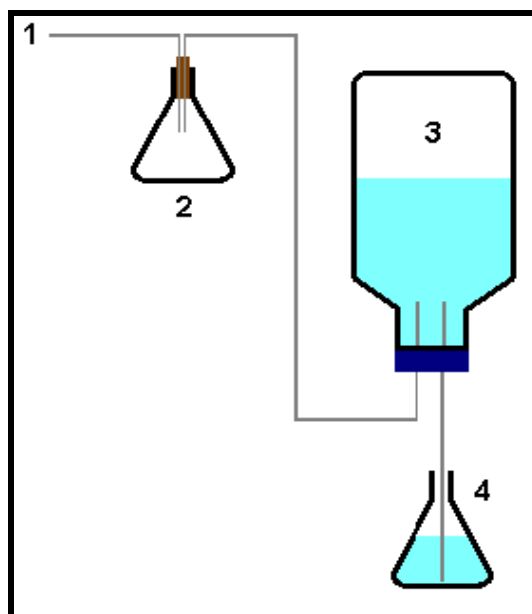
As etapas de hidrólise e digestão anaeróbia do efluente bruto e tratado enzimaticamente foram realizadas simultaneamente.

As concentrações de biomassa e substrato foram de acordo com as recomendadas por Soares e Hiriata (1999) e a concentração de enzima foi variada de 0,10% a 0,35% (p/v).

Os experimentos foram conduzidos em frascos vedados de vidro tipo soro, com volume útil de 500 mL, aos quais foram adicionados o lodo anaeróbio (50 mL), o efluente (250 mL) e a enzima em diferentes concentrações.

A Figura 4 mostra como foram feitas as medidas do volume de metano. O biogás produzido no reator entra no sistema pelo ponto 1, passando por frasco de segurança, ponto 2, que tem o objetivo de proteger o reator de possíveis

vazamentos de soda cáustica que está presente no frasco Duran invertido, ponto 3. Após passar pelo frasco de segurança o biogás é borbulhado no frasco Duran, que contém uma solução de NaOH 5%, fazendo com que o CO_2 que está presente no biogás reaja com a soda cáustica. Desta maneira o CO_2 é eliminado do biogás restando apenas o CH_4 , que fica retido na parte superior do frasco Duran invertido. À medida que o metano vai sendo acumulado no sistema a soda cáustica vai sendo deslocada para o frasco de coleta, ponto 4. Com auxílio de uma proveta, em determinados períodos de tempo este volume era quantificado, representando a produção de metano.



Fonte: SANTANA, 2002.

Figura 4. Gasômetro tipo frasco invertido 1 - Entrada de Biogás; 2 - Frasco de segurança; 3 - Frasco Duran; 4 - Coletor de NaOH.

O frasco controle foi alimentado com efluente bruto, permitindo desta forma uma comparação da eficiência de remoção avaliando-se somente o efeito do tratamento enzimático (hidrólise das gorduras no efluente). Para descontar eventuais interferências, um segundo frasco controle foi alimentado somente com lodo, que permitiu conhecer a contribuição da produção de gás do lodo utilizado. Antes do início dos ensaios, foi aplicado nitrogênio durante 10 minutos para garantir condições de anaerobiose. Os frascos foram colocados imediatamente em um banho-maria com a temperatura e agitação ajustadas a 35°C e 100 rpm, respectivamente.

Nos tempos inicial e final de cada ensaio foram quantificados os seguintes

parâmetros: DQO, pH, ácidos graxos e glicerol.

Podemos avaliar a biodegradabilidade como a porcentagem de DQO biodegradada, calculada pela reação entre a DQO solúvel final e a DQO solúvel inicial.

$$\text{Eficiência de remoção} = \left(\frac{C_{DQO_i} - C_{DQO_f}}{C_{DQO_i}} \right) \quad (4.3)$$

Onde: C_{DQO_i} = Concentração DQO no início do teste (mg.L^{-1});

C_{DQO_f} = Concentração DQO no final do teste (mg.L^{-1});

A velocidade média de produção de metano foi avaliada em todos os ensaios de biodegradabilidade. Para o cálculo da derivada do volume calculou-se a média da inclinação entre dois pontos adjacentes de acordo com a Equação 4.4:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{2} \left(\frac{V_{i+1} - V_i}{t_{i+1} - t_i} + \frac{V_i - V_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right) \quad (4.4)$$

Onde: V_i = Volume no instante i (mL^{-1});

t_i = Tempo no instante i (h).

Foram realizadas cinco baterias de ensaios. Cada bateria possuía três frascos, em duplicata. Estas foram estabelecidas a partir de combinações de lodo, concentrações diferentes das enzimas LKM e LNU e o efluente. A Figura 5 apresenta o fluxograma dos ensaios.

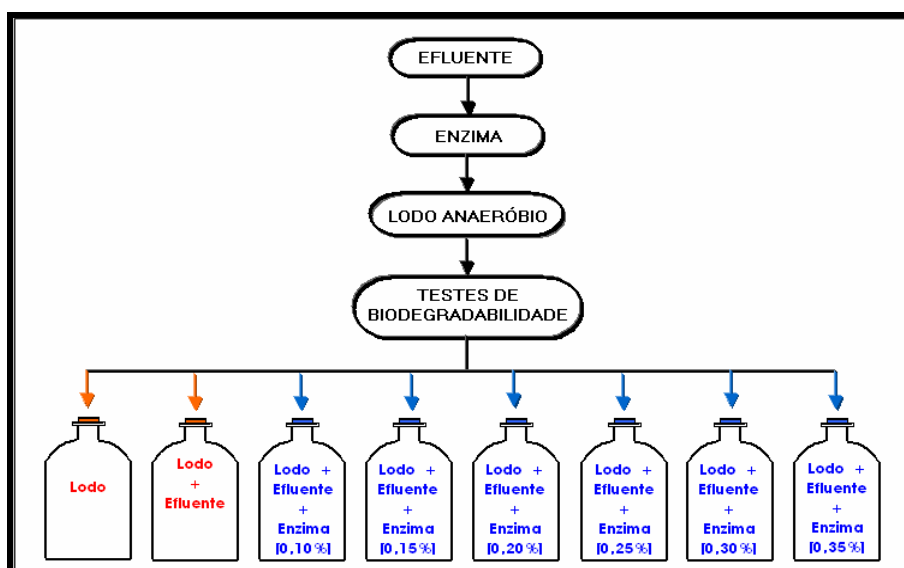


Figura 5. Fluxograma dos ensaios de Biodegradabilidade.



Figura 6. Aparato experimental utilizado nos ensaios de biodegradabilidade.

4.5 ANÁLISES

4.5.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO do efluente foi medida pelo Método Padrão Colorimétrico de Refluxo Fechado, segundo procedimento do *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 1995). A DQO se baseia no fato de alguns compostos orgânicos, são oxidados por agentes químicos oxidantes considerados fortes, como o $K_2Cr_2O_7$ (bicromato de potássio) em meio ácido, sendo o resultado final desta oxidação o dióxido de carbono e água. A DQO é quantidade de O_2 necessária para a oxidação da matéria orgânica através de um agente químico. Para oxidação de compostos orgânicos de baixo peso molecular e os ácidos graxos utiliza-se o sulfato de prata (Ag_2SO_4) como catalisador.

Para o preparo da curva de calibração, foi necessário o preparo de pelo menos cinco padrões de biftalato de potássio com DQO equivalentes entre as concentrações de 20 a 500 mg de $O_2.L^{-1}$, como apresentado no Apêndice D.1. Para os testes colocou-se 2,5 mL da amostra num tubo ou ampola, adicionou-se 1,5 mL da solução digestora e em seguida 3,5 mL do ácido sulfúrico reagente,

cuidadosamente. As amostras foram diluídas adequadamente e digeridas em estufa ou bloco digestor a 150 °C por 2 horas. Resfriavam-se os tubos e a leitura foi feita diretamente em espectrofotômetro a 600 nm.

4.5.2 Determinação do teor de ácidos graxos livres

A concentração de ácido graxo livre foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol P.A., empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02N e fenolftaleína como indicador (MACÊDO, 1997). A concentração de ácidos graxos foi calculada pela Equação 4.5.

$$\text{Ácidos graxos livres (g ácido graxo.g}^{-1}\text{)} = \frac{V.C_{KOH}.MM_{\text{ácidos graxos}}}{m_a} \quad (4.5)$$

Onde: V = volume da solução de KOH gastos na titulação (L);

C_{KOH} = concentração de KOH (M);

$MM_{\text{ácidos graxos}}$ = massa molecular dos ácidos graxos titulados (g.mol^{-1});

m_a = massa da amostra (g).

4.5.3 Determinação do índice de acidez total

Definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres de uma grama da amostra, o índice de acidez revela o estado de conversão do óleo. Pesou-se 2 g da amostra em um frasco erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de solução de éter e álcool (2:1) neutra. Agitou-se e adicionou-se 2 gotas de indicador fenolftaleína. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N até coloração rósea (MORETTO & FETT, 1998). A acidez foi obtida através da Equação 4.6.

$$\text{Índice de Acidez (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = \frac{V.C_{NaOH}.MM_{KOH}.10^3}{m_a} \quad (4.6)$$

Onde: V = volume da solução de NaOH gastos na titulação (L);

C_{NaOH} = concentração de NaOH (M);

m_a = massa da amostra (g);

MM_{KOH} = massa molecular do KOH (g.mol^{-1}).

4.5.4 Determinação do índice de saponificação

O índice de saponificação é definido como a massa, em miligramas, de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama de amostra e é inversamente proporcional a massa molecular média dos ácidos graxos dos glicerídeos presentes. O procedimento consistiu em pesar 2 g da amostra em um frasco erlenmeyer de 250 mL. Adicionar, com o auxílio de uma bureta, 20 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio 4%. Ao erlenmeyer foi adaptado um refrigerante de fluxo. Aqueceu-se até ebulição branda, durante 30 minutos e resfriou-se. Em seguida foram adicionadas duas gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com ácido clorídrico 0,5N até que a coloração rósea desaparecesse. Para a prova em branco procedeu-se da mesma forma, exceto a adição da amostra. A diferença entre os volumes do branco e da amostra gastos nas titulações é equivalente à quantidade de hidróxido de potássio gasto na saponificação (MORETTO & FETT, 1998). O índice de saponificação foi calculado através da Equação 4.7.

$$\text{Índice de Saponificação (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = \frac{V.C_{HCl} . MM_{KOH} . 10^3}{m_a} \quad (4.7)$$

Onde: V = diferença entre os volumes do HCl gastos nas duas titulações (L);

C_{HCl} = concentração de HCl (M);

m_a = massa da amostra (g);

MM_{KOH} = massa molecular do KOH (g.mol^{-1}).

Para o cálculo da massa molecular dos ácidos graxos utilizou-se a Equação 4.8 (HORTWIZ, 1980 apud SINGHAL & KULKARNI, 1990):

$$MM_{\text{ácido graxo}} (\text{g.mol}^{-1}) = \frac{56000}{IS} - 12,67 \quad (4.8)$$

Onde: IS = Índice de saponificação (mg.g^{-1});

$MM_{\text{ácido graxo}}$ = massa molecular dos ácidos graxos (g.mol^{-1});

4.5.5 Determinação de amônia

A determinação de amônio foi realizada segundo o método de Nessler, descrito por Vogel (1981). Inicialmente foi preparado o reagente de Nessler

dissolvendo 100g de iodeto de mercúrio (II) e 70g de iodeto de potássio em 100 mL de água, adicionando a seguir uma solução fria de 160g de NaOH em 700 mL de água destilada, completando o volume final da solução para 1L. O precipitado foi deixado decantar por alguns dias antes de utilizar o reagente, o qual deve ser submetido a uma padronização, utilizando uma solução de cloreto de amônio.

Para determinação da concentração de amônio, foram adicionados 100µL do reagente de Nessler para 5 mL de amostra e, após aguardou-se 10 minutos de reação e foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525nm. Com o valor da absorbância, foi obtida a concentração de amônio a partir da curva padrão apresentada no Apêndice D.2.

4.5.6 Determinação da concentração de óleos e graxas

A análise de Óleos e Graxas foi realizada pelo Laboratório de Saneamento Básico, localizado junto ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Santa Catarina (CEFET – SC), situado em Florianópolis, SC. O teor de óleos e graxas no efluente foi determinado pelo método gravimétrico segundo procedimento padrão (APHA, 1995).

4.5.7 Determinação da alcalinidade total

A alcalinidade do efluente foi medida através do seguinte procedimento: mediu-se 50 mL da amostra e adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína. Caso a amostra tornasse rósea, titulavasse com ácido sulfúrico 0,02 N, até o descoramento do indicador. Como a amostra não ficou rósea, e isto significa que a alcalinidade a fenolftaleína é igual a zero, então se adicionou 2 gotas de metilorange na mesma amostra e titulou-se com ácido sulfúrico 0,02 N, até que a coloração mude de amarelo para laranja – róseo. (APHA, 1995). A alcalinidade total (A.T.) do efluente foi calculada pela Equação 4.9.

$$A.T. (mgCaCO_3.L^{-1}) = \frac{V.C_{H_2SO_4} . MM_{CaCO_3} . 10^3}{V_{amostra}} \quad (4.9)$$

Onde: V = volume de H₂SO₄ gastos na amostra (L);

C_{H₂SO₄} = concentração de H₂SO₄ (M);

MM_{CaCO_3} = massa molecular do $CaCO_3$ ($g \cdot mol^{-1}$);

$V_{amostra}$ = volume da amostra (L).

4.5.8 Determinação da concentração de glicerol

A determinação da concentração de glicerol consistiu da reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio ($NaIO_4$) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico, este último foi utilizado como medida do glicerol (COCKS E VAN REDE, 1966 apud PEREIRA, 2004). A amostra contendo entre 1 a 2g de massa era previamente diluída em 50 mL de água destilada, sendo a mesma acidificada com ácido sulfúrico 0,2N, utilizando bromotimol como indicador. A solução era, então, neutralizada com NaOH 0,05N até coloração azul. Paralelamente, uma solução em branco era preparada contendo 50 mL de água destilada, sem a presença de glicerol, sendo que o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada foi aplicado ao branco. Em seguida, 100 mL de solução de periodato de sódio ($60g \cdot L^{-1}$) eram adicionados à amostra e ao branco e mantidas no escuro por 30 min. Após este período, 10 mL de solução de etilenoglicol (1:1) eram adicionados à mistura, a qual era deixada à temperatura ambiente, no escuro, por mais 20 min. As amostras eram, então, diluídas a 300 mL com água destilada e tituladas com solução de NaOH 0,125N, usando pHmetro para determinar o ponto final, pH de 6.5 para o branco e 8.1 para a amostra. A percentagem de glicerol contida na amostra era determinada pela equação 4.10.

$$\% \text{ Glicerol } (g \text{ glicerol} \cdot g^{-1}) = \frac{MM_{Glicerol} \cdot C_{NaOH} \cdot (V_1 - V_2)}{m_a} \quad (4.10)$$

Onde: C_{NaOH} = concentração de NaOH (M);

m_a = massa da amostra (g);

V_1 = volume da solução de NaOH gasto na amostra (L);

V_2 = volume da solução de NaOH gasto no branco (L);

$MM_{Glicerol}$ = massa molecular do Glicerol ($g \cdot mol^{-1}$).

4.5.9 Determinação dos sólidos suspensos totais

Para estimar a concentração celular do lodo, foi determinada a massa de sólidos suspensos totais (gSST) presente em determinado volume de amostra (L).

Primeiramente, foram recortados papéis de filtro comum de forma circular com aproximadamente 5 cm de diâmetro, enumerados e secos em microondas por 15 minutos, a 20% da potência. Terminado este tempo, os papéis foram imediatamente pesados.

A seguir, foram filtrados 20 mL de suspensão de lodo em filtro a vácuo, efetuando a amostragem em triplicata. Os papéis contendo o lodo foram novamente levados ao aparelho de microondas, permanecendo por 15 minutos a 20% da potência para retirada da umidade. Após nova pesagem foi obtida a massa de sólidos, por diferença de peso, presente nos 20 mL de amostra. Através de uma simples relação para 1000 mL, foi obtida a concentração de sólidos do lodo em gSST/L (KIELING, 2004).

5 Resultados e Discussão

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE

Abatedouros e indústrias de processamento de carnes são processos realizados em vários estágios onde cada etapa gera resíduos com diferentes características. Os efluentes deste tipo de indústria contêm uma grande variedade e quantidade de contaminantes, caracterizadas principalmente por uma mistura complexa de lipídeos, substâncias protéicas, elevadas cargas orgânicas e alta concentração de sólidos em suspensão. As características de todo efluente do abatedouro variam consideravelmente com o tempo por causa da descontinuidade do processo e são provenientes do processo de abate e dos processos de lavagem de pisos e equipamentos.

A caracterização do efluente proveniente do frigorífico Macedo Koerich foi realizada de acordo com as metodologias descritas no item 4.5, cujos resultados encontram-se descritos na Tabela 9. O efluente utilizado foi coletado no tanque de equalização da Estação de Tratamento de Efluentes da indústria.

O valor encontrado para o índice de saponificação ($125,24 \text{ mg KOH.g}^{-1}$) se encontra abaixo do valor obtido por Pereira (2004) ($188,60 \text{ mg KOH.g}^{-1}$), que utilizou efluente da mesma indústria. Segundo Pereira (2004) o índice de saponificação comprova a presença de composto insaturado que é de extrema importância no cálculo da massa molecular média dos ácidos graxos presentes no efluente. Desta forma através da Equação 4.8 calculou-se a massa molecular média, obtendo um valor de $434,47 \text{ g.mol}^{-1}$.

A alcalinidade total representa a soma da alcalinidade advinda dos ácidos graxos voláteis e dos bicarbonatos. Para resíduos com pH em torno de 5,0, a alcalinidade total é constituída basicamente por sais derivados de ácidos graxos voláteis (LEITE, et al., 2004), neste caso a alcalinidade foi de $73 \text{ mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$ em

pH entre 6.3 – 6.7.

Tabela 9. Caracterização do efluente.

Parâmetros	Resultados	Pereira, 2004
pH	6.5	6.2
Índice de acidez (mg KOH .g ⁻¹)	40,4	30
Alcalinidade Total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	73,0	75,1
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	6720*	3930
Amônia (mg NH ₄ L ⁻¹)	7,1	17,4
Índice de saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	125,24	188,6
Massa molecular ácidos graxos (g.mol ⁻¹)	434,47	318,3
Óleos e graxas (mg.L ⁻¹)	2005*	4830
Massa específica (g.mL ⁻¹)	1,01	0,92
Ácidos graxos livres (mg ácido graxo.g ⁻¹)	3,1	5,4

*Dado fornecido por Macedo Koerich S/A.

O ponto positivo de ter-se o tanque de equalização em um processo de tratamento de efluentes de indústrias deste tipo, está no fato de que este tanque provoca uma homogeneização e diluição do efluente. Mesmo assim, a instabilidade do processo de industrialização modifica as características do efluente diariamente. Comparando os resultados obtidos com os valores encontrados por Pereira (2004) percebe-se esta variação em alguns dos parâmetros analisados. Outro fator a ser considerado é que podem ter ocorrido mudanças nos processos produtivos e isso interfere diretamente nos resíduos gerados.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS LIPASES

Para a concretização deste trabalho foram utilizadas duas diferentes amostras de lipases comerciais fornecidas por duas produtoras brasileiras, Kin Master/RS e Nuclear/SP. Neste item foram discutidos os resultados da influência do pH e temperatura na atividade das lipases, frente a dois substratos (azeite de oliva e o efluente).

5.2.1. Influência do pH na atividade das lipases

Geralmente as enzimas são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido na qual sua atividade é máxima. A inter-relação

da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende do comportamento ácido-básico e do substrato, principalmente. Mas outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente também interferem nesta relação, como por exemplo: concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de cofatores da enzima e natureza química do tampão (PEREIRA & FURIGO, 2001).

A fim de se avaliar a influência do pH no desempenho catalítico das lipases (LKM e LNU) na reação de hidrólise dos substratos (azeite de oliva e o efluente), variou-se o pH de incubação na faixa de 5.8 a 10, numa temperatura fixa de 37°C, empregando a metodologia descrita no item 4.4.2.2.

Através da Figura 7, pode-se observar que a lipase LNU atingiu a atividade máxima de 3913,33 U.mg⁻¹ em pH igual a 7.0 e a LKM apresentou um valor de pH ótimo em faixas mais alcalinas, alcançando atividade máxima de 3320 U.mg⁻¹ em pH 8.0; utilizando como substrato o azeite de oliva.

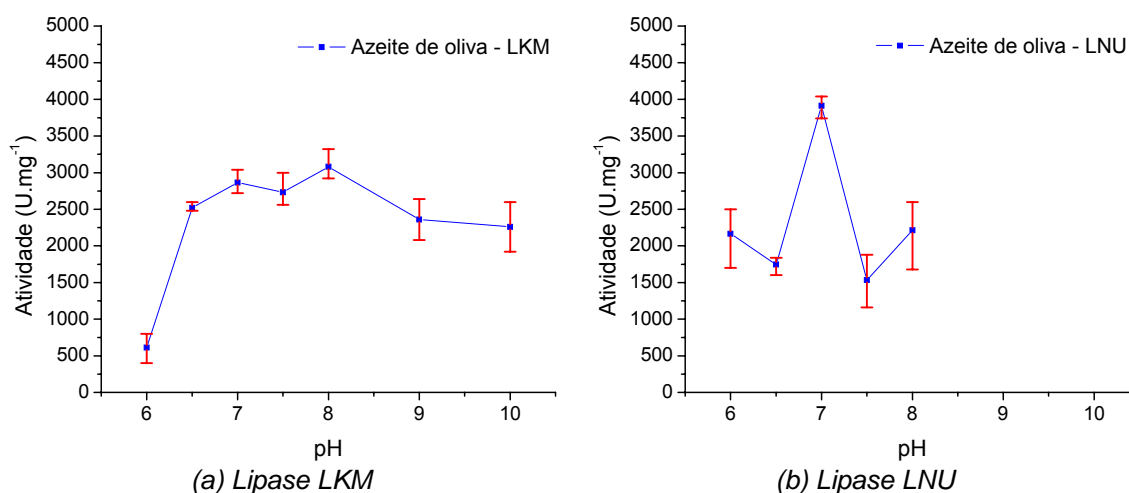


Figura 7. Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - azeite de oliva, 37°C, Agitação - 100 rpm).

Pereira (2004) trabalhou com as mesmas enzimas e alcançou atividades máximas de 4606 U.mg⁻¹ e 3992 U.mg⁻¹, para a LKM e LNU, respectivamente, em pH 8.0 para ambas. É importante salientar que este autor utilizou só um tipo de substrato, o azeite de oliva.

Na Figura 8, podemos observar o comportamento das preparações enzimáticas, em relação ao pH, utilizando como substrato o efluente bruto. A enzima LNU atingiu uma atividade máxima de 220 U.mg⁻¹ em pH igual a 7.5 e a LKM apresentou uma atividade máxima de 580 U.mg⁻¹ em pH 7.0.

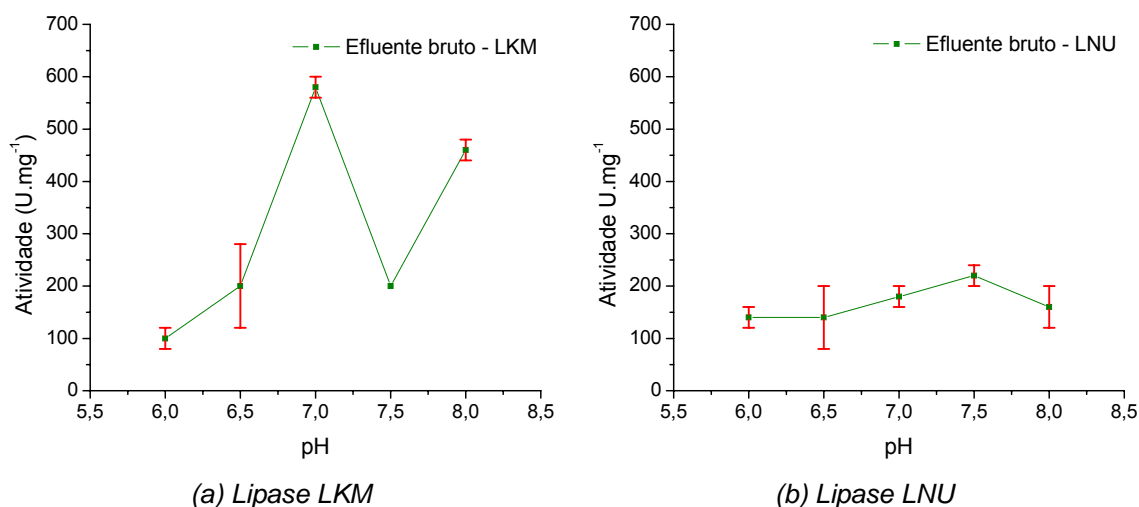


Figura 8. Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - efluente bruto, 37°C, Agitação - 100 rpm).

Analisando a influência de diferentes substratos sobre a atividade das enzimas podemos verificar através das Figuras 7 e 8 que a enzima LNU apresentou comportamento semelhante para os dois substratos, enquanto que a enzima LKM apresentou um patamar entre o pH 6.5 e 8.0 quando se utilizou o azeite de oliva como substrato. Quanto à atividade, para os ensaios realizados com o azeite de oliva como substrato, obtiveram-se valores bem superiores quando comparados com os resultados alcançados utilizando-se o efluente como substrato. O detalhamento dos resultados está apresentado no Apêndice E.1.

5.2.2. Influência da temperatura na atividade das lipases

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: a taxa de reação aumenta e a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica. O efeito da temperatura sobre a atividade de uma enzima depende de alguns fatores que incluem o pH, força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Geralmente os substratos protegem a enzima da desnaturação pelo calor, processo na qual ocorre a perda da atividade biológica da enzima (PEREIRA & FURIGO, 2001). A determinação da temperatura ótima das lipases foi realizada variando-se a temperatura de incubação de 30 a 60°C em seus respectivos valores de pH ótimos de atuação, empregando a metodologia descrita no item 4.4.2.3.

Na faixa estudada observa-se que as lipases LNU e LKM apresentaram uma atividade máxima de 3913 U.mg⁻¹ e 3320 U.mg⁻¹, respectivamente, na

temperatura de 37°C, utilizando como substrato o azeite de oliva, como pode ser visto na Figura 9. (Apêndice E.2). Pereira (2004) observou uma temperatura ótima de 45°C para LKM e 37°C para a LNU, com atividades máximas de 4606 U.mg⁻¹ e 3992 U.mg⁻¹, respectivamente.

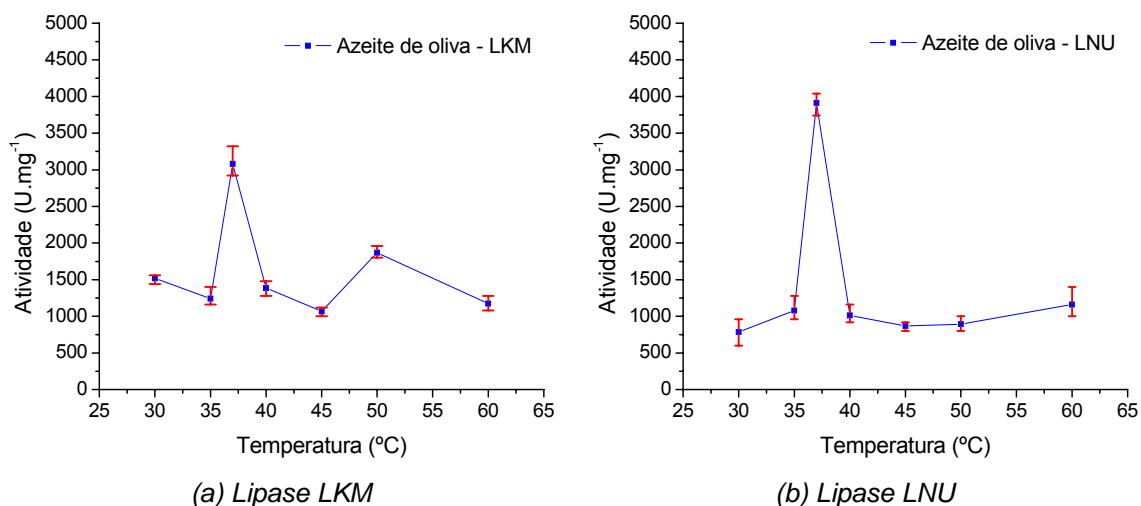


Figura 9. Influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU (Substrato - azeite de oliva, 37°C, Agitação - 100 rpm).

Já na Figura 10, onde temos o comportamento das lipases em relação à temperatura utilizando como substrato o efluente bruto, nota-se que a LKM apresenta uma atividade máxima de 580 U.mg⁻¹ em um intervalo de temperatura de 37°C a 40 °C; enquanto que a LNU a 45 °C atingiu uma atividade máxima de 680 U.mg⁻¹.

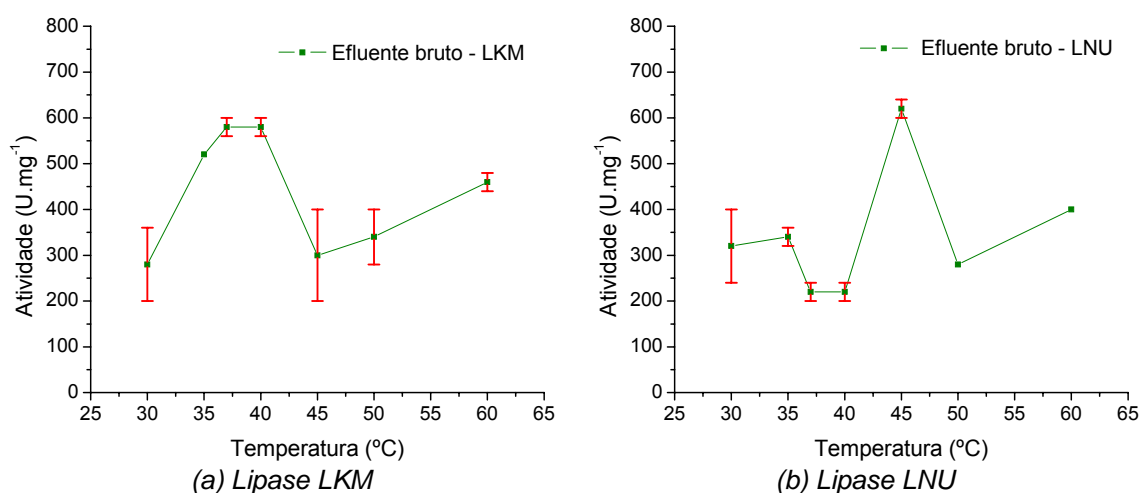


Figura 10. Influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases (a) LKM e (b) LNU. (Substrato - efluente bruto, 37°C, Agitação - 100 rpm).

Verificamos através das Figuras 9 e 10 que a enzima LNU apresentou picos na atividade hidrolítica nos dois substratos, enquanto que a enzima LKM apresentou um patamar na atividade dentro de uma faixa de temperatura de 37°C a 40°C quando se utilizou o efluente como substrato. Os valores de atividade mais uma vez foram superiores utilizando o azeite de oliva como substrato.

Na Tabela 10 é apresentado um resumo da caracterização das lipases LKM e LNU. É importante destacar que a utilização de diferentes substratos interfere sensivelmente na atividade das enzimas, assim como nos valores de pH e temperatura ótimos.

Tabela 10. Caracterização das preparações de lipases LKM e LNU.

Propriedades catalíticas		Lipases	
		LKM	LNU
pH ótimo	Azeite de oliva	8.0	7.0
	Efluente	7.0	7.5
Temperatura ótima (°C)	Azeite de oliva	37	37
	Efluente	37 - 40	45

5.3. TRATAMENTO ANAERÓBIO E ENZIMÁTICO DO EFLUENTE

Conforme descrito no item 4.4.3 os ensaios de hidrólise e biodigestão foram realizados simultaneamente com a variação da concentração de enzima. Nos tempos finais e iniciais foram retiradas amostras e quantificados: DQO, pH, ácidos graxos e glicerol.

O lodo utilizado como inóculo nos ensaios de biodegradabilidade do efluente bruto, do lodo e das concentrações 0,10% - 0,20% (p/v) da enzima LKM, apresentou uma DQO de 4439,09 mg de O₂.L⁻¹ e um valor de 59,2 g.L⁻¹ de sólidos suspensos totais.

Estudos relatados na literatura mostram uma grande eficiência na formação de biogás e remoção de DQO em reatores anaeróbios que operam à temperatura de 35°C (HAWKES et al., 1995; GAVALA et al., 1999; LEAL et al., 2002; PEREIRA, 2004, MENDES, 2004) e, devido a esse fato, a temperatura adotada nos testes de biodegradabilidade do presente trabalho foi de 35°C.

É importante salientar que nos ensaios de biodegradabilidade deste trabalho, não foram utilizados agentes emulsificantes e/ou compostos iônicos, ou seja, nenhum tipo de suplementação foi empregado para o incremento da atividade

das lipases. Os resultados graficados nas curvas dos ensaios de biodegradabilidade representam a média dos valores obtidos das duplicatas.

5.3.1. Hidrólise e biodigestão do lodo e do efluente bruto

Os ensaios realizados com o lodo e com o efluente bruto foram tomados como controle, a fim de verificar contribuição destes na produção de metano. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 11 e 12.

A produção de metano do lodo, apresentada na Figura 11, foi de 502,8 mL. Na Figura 12 é possível observar o comportamento do efluente bruto, que teve uma produção de 538,4 mL de metano. A redução na produção de metano aconteceu a partir de 650 horas. Os ensaios com o lodo e o efluente bruto foram encerrados em 823 horas, com uma produção quase nula de metano, mas ainda com DOQ residual.

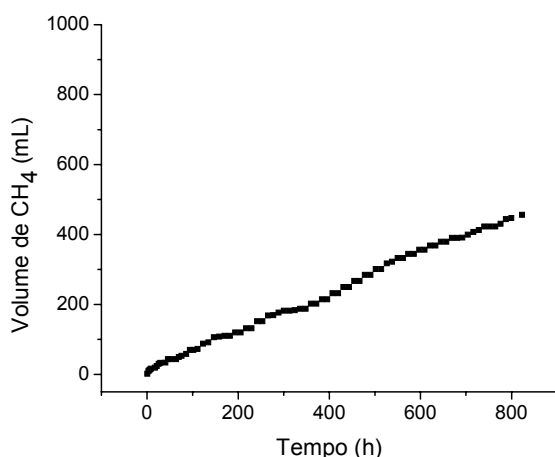


Figura 11. Produção de metano do lodo (Volume de lodo - 50 mL, Agitação - 100 rpm, 35°C, 33 dias).

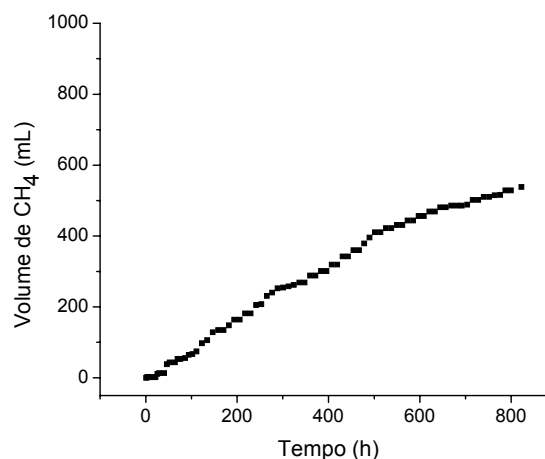


Figura 12. Produção de metano do efluente bruto (Volume de lodo - 50 mL, Volume de efluente bruto - 250 mL, Agitação - 100 rpm, 35°C, 33 dias).

A DQO do lodo e do efluente bruto no início dos ensaios de biodegradabilidade foi de 896,69 mg O₂.L⁻¹ e 581,81 mg O₂.L⁻¹, respectivamente. Ao final dos testes o valor da DQO para o lodo foi de 555,57 mg O₂.L⁻¹ e de 398,13 mg O₂.L⁻¹ para o efluente bruto. Em termos de remoção de matéria orgânica atingiram-se valores de 38,04% para o lodo e 31,57% para o efluente bruto.

5.3.2. Hidrólise e biodigestão do efluente tratado com a enzima LKM

Foram testadas as concentrações de 0,10% - 0,35% (p/v) de enzima. Os testes ocorreram a uma temperatura de 35°C e sob uma agitação de 100 rpm.

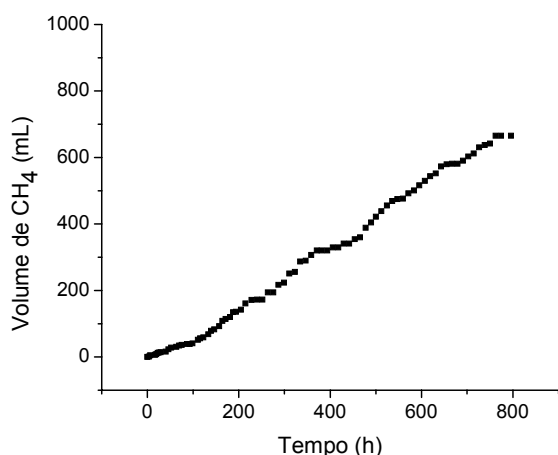


Figura 14. Produção de metano do efluente tratado com 0,10% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).

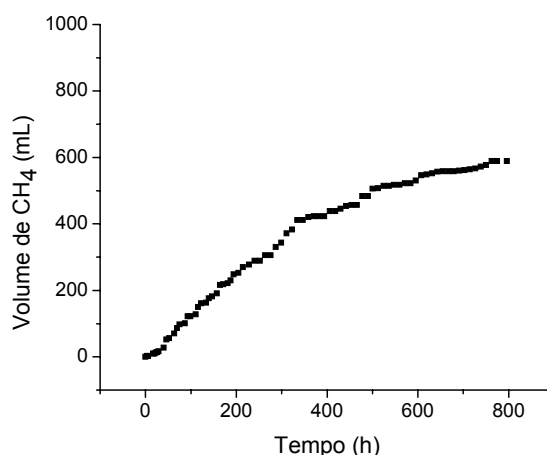


Figura 15. Produção de metano do efluente tratado com 0,15% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).

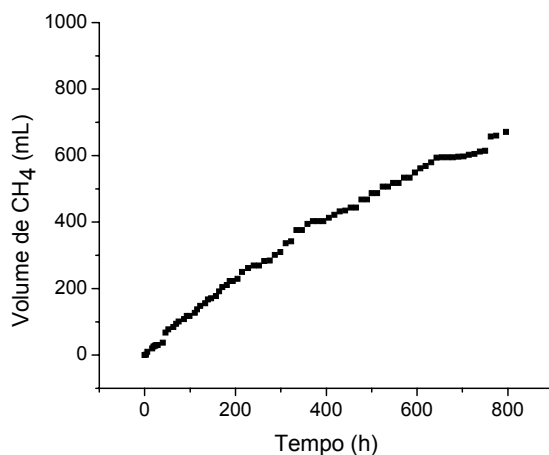


Figura 16. Produção de metano do efluente tratado com 0,20% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 32 dias).

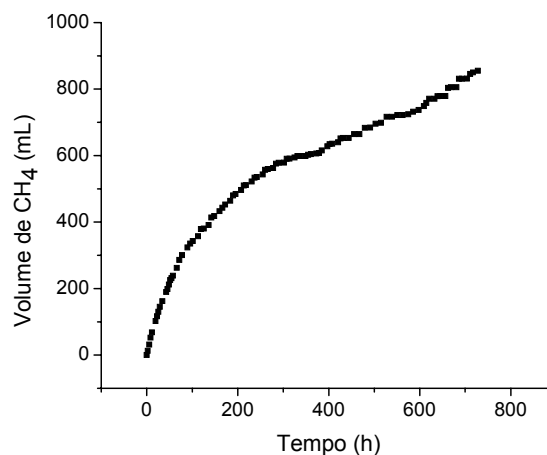


Figura 17. Produção de metano do efluente tratado com 0,25% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).

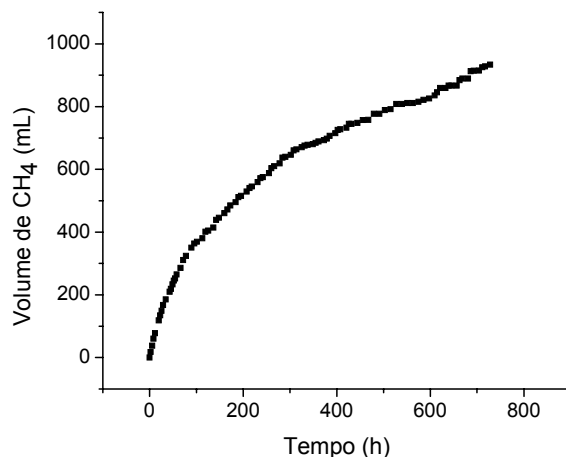


Figura 18. Produção de metano do efluente tratado com 0,30% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).

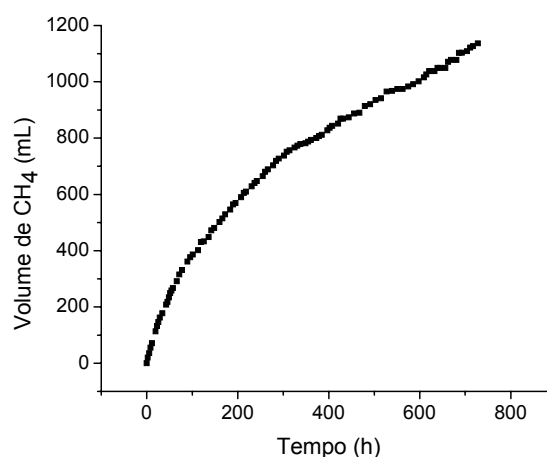


Figura 19. Produção de metano do efluente tratado com 0,35% (p/v) de enzima LKM (Agitação - 100 rpm, 35°C, 31 dias).

Para a concentração de enzima de 0,10% (p/v), o volume de metano produzido em função do tempo esta representado na Figura 14. Verifica-se uma produção de 728,45 mL de CH₄.

Já a concentração de enzima 0,15% (p/v) resultou na produção de um volume de 589,2 mL de metano. Observamos, na Figura 15, que a partir de 500 horas começamos a ter uma diminuição na produção de metano e conseqüentemente redução na velocidade de biodegradação.

Na Figura 16, observa-se que com a concentração de enzima de 0,20% (p/v), obteve-se uma produção de 732,6 mL de metano. Esta produção começa a diminuir a partir de 640 horas, como pode ser observado na. Os ensaios com as concentrações de 0,10%; 0,15%; 0,20% (p/v) duraram 32 dias.

A Figura 17 representa o ensaio de biodegradabilidade do efluente tratado com uma concentração de 0,25% (p/v) de enzima, que teve uma produção de 877,65 mL de metano, representando um aumento de 1,32 vezes do volume de metano gerado quando comparamos com o volume produzido pelo efluente bruto sem tratamento enzimático.

Com a concentração de 0,30% (p/v) de enzima foram produzidos 975,65 mL de metano, como pode se visto na Figura 18, representando um aumento de 1,47 vezes quando comparado como o volume produzido pelo efluente bruto sem tratamento enzimático.

Um volume de 1137,75 mL de metano foi obtido utilizando a concentração de enzima de 0,35% (p/v), a maior produção de todas as concentrações testadas, como podemos observar na Figura 19, representando um aumento de 1,72 vezes em relação ao volume de metano produzido pelo efluente bruto sem tratamento enzimático.

Podemos observar nas Figuras 17, 18 e 19 que uma pequena redução na produção de metano ocorreu entre 520 horas e 620 horas. O tempo de ensaio, utilizando as concentrações de 0,25%; 0,30% e 0,35% (p/v) de enzima foi de 31 dias.

A partir do ensaio com a concentração de 0,25% (p/v) de enzima, o lodo utilizado como inóculo foi substituído por uma nova amostra, que apresentou uma DQO de 660,53 mg de O₂.L⁻¹ e um valor de 69,78 g.L⁻¹ de sólidos suspensos totais. Outro fator importante a ser considerado é que a partir deste mesmo ensaio, o aparato experimental utilizado foi substituído. No início dos testes, ou seja, até o

ensaio com a concentração de 0,20% (p/v) da enzima LKM eram utilizadas mangueiras de látex, que tinham um sério problema de vazamentos, estas então foram substituídas por mangueiras de silicone. Estas alterações refletiram diretamente no volume de metano produzido.

5.3.3. Hidrólise e biodigestão do efluente tratado com a enzima LNU

Da mesma forma que para a enzima LKM, para a LNU foram testadas as concentrações de 0,10% a 0,35% (p/v) de enzima. Os testes também ocorreram a uma temperatura de 35°C e sob 100 rpm de agitação.

As Figuras 20, 21 e 22 representam os ensaios de biodegradabilidade utilizando concentrações da enzima LNU de 0,10%; 0,15% e 0,20% (p/v), respectivamente.

No ensaio com a concentração de 0,10% (p/v) o volume de metano produzido foi de 904 mL, como mostra a Figura 20. A maior produção de metano obtido de todas as concentrações testadas para esta enzima foi com a concentração de 0,15% (p/v). A Figura 21 mostra que se alcançou um volume de 1251,95 mL de metano e representou um aumento de 1,89 vezes quando comparado com o volume produzido pelo efluente bruto sem tratamento enzimático. Já na Figura 22 a produção de gás metano foi de 985,95 mL, para a concentração de 0,20% (p/v).

O comportamento das concentrações 0,25%; 0,30% e 0,35% (p/v) estão representadas nas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente. Verifica-se uma produção de 900,05 mL de gás metano para a concentração de 0,25% (p/v) de enzima, 1110,55 mL para a concentração de 0,30% (p/v) e 936,55 mL para a concentração de 0,35% (p/v).

O volume de metano produzido pelas concentrações 0,25%; 0,30% e 0,35% (p/v) de enzima representou um aumento de 1,36; 1,68 e 1,41 vezes, respectivamente, em comparação com o volume de metano produzido pelo efluente bruto.

Analisando as Figuras 23, 24 e 25, percebe-se que entre 500 horas e 600 horas ocorre uma redução na produção de metano, indicando que o ensaio poderia ter sido encerrado com 26 dias.

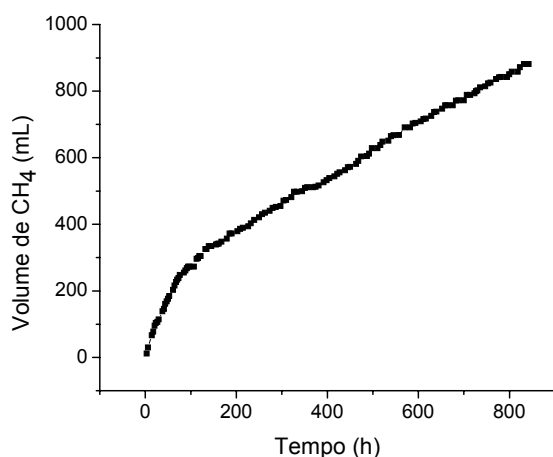


Figura 20. Produção de metano do efluente tratado com 0,10% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).

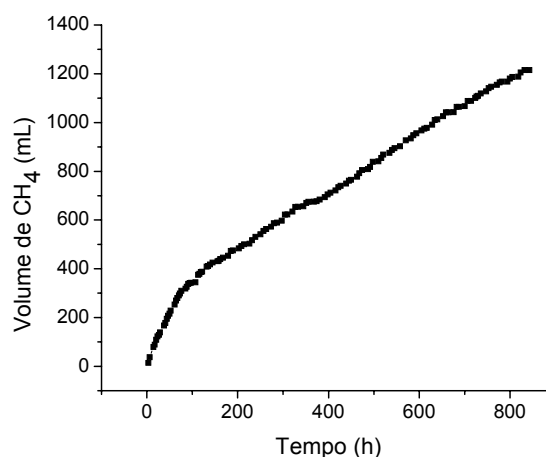


Figura 21. Produção de metano do efluente tratado com 0,15% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).

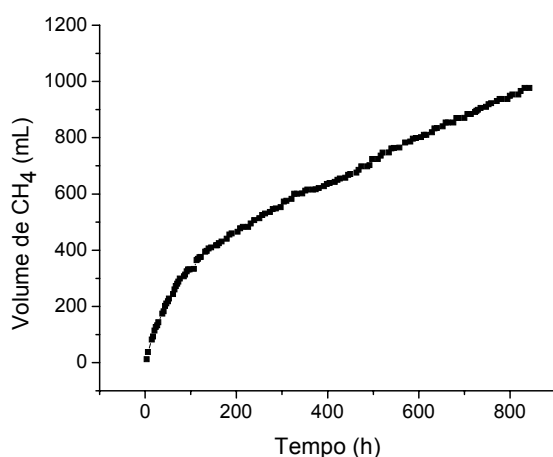


Figura 22. Produção de metano do efluente tratado com 0,20% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 34 dias).

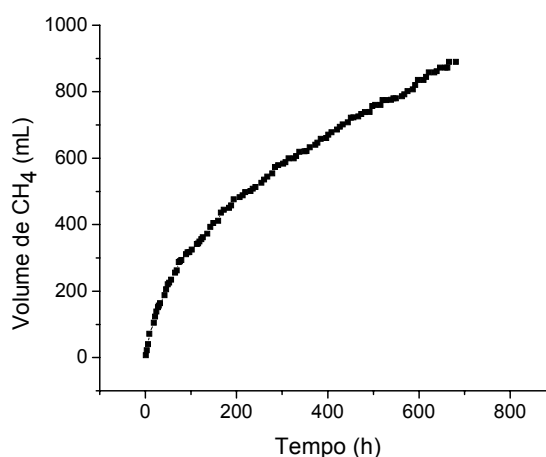


Figura 23. Produção de metano do efluente tratado com 0,25% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).

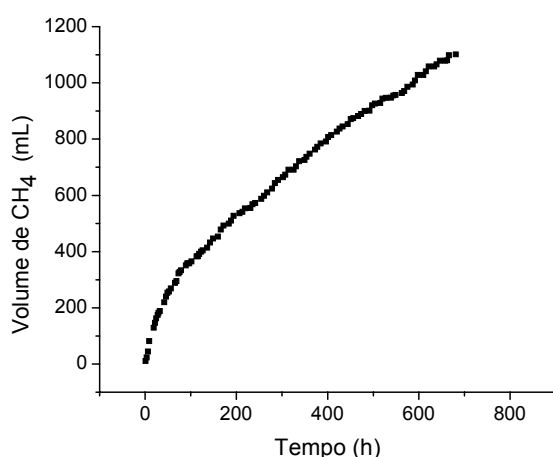


Figura 24. Produção de metano do efluente tratado com 0,30% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).

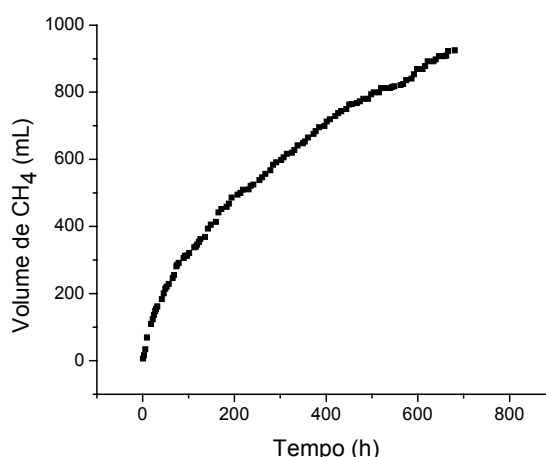


Figura 25. Produção de metano do efluente tratado com 0,35% (p/v) de enzima LNU (Agitação - 100 rpm, 35°C, 29 dias).

O tempo dos ensaios de biodegradabilidade para as concentrações de 0,10%; 0,15% e 0,20% (p/v) de enzima foi de 34 dias, enquanto que para as concentrações de 0,25%; 0,30% e 0,35% (p/v) de enzima foi de 29 dias. Esta diferença aconteceu, pois se esperou que ocorresse a estabilização da produção de metano nas concentrações de 0,10%; 0,15% e 0,20% (p/v) de enzima.

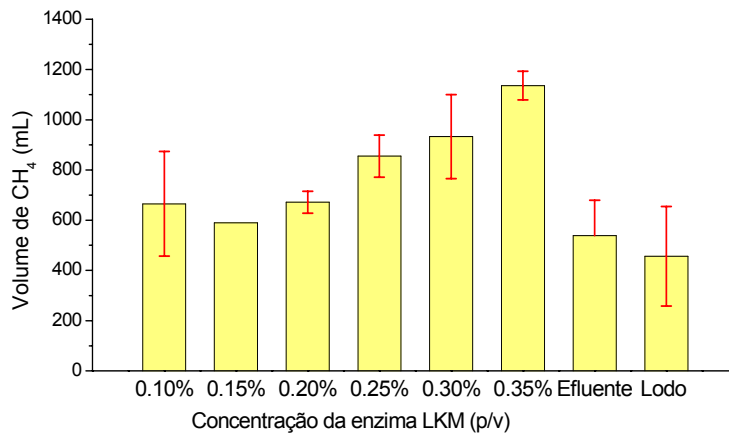
Problemas relacionados com a precipitação da enzima LNU ocorreram durante os ensaios de biodegradabilidade, como podemos observar na Figura 26. Supõe-se que esta precipitação pode ter influenciado negativamente a velocidade de produção de metano nas concentrações de 0,25%, 0,30% e 0,35%.



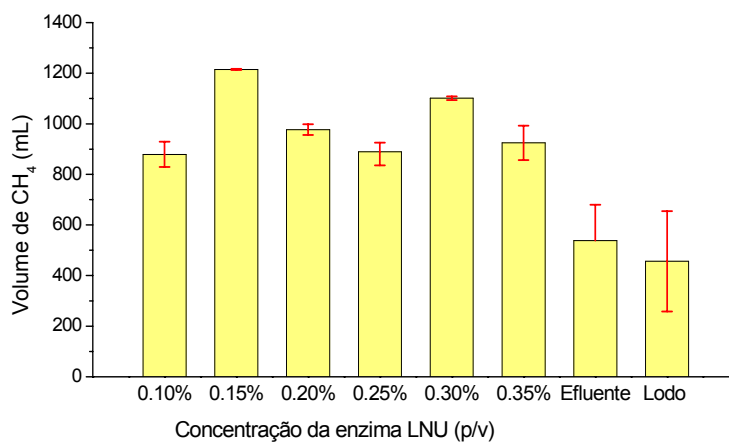
Figura 26. Enzima LNU precipitada durante os ensaios de biodegradabilidade.

A estabilização da produção de metano que pode ser melhor visualizada quando se utilizou a enzima LKM, segundo Isoldi et al. (2001) pode ser explicada pela redução da concentração de matéria orgânica contida no efluente e pelo decréscimo do pH do meio reacional, o que reduz a capacidade de formação de gás metano. As arqueas metanogênicas têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6.6 e 7.4 e as bactérias produtoras de ácidos orgânicos têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5.0 e 6.0, mas podem se mostrar ativas mesmo para valores de pH próximos a 4.5. Na prática, isso significa que a produção de ácidos em um reator pode continuar livremente, apesar da produção de metano ter sido interrompida devido aos baixos valores de pH.

A Figura 27 apresenta um resumo da produção de gás metano durante os ensaios de biodegradabilidade.



(a) Enzima LKM



(b) Enzima LNU

Figura 27. Volume de metano produzido pelas enzimas (a) LKM e (b) LNU nos ensaios de biodegradabilidade.

Analisando a Figura 27 observamos que as duas enzimas, LKM e LNU, não apresentaram uma variação considerável na produção de metano entre as concentrações de enzimas testadas, ou seja, não se pode afirmar que existe uma relação entre a concentração de enzima e a produção de metano. A baixa produção de metano da enzima LKM nas concentrações de 0,10%, 0,15% e 0,20% (p/v) pode estar relacionada com o fato de que o lodo empregado como inóculo nos ensaios ter sido uma amostra diferente daquela utilizada nos demais ensaios de biodegradabilidade.

Nos testes de biodegradabilidade anaeróbia de águas residuárias da indústria de abate de frango, realizados por Pereira (2004), foram utilizadas enzimas comerciais de fonte microbiana (*Cândida rugosa* - LCR) e de pâncreas de porco (LKM e LNU), no pré-tratamento (etapa de hidrólise) dessas águas residuárias, por um período de 12 horas, utilizando uma concentração de 0,4% (p/v) de enzima. O tempo dos ensaios de biodegradabilidade foi de 30 dias, a uma

temperatura de 35°C. A eficiência de formação de gás metano foi de 107 mL para o efluente bruto e com o pré-tratamento enzimático foram obtidos volumes finais de metano de 500 ± 29 mL, para a lipase LCR, 523 ± 7 mL, para a lipase LKM e 510 ± 22 mL para a lipase LNU. Os rendimentos de formação de gás metano, obtidos para os efluentes pré-tratados enzimaticamente foram aproximadamente 5 vezes superiores aos do efluente bruto. Esses resultados confirmam que a aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos, anterior à etapa de biodegradabilidade anaeróbia, é importante na remoção de compostos orgânicos presentes nessas águas.

Preparações de lipases pancreáticas de procedência nacional (pancreatina Kin Master – LKM) e importada (pancreática Sigma, Tipo II - LPP) foram utilizadas na hidrólise de lipídeos contidos no soro de queijo (MENDES & CASTRO, 2003). Diferentes condições experimentais foram testadas para verificar a influência da concentração do agente emulsificante, íons cálcio e ajuste de pH na formação de ácidos graxos e as preparações enzimáticas utilizadas obtiveram desempenhos bastante similares, resultando em porcentagem de hidrólise da ordem de 23%. A lipase de procedência nacional resultou em melhor relação custo/benefício, por ser três vezes mais barata que a importada.

Os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia do efluente bruto, proveniente da indústria de produtos lácteos, e pré-tratado enzimaticamente (hidrolisado), por Mendes (2004), que aplicou a lipase LNU no pré-tratamento, reduziram sensivelmente a concentração de matéria orgânica em termos de DQO. Sendo constatado para o efluente bruto uma redução de 45%, enquanto que para nas amostras hidrolisadas foram obtidas reduções superiores a 69%, atingindo níveis máximos de 80,9%, com o efluente pré-tratado por 24 horas. As condições aplicadas ao efluente pré-tratado enzimaticamente foram previamente estabelecidas: 5 mg.mL^{-1} de lipase, 10 mM de íons cálcio e ajuste de pH 8.0 com solução alcalinizante NaOH. É importante ressaltar a eficiência de remoção de DQO da ordem de 74,4% obtida no efluente bruto no teste realizado com as etapas de hidrólise e biodigestão simultâneas. Essa eficiência foi superior aos ensaios efetuados com efluentes pré-tratados nos tempos de hidrólise de 4 e 8 horas, isto é, 69,1 e 70,9 % de remoção de DQO, respectivamente.

5.3.4. Comportamento cinético dos testes de biodegradabilidade de efluente tratado com as enzimas LKM e LNU

Para garantir que os microrganismos cresçam – necessidade essencial no tratamento biológico – deve-se permitir que os mesmos permaneçam no sistema o tempo suficiente para que se reproduzam. O tempo requerido depende de sua velocidade de crescimento, a qual é relacionada diretamente com a velocidade de metabolismo ou utilização do substrato. Desta maneira, supondo que as condições são controladas adequadamente, pode-se assegurar a estabilização efetiva da água residuária (degradação do substrato), ao se controlar a velocidade de crescimento dos microrganismos (CRITES & TCHOBANOGLOUS, 2000 apud MENDONÇA, 2002).

A biodegradabilidade do efluente pode ser relacionada aos valores dos parâmetros cinéticos, desde que as mesmas condições experimentais sejam mantidas. Assim, quanto maior for o valor da velocidade inicial de produção de metano, mais biodegradável será o substrato.

Desta forma, a Figura 28 mostra as velocidades médias de produção de metano dos ensaios com o lodo e com o efluente bruto. Para o lodo obteve-se uma velocidade inicial de $3,8100 \text{ mL.h}^{-1}$, este valor decaiu para $0,5634 \text{ mL.h}^{-1}$ bruscamente e permanece constante durante todo o ensaio. Enquanto que o efluente bruto teve uma velocidade inicial de $0,8205 \text{ mL.h}^{-1}$, diminuindo para $0,2157 \text{ mL.h}^{-1}$ e permanecendo praticamente constante até o final do teste.

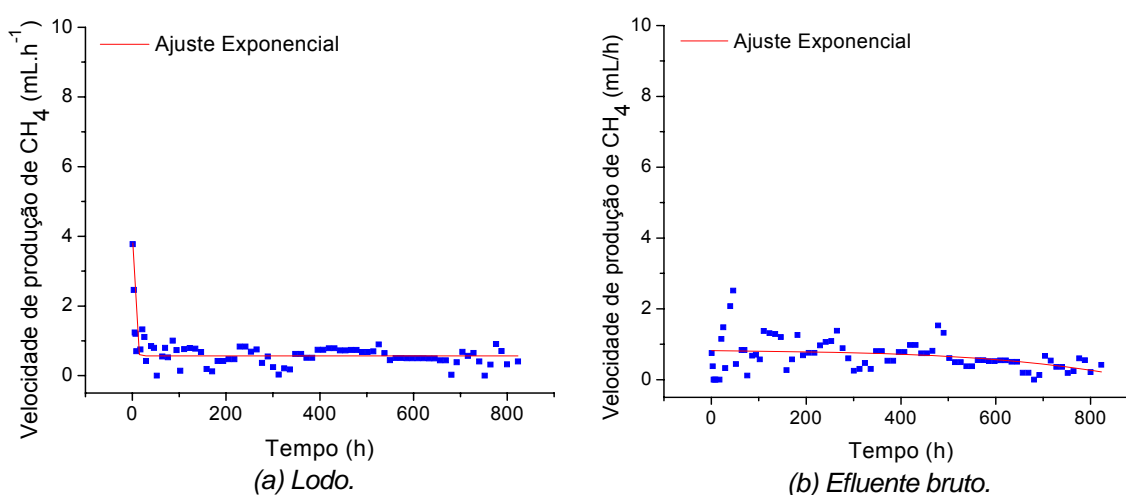
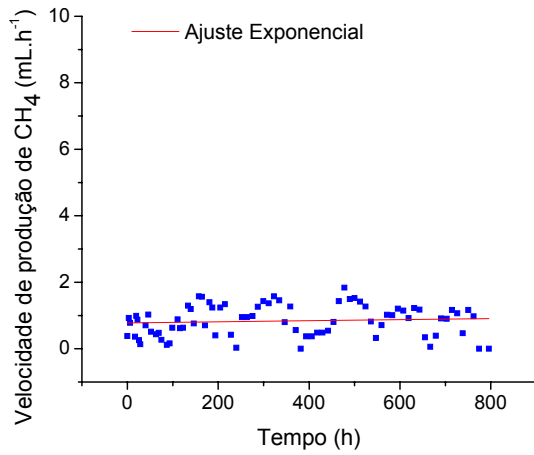
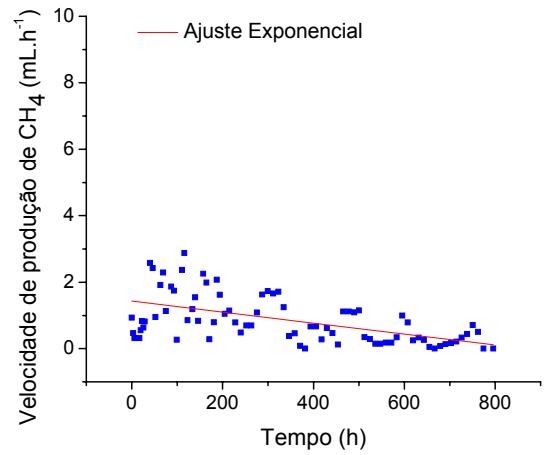


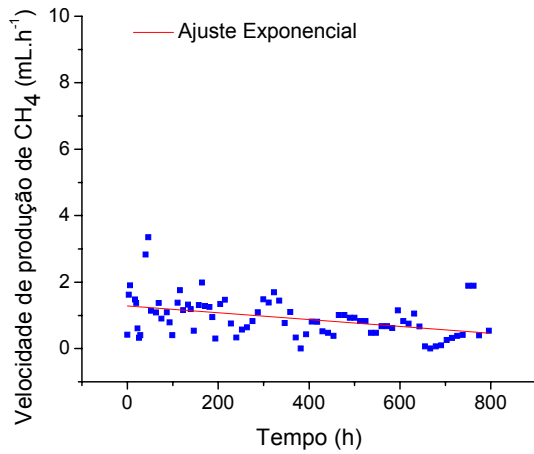
Figura 28. Velocidade média de produção de metano (a) Lodo (b) Efluente bruto.



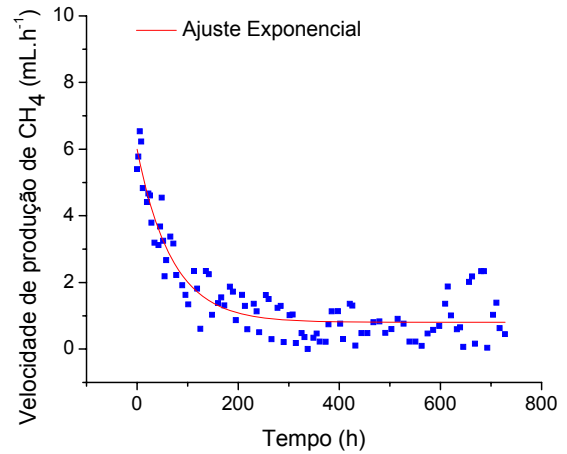
(a) 0,10% (p/v) de lipase.



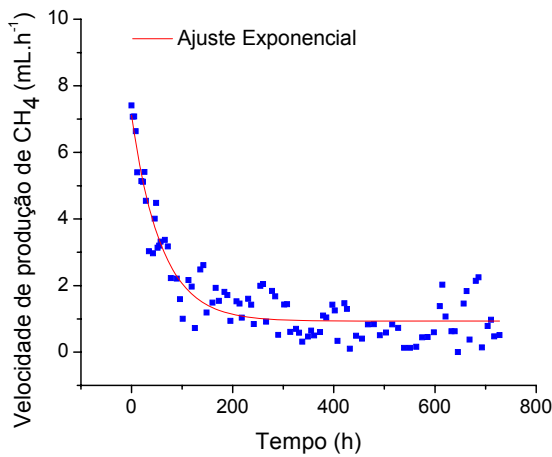
(b) 0,15% (p/v) de lipase.



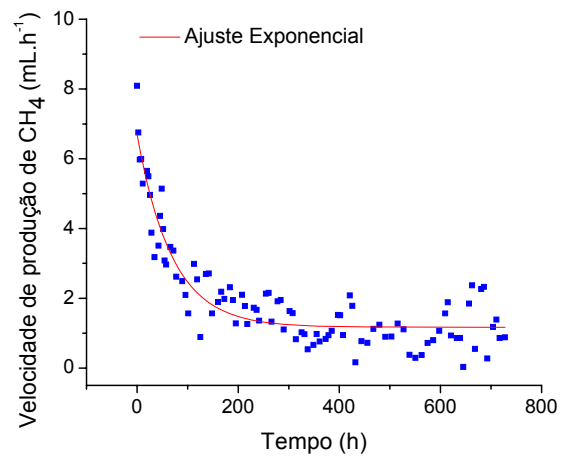
(c) 0,20% (p/v) de lipase.



(d) 0,25% (p/v) de lipase.



(e) 0,30% (p/v) de lipase.



(f) 0,35% (p/v) de lipase.

Figura 29. Representação do perfil cinético dos testes de biodegradabilidade utilizando a enzima LKM.

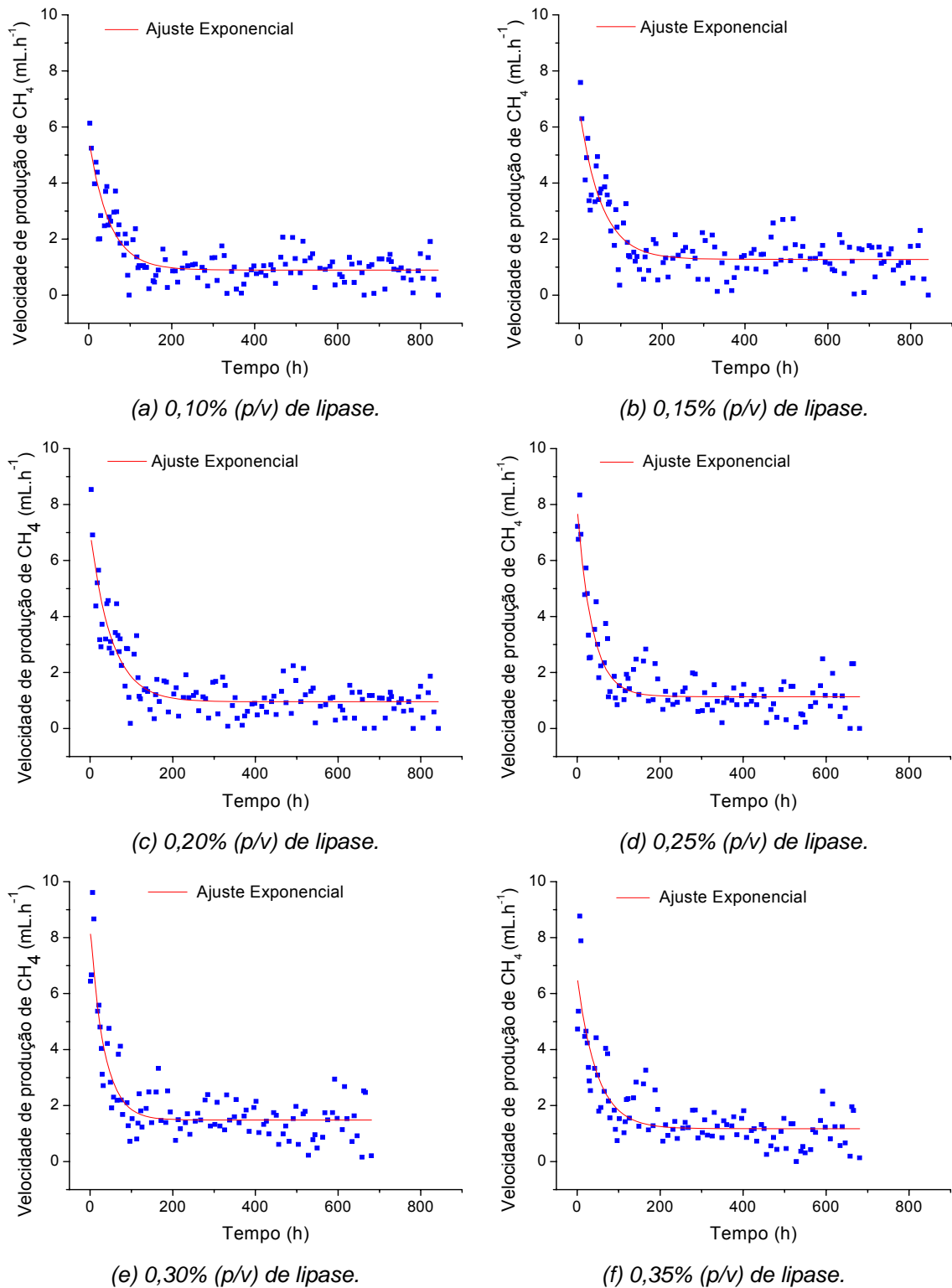


Figura 30. Representação do perfil cinético dos testes de biodegradabilidade utilizando a enzima LNU.

Analisando a Tabela 11 e as Figuras 29 e 30 podem-se perceber fases distintas no perfil cinético de produção de metano. Durante as primeiras 100 horas, nota-se que a velocidade de produção de metano nos ensaios com tratamento enzimático é nitidamente superior, comparada ao ensaio onde é utilizado apenas o efluente bruto. A velocidade inicial de produção de metano chega a ser em média 5 vezes superior que a velocidade utilizando-se somente efluente bruto. Também se observa que no decorrer das primeiras 100 horas do experimento, a velocidade de biodegradação decresce exponencialmente, indicando que a enzima está sofrendo um processo inibitório ou perdendo atividade. Após este período, a velocidade de produção de metano é praticamente constante e da mesma ordem de grandeza da velocidade observada para o efluente bruto, sugerindo que a enzima não está mais atuando.

Tabela 11. Velocidades iniciais de produção de metano.

Concentração de lipase (p/v)	Velocidades iniciais de produção de metano (mL.h ⁻¹)	
	LKM	LNU
0,10%	0,7789	5,3152
0,15%	1,4292	6,3522
0,20%	1,2817	6,7218
0,25%	6,0005	7,6600
0,30%	7,1130	8,1296
0,35%	6,6982	6,4649

Mais uma vez podemos perceber o quanto o lodo utilizado como inóculo interfere na degradação do substrato, quando trocamos de inóculo a produção de metano aumentou e conseqüentemente as velocidades de degradação do substrato também aumentaram.

5.3.5. Análises para avaliar o efeito do tratamento enzimático

No início e no final dos testes de biodegradabilidade foram realizadas medidas de pH e analisados ácidos graxos livres, glicerol e DQO, a fim de avaliar o tratamento anaeróbio e enzimático.

5.3.5.1 pH

Na Tabela 12 podemos acompanhar a variação do pH entre o início e o fim dos testes de biodegradabilidade. Analisando os dados do pH, constata-se que os

resíduos apresentaram valores de pH variando de 6.8 a 7.6 quanto tratados com as enzimas LKM e LNU, ou seja, não houve uma considerável alteração se compararmos com o valor do pH do efluente bruto que esteve entre 6.9 e 7.4.

A metanogênese é extremamente sensível às variações do pH. Assim, para garantir a presença satisfatória de bactérias metanogênicas, esse parâmetro deve ser mantido entre um mínimo de 6.0 e um máximo de 8.0. Extrapolando esses limites do pH, formam-se compostos que se mostram tóxicos para as bactérias formadoras do gás metano. É importante salientar que neste trabalho não foi adotada nenhuma medida para correção do pH.

Obladen e Aisse (1983 apud CETESB, 2003) afirmam que o pH ótimo para a fermentação metânica está entre 7.0 e 8.0, mas as metanobactérias não são prejudicadas se o pH diminui para 6.0. O valor do pH pode cair quando: inicia-se o processo; houver a afluência de cargas de choque; houver flutuação de temperatura ou houver a presença de materiais inibidores. Em certas condições pode-se tornar conveniente a adição de álcalis ou bicarbonato de sódio para ajuste de pH, pois se o biodigestor ficar sobrecarregado, haverá formação de ácidos em excesso e o pH baixará.

Tabela 12. Medidas de pH.

Concentração de lipase (p/v)	pH			
	LKM		LNU	
	0 Dia	30 Dias	0 Dia	30 Dias
0,10%	7.29	7.21	7.69	6.96
0,15%	7.55	7.27	7.55	6.96
0,20%	7.44	7.14	6.90	7.01
0,25%	7.60	7.35	6.97	7.27
0,30%	7.40	7.45	6.92	7.34
0,35%	6.89	7.48	6.91	7.38
	0 Dia		30 Dias	
Lodo	8.20		8.35	
Efluente bruto	6.97		7.49	

Pereira (2004) estudou os efeitos provocados pelo ajuste de pH na etapa de hidrólise utilizando a enzima LKM. Através de análises estatísticas o autor concluiu que o ajuste do pH do meio adicionando bicarbonato de sódio teve um efeito negativo, mas o contrário ocorreu quando se utilizou uma solução de

hidróxido de sódio, sugerindo uma influência marcante na hidrólise do efluente pela ação da LKM do tipo de solução alcalinizante usada para o ajuste do pH do meio reacional. Nessas condições, o autor conseguiu uma redução de teor total de gordura da ordem de 57,14%.

5.3.5.2 Ácidos graxos livres e glicerol

O comportamento da concentração de ácidos graxos livres e as velocidades de formação de metano são mostrados na Figura 31 e detalhados no Apêndice F.1.

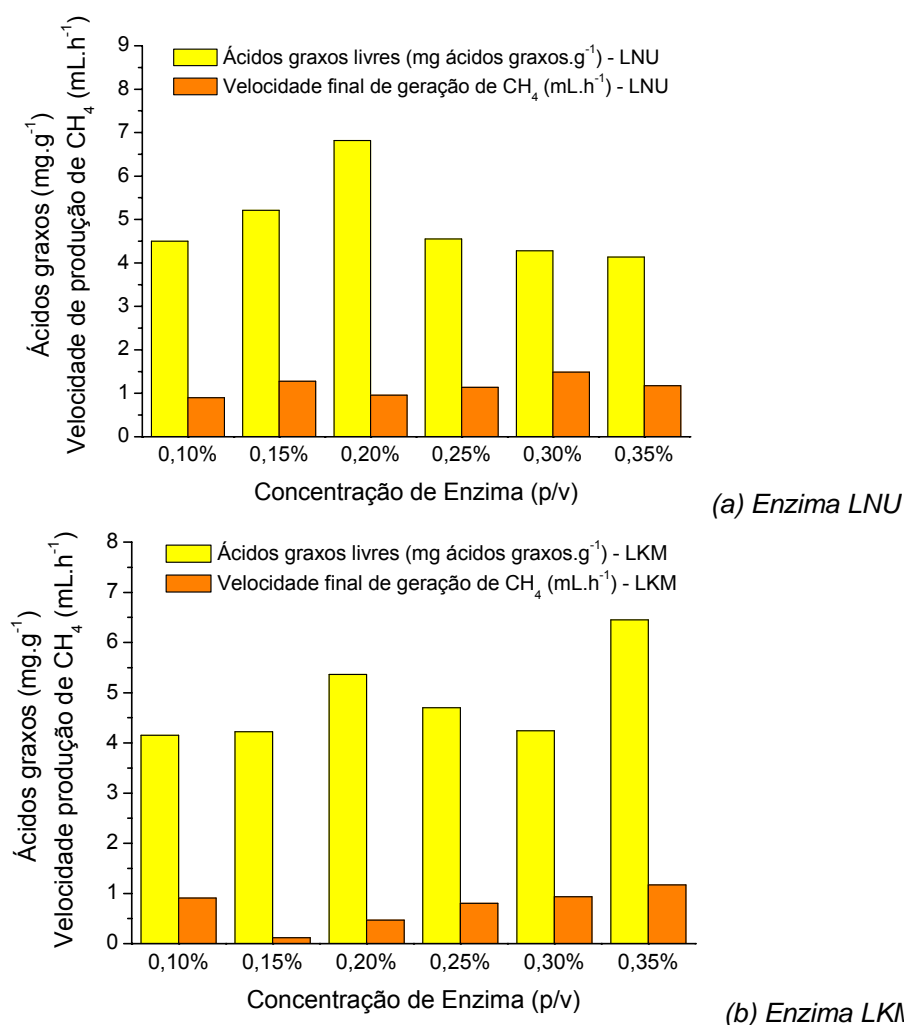
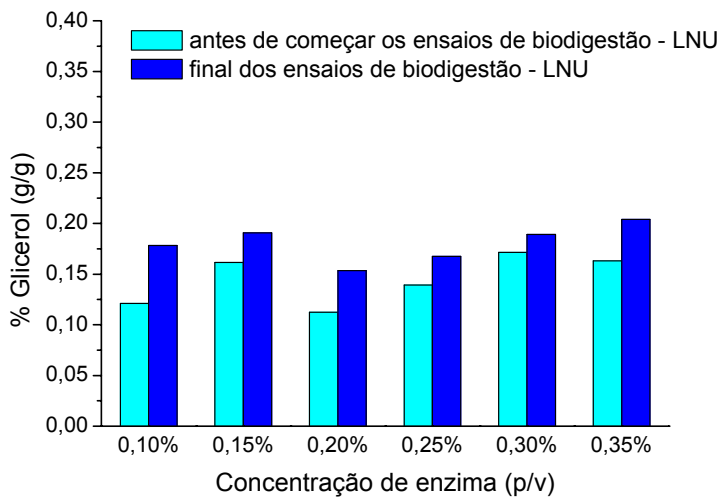


Figura 31. Concentração de ácidos graxos livres ao final dos ensaios de biodegradabilidade e velocidade final de geração de metano para as lipases LNU (a) e LKM (b).

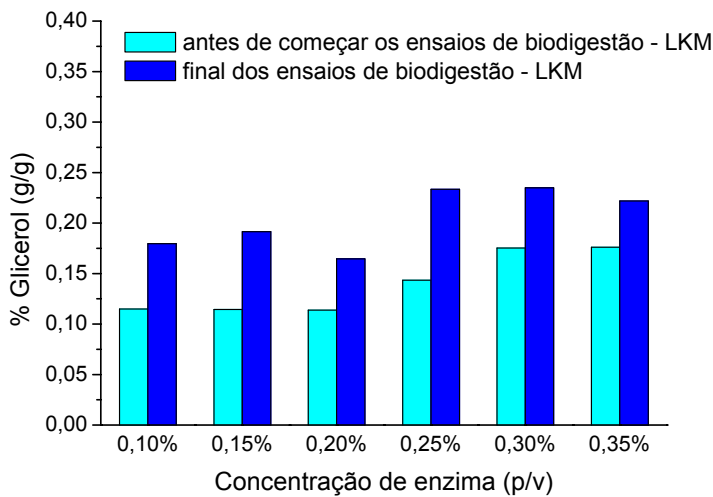
Analisando a Figura 31 podemos dizer que a concentração de ácidos graxos livres é praticamente constante ao final dos experimentos e independe da

concentração de enzima. Como no final dos ensaios de biodegradabilidade ainda há geração de metano, indicando consumo de ácidos, também deve haver a geração destes ácidos, a velocidades semelhantes. Assim, conclui-se que a concentração de enzima não interfere na velocidade de formação dos ácidos graxos livres.

Os resultados obtidos com relação à quantidade de glicerol são apresentados na Figura 32 e detalhados no Apêndice F.2.



(a) Enzima LNU



(b) Enzima LKM

Figura 32. Quantidade de glicerol antes do início e ao final dos ensaios de biodegradabilidade para as lipases LNU (a) e LKM (b).

O acúmulo de glicerol, apesar de o glicerol estar sendo consumido, indica que a hidrólise está sendo realizada. A velocidade de consumo do glicerol é inferior a sua velocidade de geração e isso faz com que haja o acúmulo de glicerol.

Sabemos que a reação de hidrólise de óleos e gorduras gera três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol. Através dos resultados obtidos podemos dizer que os ácidos graxos são consumidos mais facilmente que o glicerol.

5.3.5.3 DQO

O principal parâmetro para avaliar se um tratamento foi eficiente ou não é a eficiência da remoção de matéria orgânica, que neste trabalho foi quantificada em termos de DQO. Para os testes realizados com o lodo e o efluente bruto, obteve-se uma remoção de 38,04% e 31,57%, respectivamente. Podemos observar, através dos resultados apresentados na Tabela 13, que o uso de enzimas no tratamento de efluentes com altos teores de lipídios é bastante eficiente em termos de remoção de DQO (Apêndice F.3).

Tabela 13. Eficiência de remoção de DQO.

Concentração de lipase (p/v)	Eficiência de remoção de DQO (%)	
	LKM	LNU
0,10%	59,96	88,46
0,15%	79,55	91,92
0,20%	61,33	88,16
0,25%	69,66	88,67
0,30%	82,65	92,03
0,35%	83,21	95,02
Lodo	38,04	
Efluente bruto	31,57	

A lipase LKM apresentou um aumento em média de 2,3 vezes na remoção de DQO, enquanto que com a enzima LNU obteve-se um aumento de 2,86 vezes, quando comparado com a remoção obtida no ensaio como o efluente bruto. Esta maior eficiência da enzima LNU pode ser evidenciada também pelos altos volumes de metano produzido durante os testes de biodegradabilidade.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho não foi utilizado nenhum tipo de suplementação de agentes emulsificantes ou de compostos iônicos para o incremento da atividade das lipases LKM e LNU, e as etapas de hidrólise e biodigestão foram realizadas

simultaneamente.

Esta nova forma de implementar o tratamento enzimático em efluentes com elevados teores de gordura faz com que este tipo de tratamento em escala industrial seja menos dispendioso.

O fato de que as enzimas utilizadas apresentam grau de pureza limitado e de ambas serem produzidas por empresas nacionais torna o processo ainda mais atraente.

A produção de biogás realizando as etapas de hidrólise e biodigestão foi superior quando comparada com os trabalhos realizados por Pereira (2004), que obteve de 523 mL \pm 7 mL para a LKM e 510 mL \pm 22 mL para a LNU de metano, utilizando uma concentração de 0,4% (p/v) de enzima. Em outro trabalho, Mendes (2004), conseguiu um volume de 445 mL \pm 29 mL de metano para uma hidrólise de 12 horas e 437 mL de metano para uma hidrólise de 24 horas. É importante salientar que estes autores realizaram as etapas de hidrólise e biodigestão de maneira seqüencial. O aproveitamento deste biogás como insumo energético é uma opção para uma redução de custos.

6 Conclusão

O objetivo principal deste trabalho foi estudar remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias avícolas utilizando lipases pancreáticas em diferentes concentrações. Da análise e discussão dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O substrato interfere nas propriedades catalíticas das lipases. Quando é utilizado o azeite de oliva como substrato, a atividade máxima da enzima está acima de 3000 U.mg⁻¹ (3320 U.mg⁻¹ para a lipase LKM e 3913 U.mg⁻¹ para a lipase LNU). Quando se utiliza o efluente bruto da indústria avícola como substrato, a atividade máxima da enzima cai para valores abaixo de 700 U.mg⁻¹ (680 U.mg⁻¹ para a lipase LNU e 580 U.mg⁻¹ para a lipase LKM), indicando que o efluente exerce algum tipo de inibição na reação enzimática.
- Quando se utiliza o azeite de oliva como substrato, a temperatura que maximiza a atividade da enzima é em torno de 37°C, para as duas enzimas estudadas (LKM e LNU). Utilizando o efluente bruto como substrato, a temperatura ótima para a atividade é a mesma para a enzima LKM, enquanto que para a enzima LNU o valor foi deslocado para 45°C. Na faixa de pH entre 7.0 e 8.0 a atividade das lipases, LKM e LNU, é maximizada.
- A realização dos ensaios de biodegradabilidade e hidrólise simultaneamente foi possível. Analisando os resultados em termos de produção de metano, podemos dizer que a lipase LNU teve uma produção ligeiramente maior, com um volume de 1252 mL de metano, enquanto que a lipase LKM apresentou um volume máximo 1138 mL de metano. Os volumes encontrados foram superiores aos volumes encontrados nos

trabalhos da literatura que realizaram o tratamento de águas residuárias com elevados teores de gordura de maneira seqüencial, ou seja, primeiro a hidrólise enzimática das gorduras seguida de um tratamento anaeróbio.

- Em relação ao comportamento cinético dos ensaios de biodegradabilidade as lipases LKM e LNU tiveram um perfil parecido, com velocidades iniciais maiores, e a partir de certo tempo de ensaio estas velocidades ficaram constantes até o final do experimento. As velocidades constantes foram verificadas na maior parte dos experimentos, variando de 0,11 mL.h⁻¹ a 1,4 mL.h⁻¹.
- Maiores eficiências de remoção de matéria orgânica foram observadas quando se utilizou a enzima LNU, alcançando um valor máximo de 95% enquanto que a LKM obteve uma remoção máxima de 83%. As lipases LKM e LNU apresentaram um aumento em média de 2,3 e 2,86 vezes, respectivamente, na remoção de DQO quando comparado com a remoção obtida no ensaio com o efluente bruto sem tratamento enzimático, que foi de 32%.
- A concentração de ácidos graxos livres no final dos ensaios de biodegradabilidade foi praticamente constante, em média 4,8 g ácidos graxos/g amostra, para as duas lipases. Houve um acúmulo na quantidade de glicerol, indicando que a hidrólise estava acontecendo e que velocidade de consumo de glicerol é menor que a velocidade de consumo dos ácidos graxos para a formação do metano.
- Dentro da faixa estudada de concentrações de enzimas (0,10% p/v a 0,35% p/v), não foi possível observar variação consistente da velocidade de biodegradação, indicando que a concentração de enzima não interfere significativamente na velocidade de remoção da matéria orgânica. Essa informação é interessante, pois pode-se seguir os estudos diminuindo a concentração de enzimas, promovendo a redução do custo do processo.

7 Sugestões

Para dar continuidade aos estudos que envolvem o tratamento enzimático e anaeróbio de efluentes com elevados teores de gordura provenientes da indústria frigorífica avícola, sugere-se:

- Testar concentrações menores de enzimas, a fim de verificar qual a concentração de enzima que irá interferir de maneira negativa no tratamento anaeróbio deste tipo de água residuária;
- Realizar um estudo para verificar qual a substância que está diminuindo a atividade da enzima quando se utiliza o efluente como substrato;
- Testar enzimas imobilizadas;
- Acompanhar a cinética de biodegradação, através da retirada e análise de amostras e adição de enzima ao longo dos ensaios de biodegradabilidade, a fim de estudar a possibilidade de redução do tempo de tratamento deste tipo de água residuária.
- Estudar a possibilidade de desenvolver em laboratório um lodo em condições padrão, com a finalidade de aperfeiçoar o tratamento anaeróbio.

8 Referências Bibliográficas

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

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

APHA; AWWA; WPCF. (1995). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th edition, New York.

AVISITE. 2005: ano de avaliação da maturidade do setor. 2005. Disponível em "www.avisite.com.br/economia/default.asp". Acesso em: 10/11/2005.

BATISTA, L.F. (1981). Manual Técnico Construção e Operação de Biodigestores. Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural, Brasília, CDU 620.97 (20). 54 p.

BON, E. P. S. & PEREIRA JR., N. (1999). Tecnologia Enzimática, Editado pelo Enzitec. 113p.

CAIL, R. G.; BARFORD, J. P.; LICHACZ, R. (1986). Anaerobic digestion of wool scouring wastewater in a digester operated semi-continuously for biomass retention. *Agricultural Wastes*, v.18, n.1, p.27-38.

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

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; D'ADDIO NOFFS, M.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156.

CETESB (2003). Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental & SMA-SP –

- Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Relatório técnico n. 2 do convênio SMA/MCT n. 01.0053.00/2001 – Efluentes. Disponível em www.mct.gov.br/CLIMA/brasil/pdf/Efluente_preliminar.pdf. Acesso em: 20/11/2005.
- CHAMPE, P. C. & HARVEY, R. A. (1997). Bioquímica ilustrada, 2ªed. Artes Médicas, Porto Alegre. p. 53-92 e p. 177-192.
- CHERNICHARO, C.A.L. (1997). Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, Reatores Anaeróbios. Belo Horizonte. SEGRAC. 246p.
- COKS, L. V. & VAN REDE, C. (1966). In: Laboratory handbook for oils and fats analysis, 1st ed., Academy Press, London.
- CRITES, R. & TCHOBANOGLIOUS, G. (2000). Tratamiento de águas residuales em pequenas poblaciones. McGraw-Hill, 776p., Bogotá, Colômbia.
- DUEHOLM, T.E.; ANDREASEN, K.H.; NIELSEN, P.H. (2001). Transformation of lipids in activate sludge. *Water Science and Technology*, v. 73, n. 1, p. 165-172.
- FABER, K. (2000). Biotransformations in Organic Chemistry. Springer -Verlag, New York.
- GANDHI, N. N. (1997). Applications of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, n.6, p. 621-634.
- GAVALA, H.N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I.V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. (1999). Treatment of dairy wastewater using na upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Agricultural Engineering Research*, v. 73, p. 59-63.
- GLAZER, A.N. & NIKAIDO, H. (1995). Environmental applications. In: *Microbial Biotechnology*. Eds. W. H. Freeman & Co. N. York, p. 561-620.
- GROSS, R. (1996). Hidrólise enzimática de gorduras de origem animal. *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC, 63p.
- HANAKI, K.; MATSUO, T.; NAGASE, M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p.1591-1610.
- HARALDSSON, G. G. (1991). The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. *Marine Lipids Biotechnology*, cap. 7, p. 337-352.
- HAWKES, F.R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G.K. (1995). Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Water Research*, v. 29, n. 2, p. 525-533.
- HIRATA, Y. S. (1999). Coleta, preservação e caracterização de efluentes. In: IV Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis/SC. CBAB, MCT/ CNPq, CPGENQ/UFSC, CDB.

- HORWITZ, W., (ed) (1980). Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13 th edn., *Association of Official Analytical Chemists*, p. 504-508, 519-520.
- HU, W.C.; THAYANITHY, J.B.; FOSTER, C.F. (2002). A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. *Process Biochemistry*, v.37, p.965-971.
- HWU, C. S.; TSENG, S. K.; YUAN, C. Y.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. (1998). Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*, v. 32, n. 5, p.1571-1579.
- ICEPA. Agroindicador – Indicadores para a agricultura Catarinense. 2005. Disponível em “www.icepa.com.br”. Acesso em: 28/11/2005.
- ISOLDI, L. A.; KOETZ, P. R.; FARIA, O. L. V.; ISOLDI, L. A. (2001). Parâmetros de operação do reator UASB em um sistema combinado reator UASB - reator aeróbio. *Revista Eletrônica do Mestrado em Engenharia Ambiental*, v. 6, p. 16-30.
- JAEGER, K. E. & REETZ, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v.16, n.9, p.396-403.
- JAEGER, K.E; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVELM, M. O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, p. 29-63.
- JUNG, J.; XING, X.H.; MATSUMOTO, K. (2002). Recoverability of protease released from disrupted excess sludge and its potential application to enhanced hydrolysis of proteins in wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 10, n. 1, p. 67-72.
- KATZ, L.; MARCIN, C.; ZITANO, L. *et al.*, (1993). Screening and selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of Verlukast. *Journal Ind. Microbial*, v. 11, p. 89-94.
- KIELING, D.D. (2004). Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas. *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC, 106p.
- KOMATSU, T.; HANAKI, K.; MATSUO, T. (1991). Prevention of lipid inhibition in anaerobic process by introducing a two-phase system. *Water Science and Technology*, v. 23, p.1189-1200.
- LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR., G. L. (2002). Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, n.2, p.175-180.
- LEAL, M.C.M.R. (2000). Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 111p.
- LEE, K.T. & FOGLIA, T.A. (2000). Fractionation of chicken fat triacylglycerols:

synthesis of structured lipids with immobilized lipases. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 5, p. 826-831.

LEITE, V.D.; LOPES, W.S.; SOUSA, J.T.; PRASAD, S. (2004). Tratamento anaeróbico de resíduos orgânicos com baixa concentração de sólidos. *Nota Técnica*, v. 9, n. 4, p. 280-284.

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

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

MACÊDO, G.A. (1997). Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico. *Tese Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo, SP, Brasil. 143p.

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

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

MENDES, A.A. (2004). Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas hidrolíticas. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil. 135p.

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

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR, A. (2005). Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 296-305.

MENDONÇA, L.C. (2002). Microbiologia e cinética de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbico de leito expandido. *Tese de Doutorado*, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 219p.

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

MORAES, L.M. (2000). Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de dejetos oriundos de atividades zootécnicas. *Dissertação Mestrado*. Universidade Estadual

de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, SP, 112p.

MORETTO, E. & FETT, R. (1998) Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo Varela 153p. ISBN 858551941X : (broch.)

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

NASCIMENTO, M.G.; DALLA-VECCHIA, R.; SOLDI, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630.

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

NOVOZYMES LATIN AMERICA LTDA. Mercado mundial de enzimas. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <adrg@novozymes.com > 29/12/05.

OBLADEN N.L. & AISSE M.M. (1983). A energia das Biomassas – Biodigestão. 12º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Balneário Camboriú/SC.

OLIVEIRA, C.; MULLER, F.; SEGATO, M. Aplicações de enzimas em produtos de limpeza. 2004. Disponível em "www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/detergentes/enzimas_produtos_limpeza.htm". Acesso em: 25/10/2005.

PAQUES, F.W. & MACEDO, G.A. (2006). Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, n.1, p. 93-99.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; FURIGO JR, A. (2003). Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola empregando lipase de *Candida rugosa*. In: Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC.

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

PEREIRA, E.B., FURIGO, A.JR. Cinética enzimática. 2001. Disponível em "http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq.htm". Acesso em: 30/07/2005.

PEREIRA, E.B. (2004). Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 154p.

PETRUY, R. & LETTINGA, G. (1997). Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource*

Technology, v. 61, p. 141-149.

QUÉMÉNUER, M. & MARTY, Y. (1994). Fatty acids and sterols in domestic wastewater. *Water Research*, v.28, p.1217-1226.

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

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

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

SANTANA, F.B (2002). Tratamento anaeróbio de águas residuárias da indústria de couro. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 102p.

SANTOS, R. (2003). Imobilização de lipases em gel de Pectina. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Regional de Blumenau, UFSC/FURB, Florianópolis/Blumenau, SC, Brasil, 77p.

SANTOS, T.M. Lipídeos. 2005. Disponível em "<http://geocities.yahoo.com.br/anutrição/lipídios.htm>". Acesso em: 8/10/2005.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. (2003). Purification strategies for microbial. *Journal of Microbiological Methods*, v. 52, p. 1-18.

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R. *et al.*, (1999). Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, v. 77, p. 101-115.

SCARASSATI, D.; CARVALHO, R.F.; DELGADO, V.L.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; TONSO, S.; SOBRINHO, G.D.; PELEGRINI, R. (2003). Tratamento de efluentes de matadouros e frigoríficos. III Fórum de estudos contábeis. Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

SCRIBAN, R. (1985). *Biotecnologia*. Editora Malone Ltda., São Paulo, Brasil, 489p.

SHAHANI, K. M. (1975). Lipases and Esterases, In: REED, Gerald (Ed), *Enzymes in Food Processing*, 2° ed., New York: Academic Press, p. 182-214.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology advances*, v.19, p. 627-662.

SINGHAL, R. S. & KULKARNI, P. R. (1990). Effect of puffing on oil characteristics of *Anaranth* (Rajgeera) seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.67, n. 12, p. 952-954.

- SOARES, H. M. & HIRATA, Y. S. (1999). Práticas de laboratório. In: IV Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis/SC. CBAB, MCT/ CNPq, CPGENQ/UFSC, CDB, 23p.
- SOARES, H. M. & ZAIAT, M. (2005). Processos anaeróbios de tratamento de matéria orgânica. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis/SC. Projeto PROSUL/CNPq – UFSC/UDELAR/UNLP, cap. V.2, 37p.
- SPEECE, R.E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater. Archae Press, 396p.
- SROKA, A.; KAMINSKI, W.; BOHDZIEWICZ, J. (2004). Biological treatment of meat industry wastewater. *Desalination* 162, p. 85-91.
- SWITZENBAUM, M.S. (1995). Obstacles in the implementation of anaerobic treatment technology. *Bioresource Technology*, v. 3, n. 3, 255p.
- TATARA, T.; FUJI, T.; KAWASE, T. *et al.*, (1985). Studies applications of lipolytic enzymes in detergency. II – Evaluation adaptability of various kinds of lipases in practical laundry conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.62, p. 1053-1058.
- TEIXEIRA, G. A. (2001). Tratamento seqüencial de efluentes da indústria de laticínios: Hidrólise de gorduras e tratamento biológico. *Dissertação de Mestrado*, COOPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 106p.
- VAZOLLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável. Microbiologia e Saneamento ambiental. In: Biodiversidade: percepções e oportunidades tecnológicas. 1996. Disponível em "<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/3>". Acesso em: 26/09/2005.
- VEERARAGAVAN, K. (1990). A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 186, p. 301-305.
- VICENZI, R. (2004). Biotecnologia de Alimentos. Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS, UNIJUI, 101p. Disponível em "www.sinprors.org.br/paginasPessoais/arquivos/Prof_394/APOSTILA%20BIOTECNOLOGIA%20DE%20ALIMENTOS.pdf". Acesso em: 30/08/2005.
- VIEIRA, S.M.M. & SOUZA, M. E. (1981). Métodos analíticos para o acompanhamento da biodigestão. CETESB – Superintendência de Pesquisa, v. III.
- VOGEL, A.I. (1981). Análise Inorgânica Quantitativa. 4ª edição, Editora Guanabara. Rio de Janeiro, RJ.
- VULFSON, E.N. (1994). Industrial applications of lipases. In: Woolley, P.; Petersen, S.B. (eds) Lipase: Their Structure, Biochemistry and Application, *Cambridge University Press*, Great Britain, p. 271-288.
- WENG, C. -N. & JERIS, J. S. (1976). Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Research*, v. 10, p. 9-18.

ZANOTTO, S.P. (2003). Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos óticamente ativos. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 123p.

Apêndices

APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA MACEDO KOERICH S/A – SC

Parâmetros analisados	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Amônia (mgNH ₃ .L ⁻¹)	79.29	19.82	54.10	43	39.55
pH	6.35	6.63	6.63	7.11	7.54
Sólido sedimentável (mL.L ⁻¹)	26	0.10	0,40	<0.10	<0.10
Óleos e graxas (mg.L ⁻¹)	2005	48.75	67.40	46.25	26.37
Sólido total (mg.L ⁻¹)	8390	131	174	119	104
Sólido total volátil (mg.L ⁻¹)	8052	67	71	67.5	66
Sólido suspenso total (mg.L ⁻¹)	1966	80	87	85	63
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	6720	402	352.91	304.87	248
DBO ₅ (mg O ₂ .L ⁻¹)	4434	374.46	310.80	250.56	169.48
DBO ₅ solúvel (mg O ₂ .L ⁻¹)	1587	337.29	301.82	203.40	70.50
Nitrogênio total (mg N ₂ .L ⁻¹)	92.35	20.67	55.43	50.33	32.87
Fósforo total (mg PO ₄ .L ⁻¹)	8.64	2.02	1.98	1.51	1.20

Observações: Amostra 1 - Entrada do Tanque de Equalização

Amostra 2 - Saída do Flotador

Amostra 3 - Saída da 2ª Lagoa

Amostra 4 - Saída da 3ª Lagoa

Amostra 5 - Saída para o rio após a cloração

Fonte: Indústria Macedo Koerich S/A - SC, 2005.

APÊNDICE B - PADRÕES DE EMISSÃO DE ELFUENTES LÍQUIDOS DA LEGISLAÇÃO AMBIENTAL DO ESTADO DE SANTA CATARINA

Parâmetros	Limite máximo permitido
pH	6.0 - 9.0
Sólido sedimentável (mL.L ⁻¹)	1,0
Óleos minerais (mg.L ⁻¹)	Até 20
Óleos vegetais e gorduras animais (mg.L ⁻¹)	Até 30
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	72
DBO ₅ 20°C (mg.L ⁻¹)	60
Nitrogênio total (mg N ₂ .L ⁻¹)	10
Fósforo total (mg PO ₄ .L ⁻¹)	1,0

Fonte: Legislação Ambiental Básica do Estado de Santa Catarina de maio de 1995, Lei N° 5.795, Decreto N° 14.250, que dispõe de padrões de emissão de efluentes líquidos no Art. 19°.

APÊNDICE C - FICHA TÉCNICA DA LIPASE PANCREÁTICA KIN MASTER

FICHA TÉCNICA – FT/PAN05
Revisão 01

Pág.1/3

PANCREATINA 3NF

Código: 50.1003.01-OR

Pancreatina é uma substância obtida a partir do pâncreas suíno, que contém importantes quantidades de enzimas proteolíticas, lipolíticas e aminolíticas. Todas as enzimas proteolíticas do pâncreas se encontram em um estado inativo (zimogênios). A tripsina pode se auto-ativar ou ser ativada pela heteroquinase. As demais proenzimas são totalmente ativadas pela tripsina.

A característica principal das enzimas proteolíticas da pancreatina é que elas são uma mistura de endo e exopeptidases; existem pelo menos quatro enzimas proteolíticas com especificidade totalmente diferentes, que podem ou não estar em forma de zimogênios.

Através da análise da protease é possível distinguir dois tipos de atividades proteolíticas, a *atividade proteolítica livre* e *atividade proteolítica total*, esta última pode ser medida após a ativação completa dos zimogênios efetuando-se a pré-incubação da solução com heteroquinase.

A amilase pancreática também presente na **Pancreatina** é determinada através da capacidade da α -amilase (α -1,4-glucano glucanohidrolase) de romper as ligações do substrato (amido) em solução.

A lipase pancreática é outra enzima presente na **Pancreatina**, ela é uma mistura de duas isoenzimas, a lipase A e lipase B, as quais diferenciam-se das outras estearases por suas características de emulsionar substratos.

Os resultados da atividade enzimática são obtidas de acordo com método FIP utilizando padrões FIP.

**FICHA TÉCNICA – FT/PAN05****Revisão 01**

Pág. 2/3

ENZIMAS PANCREÁTICAS:

PROTEASES

- Carboxipeptidase A (peptidil - L-amino ácido hidrolase, E.C.3.4.2.1)
- Carboxipeptidase B (peptidil - L-lisina hidrolase, E.C.3.4.2.2)
- Tripsina (E.C.3.4.21.4)
- Quimotripsina (E.C.3.4.21.1)
- Elastase (pancreato peptidase E, E.C.3.4.4.7)

LIPASE

- Lipase Pancreática (glicerol - ester hidrolase E.C.3.1.1.3)

AMILASE

- α -amilase (α - 1,4 - glucano glucanohidrolase, E.C 3.2.1)

CONSERVAÇÃO:

Conservar em recipientes bem fechados, preferencialmente em temperaturas que não venham exceder a 30°C.

APLICAÇÃO TERAPÊUTICA:

A pancreatina é utilizada em tratamentos de insuficiência pancreática, como: pancreatites e mucoviscidoses, e em deficiências do pâncreas exócrino como: dispepsia amilácea, fibrose sistica entre outras. Através da catalização da hidrólise do amido, a **Pancreatina** favorece condições para o desenvolvimento da flora glucidolítica (Lactobacteriaceae), a qual possui propriedades antagônicas aos microorganismos patogênicos intestinais. Os efeitos colaterais da **Pancreatina** são mínimos, em altas dosagens pode ocasionar náuseas, diarreia e hiperuricemia.

Uma vez que enzimas pancreáticas podem ser destruídas pela ação dos ácidos naturais e enzimas proteolíticas, recomenda-se utilizá-las na forma de comprimidos revestidos ou cápsulas gastro-resistentes.



FICHA TÉCNICA – FT/PAN05

Revisão 01

Pág.3/3

ESPECIFICAÇÕES:

1. Descrição: (Referência Interna)	Pó amorfo de coloração bege, ligeiramente higroscópico e com odor característico.
2. Perda por dessecação: (Farmacopéia Brasileira, 1988)	Não mais que 5,0% (105°C / 4 horas)
3. Lipídios: (Farmacopéia Européia, 1997)	Não mais que 3,0%
4. Atividade enzimática: (Farmacopéia Européia, 1997)	
4.1 Amilase:	Não menos que 20.700 U FIP/g
4.2 Lipase:	Não menos que 24.700 U FIP/g
4.3 Protease:	Não menos que 1.100 U FIP/g
5. Controle microbiológico: (Farmacopéia Brasileira, 1988)	
5.1 Bactérias	Não mais que 1×10^4 UFC/g
5.2 Fungos e leveduras	Não mais que 1×10^2 UFC/g
5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente
5.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente
5.5 <i>Escherichia coli</i>	Ausente
5.6 <i>Salmonella sp</i>	Ausente

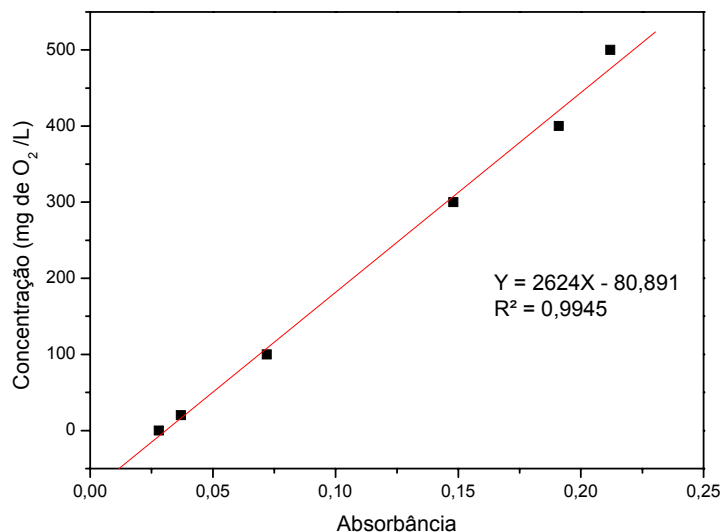
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Farmacopéia Brasileira, IV edição, 1988.
- Pharmacopoeia European, 3ª edição, 1997.

APÊNDICE D - CURVAS PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

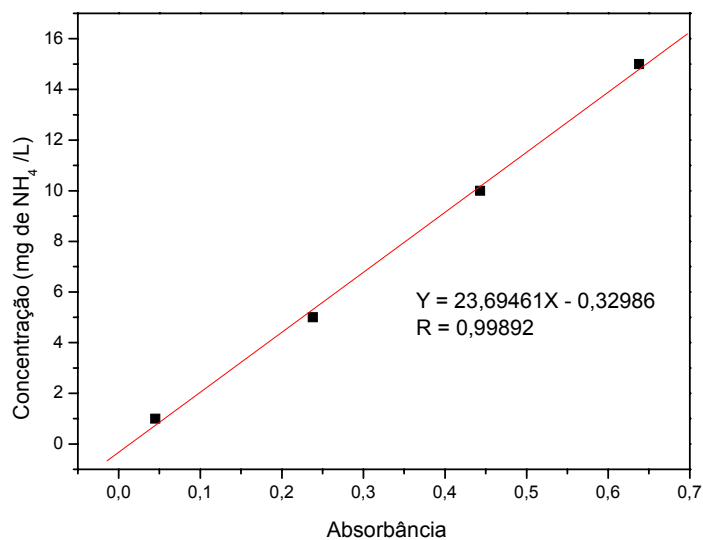
D.1 - Curva padrão de DQO

(mg de O ₂ .L ⁻¹)	Absorbância
0	0,028
20	0,037
100	0,072
300	0,148
400	0,191
500	0,212



D.2 - Curva padrão de Amônia

(mg de NH ₄ .L ⁻¹)	Absorbância
1	0,045
5	0,238
10	0,443
15	0,638



**APÊNDICE E - CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS
DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS**

E.1 - Influência do pH na atividade das lipases

pH	Atividade (U.mg ⁻¹)			
	Lipase pancreatina LKM		Lipase pancreatina LNU	
	Azeite de oliva	Efluente	Azeite de oliva	Efluente
6.0	720	100	1700	140
6.5	2520	200	1746,67	140
7.0	2866,67	580	3913,33	180
7.5	3000	200	1720	220
8.0	3320	460	1440	160
9.0	2080	-	-	-
10.0	1920	-	-	-

E.2 - Influência da temperatura na atividade das lipases

Temperatura (°C)	Atividade (U.mg ⁻¹)			
	Lipase pancreatina LKM		Lipase pancreatina LNU	
	Azeite de oliva	Efluente	Azeite de oliva	Efluente
30	1440	280	786,67	320
35	1400	520	1080	340
37	3320	580	3913,33	220
40	1386,67	580	1013,33	220
45	1066,67	300	866,67	620
50	1800	340	840	280
55	-	460	-	400
60	1173,33	-	1000	-

APÊNDICE F - ANÁLISES

F.1 - Ácidos graxos livres

Concentração de lipase (p/v)	Ácidos Graxos Livres (g.L ⁻¹)			
	Lipase pancreatina (LKM)		Lipase pancreatina (LNU)	
	0 Dia	30 Dias	0 Dia	30 Dias
0,10%	2,2449	2,2520	2,7952	2,4398
0,15%	2,4756	2,2878	3,3184	2,8248
0,20%	3,1002	2,9068	4,4637	3,6944
0,25%	4,3964	2,5489	4,0117	3,3359
0,30%	5,5344	2,2981	4,2409	3,1368
0,35%	6,1784	3,4966	5,7516	3,0271

F.2 - Glicerol

Concentração de lipase (p/v)	% Glicerol (g.g ⁻¹)			
	Lipase pancreatina LKM		Lipase pancreatina LNU	
	0 Dia	30 Dias	0 Dia	30 Dias
0,10%	0,1149	0,1796	0,1212	0,1782
0,15%	0,1145	0,1914	0,1616	0,1908
0,20%	0,1137	0,1644	0,1122	0,1533
0,25%	0,1435	0,2334	0,1393	0,1676
0,30%	0,1751	0,2349	0,1715	0,1890
0,35%	0,1762	0,2219	0,1632	0,2039

F.3 - DQO

Concentração de lipase (p/v)	DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)			
	Lipase pancreatina LKM		Lipase pancreatina LNU	
	0 Dia	30 Dias	0 Dia	30 Dias
0,10%	660,53	266,93	949,17	109,49
0,15%	1132,85	240,69	1697,01	135,73
0,20%	485,91	188,21	1775,73	214,45
0,25%	1080,37	358,77	2025,01	227,57
0,30%	1539,57	266,93	2864,69	227,57
0,35%	1920,05	319,41	3271,41	161,97
		0 Dia	30 Dias	
Lodo		896,69	55,57	
Efluente bruto		581,81	398,13	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)