

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIPÍDEOS PRESENTES EM EFLUENTES

P. ZANATTA¹, M. GABRIEL¹, G. LONGARETTI¹, F. DALCANTON¹, J. DAL MAGRO¹, J. M. M. DE MELLO¹

¹Universidade Comunitária da Região de Chapecó
E-mail para contato: paulazanatta@unochapeco.edu.br

RESUMO – Os efluentes de indústrias alimentícias têm como principais constituintes os lipídeos, caracterizados por óleos, gorduras e ácidos graxos livres. Esses compostos, quando não tratados adequadamente, causam danos severos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo e espumas nas superfícies aquáticas, flotação da biomassa, toxicidade a determinados microrganismos, e em sistemas de tratamento de efluentes, pela degradação natural destes lipídios ser um processo biológico muito lento, acabam comprometendo a eficiência destes sistemas. Processos alternativos têm sido utilizados na redução da concentração de lipídeos nos efluentes por meio da ação de enzimas lipolíticas. Este trabalho teve como objetivo obter as condições ótimas do processo de hidrólise enzimática de lipídeos, variando pH (5, 7 e 9), temperatura (25, 35 e 45 °C) e concentração da enzima lipase (0,3, 0,5 e 0,7%). Como fonte lipídica, utilizou-se óleo de soja e para a análise dos resultados, montou-se um planejamento fatorial tipo estrela 2³, com triplicata do ponto central. Como resposta utilizou-se o teor de acidez volátil, medido por potenciometria. Os resultados mostraram que, para as condições estudadas, a hidrólise do óleo de soja através da lipase, não mostrou-se estatisticamente significativa, com um nível de significância de 5%, para os parâmetros estudados, e para 10% de significância, o pH linear apresentou efeito significativo.

Palavras-chave: hidrólise enzimática, efluentes, lipídeos

DOI: 10.5965/24473650312017008

1. INTRODUÇÃO

O processo de abate e industrialização de animais, como aves e suínos, gera subprodutos que, se mal destinados ou processados, constituem-se em potenciais poluentes ambientais. O tratamento dos resíduos e efluentes do abatedouro tem sido uma das grandes preocupações destas indústrias, principalmente em decorrência das restrições que o mercado consumidor vem impondo as questões de meio ambiente e da sua reutilização.

Segundo Zadinelo *et al.* (2013), resíduos líquidos gerados de abatedouros de aves, por exemplo, são ricos especialmente em proteínas e lipídeos, sendo estes 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. Estas gorduras e proteínas têm baixo coeficiente de biodegradabilidade. Além disso, em temperaturas mais baixas, as gorduras solidificam causando danos operacionais, como obstrução de tubulações, odores desagradáveis, formação de filmes de óleo em superfícies aquáticas, impedindo a difusão do oxigênio, promovendo a mortandade da vida aquática (MENDES *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2009; DAMASCENO, CAMMAROTA, FREIRE, 2012).

Em processos de digestão anaeróbia de compostos orgânicos, um grupo de bactérias anaeróbias hidrolisa, fermenta ou converte biologicamente os compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídios, em compostos orgânicos mais simples, principalmente os ácidos voláteis, e após, ocorre a conversão dos ácidos orgânicos em produtos finais, sendo o principal produto o biogás, composto principalmente por metano e gás carbônico (MENDES *et al.*, 2005). Porém essa taxa de conversão, pelas bactérias anaeróbias, ainda é considerada baixa (JEGANATHAN, NAKHLA, BASSI, 2007). Sendo assim, processos alternativos têm sido desenvolvidos com intuito de reduzir a concentração de lipídeos nos efluentes, por meio de ação de enzimas, especificamente as lipases (MENDES *et al.*, 2005; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2007; BUENO, 2012). O emprego de lipase, nestes efluentes, garante maior velocidade de reação de hidrólise, promovendo a quebra das cadeias de carbono longas em fragmentos menores, reduzindo o tempo de biodegradação destes compostos (VALLADÃO, FREIRE, CAMMAROTA, 2007; AMARAL, 2008).

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com o acréscimo da temperatura, devido a energia cinética das moléculas do sistema ser maior, aumentando a probabilidade de colisões produtivas por unidade de tempo. Porém uma grande elevação na temperatura, resulta na redução da velocidade de reação e desnaturação da enzima. Contudo, a temperatura ótima de determinada enzima também pode ser influenciada pela pureza do substrato, pela presença de inibidores e pelo método de análise (JI *et al.*, 2010; BUENO, 2012). Quanto ao pH, as enzimas apresentam um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima, e normalmente a velocidade da reação diminui à medida que o pH diminui. Cada enzima possui o seu valor ótimo de pH, mas geralmente este encontra-se próximo ao neutro, entre 7 e 8. Em pH acima de 8,5 pode ocorrer a saponificação ou emulsificação, e o excesso de detergentes prejudica a eficiência do processo, já para valores extremos de pH, estes também levam à desnaturação da enzima. A determinação do pH ótimo é importante, pois é um parâmetro que afeta diretamente a atuação da enzima, visto que pode acarretar alteração da sua estrutura molecular e conseqüentemente perda de atividade (MENDES *et al.*, 2005; RAMANI *et al.*, 2010; DORS *et al.*, 2013). Em geral, as lipases apresentam pH ótimo entre 4 e 9, e temperatura desde a ambiente até 70 °C, com ótima entre 30 e 40 °C (CASTRO, MENDES, SANTOS, 2004).

A utilização desta tecnologia apresenta diversas vantagens, entre elas: propicia melhores condições de operação no tratamento anaeróbio; não há necessidade de aclimação da biomassa; não há efeitos de choque de carga de poluentes; opera em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade; desobstrução de filmes de gordura em tubulações e diminuição do tempo de retenção da digestão (MENDES, CASTRO, 2004; ALVES *et al.*, 2009; BERTON *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2014). Além disso, as enzimas podem ser utilizadas como catalisadores, uma vez que possui a capacidade de ser recuperada e reutilizada, reduzindo o volume de resíduos gerados no processo (MENDES, CASTRO, 2004).

Porém, muitos efluentes industriais ainda não apresentam a eficiência esperada em razão do desconhecimento das condições ótimas da hidrólise. Portanto, é fundamental que pesquisas mais detalhadas dos tratamentos biológicos em efluentes que contenham compostos de baixa taxa de

biodegradabilidade, sejam executadas. Diante desta perspectiva, este trabalho teve como objetivo obter as condições ótimas do processo de hidrólise enzimática de lipídios, utilizando-se a enzima lipase, variando-se o pH da solução, temperatura e a concentração enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A lipase utilizada neste trabalho foi a Callera™ Trans L. (*Thermomyces lanuginosus*), extraída de um fungo termofílico com uma atividade hidrolítica de 100.000 LU/g, sendo que 1 LU é definido pela atividade requerida para produzir 1 µmol de ácido butírico no processo de hidrólise (CESARINI, DIAZ, NIELSEN, 2013). A enzima é conhecida comercialmente por Eversa®, e foi cedida pela Novozymes (Dinamarca). Esta enzima é responsável pela quebra das cadeias lipídicas do substrato, obtendo-se compostos de cadeias menores, auxiliando na posterior degradação biológica anaerobicamente (CHAMPE, HARVEY, FERRIER, 2006).

Como fonte de lipídio, utilizou-se uma solução contendo óleo de soja da marca Soya (30/70 óleo/água, v/v). A avaliação da hidrólise enzimática foi realizada variando-se três parâmetros, a fim de encontrar a condição ótima de atuação da lipase, que são: temperatura (25, 35 e 45 °C), pH (5, 7 e 9) e concentração de enzima (0,3; 0,5 e 0,7%), onde a resposta obtida foi a concentração da acidez volátil.

A acidez volátil foi determinada através do método potenciométrico, de acordo com a Norma Técnica L5.102 CETESB - Determinação de alcalinidade em águas - método da titulação potenciométrica, que consiste na titulação da amostra do pH 4,0 ao pH 7,0, (CETESB, 2008). Para as medidas da acidez foi utilizada 50 mL de cada amostra homogeneizada, utilizando um agitador magnético, e filtrada com papel filtro com 12,5 cm de diâmetro. Após reduziu-se o pH para 3,3 com H₂SO₄ 0,1 N. A amostra foi fervida por 3 minutos, e aguardou-se o resfriamento da solução até temperatura ambiente, e então o pH foi elevado para 4,0 (desconsiderando o volume de NaOH 0,1 N gasto). Em seguida, o pH foi corrigido de 4,0 à 7,0 com o auxílio da solução de NaOH 0,1 N. O volume de NaOH necessário para elevar o pH de 4,0 a 7,0 é usado para calcular a concentração da acidez volátil da amostra. A acidez volátil de cada amostra foi determinada através da Equação 1 (CETESB, 2008).

$$AV = \frac{V_1 * N * 60000}{V_A} \quad (1)$$

Onde: AV é a acidez volátil (mg/L); V₁ é o volume gasto na titulação de pH 4,0 a pH 7,0 (mL); N a normalidade da solução empregada (N); e V_A é o volume da amostra (mL).

Experimentos utilizando apenas o óleo (100%) demonstraram-se ineficientes, devido à dificuldade de manter o pH nos valores estipulados para este estudo. Como alternativa, o óleo foi diluído em soluções tampão que representaram 140 mL da solução, sendo um total de 200 mL (30% de óleo e 70% de solução tamponada). As soluções tampões foram preparadas com ácido acético e acetato de sódio para pH 5,0, fosfato monossódico e fosfato dissódico para pH 7,0, e carbonato de sódio e bicarbonato de sódio para pH 9,0, todas 0,01 M. Os ensaios foram realizados em um Shaker (Logen Scientific – modelo LS 4500), com agitação de 200 rpm e temperatura controlada, por 24 h.

Com o objetivo de avaliar se os parâmetros citados acima influenciavam, de forma significativa, no processo de hidrólise da gordura, foi realizado um planejamento fatorial no qual tem 2 níveis (-1 e +1), 2³ mais a configuração estrela, e triplicata do ponto central, resultando em 17 experimentos para a determinação das melhores condições deste processo, possibilitando o planejamento e a execução de forma organizada, com um número reduzido de ensaios. Os níveis estudados no planejamento experimental estrela são mostrados na Tabela 1. O tratamento estatístico dos dados obtidos de acidez volátil foi feito utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft®), através da análise de variância (ANOVA) com 5% e 10% de probabilidade ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,10$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima utilizada foi uma lipase, a qual tem a função, basicamente, de transformar lipídios em ácidos carboxílicos e glicerol, portanto no presente trabalho optou-se por fazer a leitura do teor de ácidos voláteis, o qual indica todos os ácidos liberados no processo de hidrólise no sistema. Na Tabela 1 é apresentada a matriz do planejamento fatorial 2³, com os valores dos parâmetros analisados, codificados e reais, temperatura, pH e concentração enzimática, bem como os resultados obtidos de acidez volátil

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial otimizado 2³ com triplicata do ponto central, com valores codificados e reais e resposta de acidez volátil

Ensaios	pH	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (%)	pH	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (%)	Acidez volátil (mg/L)
1	-1	-1	-1	5	25	0,3	480,0
2	-1	-1	+1	5	25	0,7	510,0
3	-1	+1	-1	5	45	0,3	595,2
4	-1	+1	+1	5	45	0,7	624,0
5	+1	-1	-1	9	25	0,3	216,0
6	+1	-1	+1	9	25	0,7	432,0
7	+1	+1	-1	9	45	0,3	492,0
8	+1	+1	+1	9	45	0,7	240,0
9	-1,6818	0	0	3,64	35	0,5	4824,0
10	+1,6818	0	0	10,36	35	0,5	240,0
11	0	-1,6818	0	7	18,2	0,5	770,3
12	0	+1,6818	0	7	51,8	0,5	783,6
13	0	0	-1,6818	7	35	0,164	796,8
14	0	0	+1,6818	7	35	0,836	733,2
15	0	0	0	7	35	0,5	792,0
16	0	0	0	7	35	0,5	762,0
17	0	0	0	7	35	0,5	697,2

Através da Tabela 1, é possível verificar que os maiores valores de acidez volátil foram obtidos

nas condições de pH 7, ensaios 11 ao 17, com exceção do ensaio 9, que apresentou o valor da acidez volátil muito superior quando comparado aos demais ensaios, este experimento foi repetido e seu valor se repetiu. Isso deve-se possivelmente a alguma interferência no método de quantificação da acidez, devido o pH ser muito ácido.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta acidez volátil, estão descritos na Tabela 2, onde se observa que o coeficiente de correlação e a percentagem de variância explicada não foram satisfatórios, explicando apenas 29,03% de variância com um coeficiente de correlação de 0,53875. Observa-se, também, que o valor de $F_{\text{calculado}}$ ($F_{\text{calc.}} = 7,13$) é levemente maior que o F_{tabelado} ($F_{\text{tab.}} = 3,68$) a um nível de confiança de 95%. De acordo com Barros Neto (2003), para que o modelo seja considerado preditivo o valor do $F_{\text{calculado}}$ deve ser de 4 a 5 vezes maior que o F_{tabelado} , deste modo, pode-se afirmar que o referido modelo não apresentou significância estatística e que o mesmo não pode ser utilizado para fins preditivos. Como pode-se observar para todos os fatores e interações entre eles, o valor de p foi maior que 0,05.

Tabela 2 – Análise de Variância (ANOVA) do planejamento fatorial estrela da acidez volátil, com nível de confiança de 95%

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F	p
pH (Linear)	5338456	1	5338456	4,587821	0,069437
pH (Quadrático)	1987030	1	1987030	1,707636	0,232583
Temp. (Linear)	8245	1	8245	0,007086	0,935271
Temp.(Quadrático)	453979	1	453979	0,390146	0,552030
Conc. (Linear)	519	1	519	0,000446	0,983745
Conc. (Quadrático)	473297	1	473297	0,406747	0,543915
pH x Temp.	2635	1	2635	0,002265	0,963372
pH x Conc.	1123	1	1123	0,000965	0,976080
Temp. x Conc.	27519	1	27519	0,023649	0,882120
Resíduo	8145303	7	1163615	-	-
TOTAL	17659369	16	-	-	-
% variância explicada		Coeficiente correlação	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	95%
29,03		0,53875	7,13	3,68	

Dessa forma, para as condições estudadas, nenhum dos parâmetros avaliados influenciaram significativamente na concentração de acidez volátil gerada durante a hidrólise enzimática do óleo de soja, através do método potenciométrico para determinação da acidez volátil, para um nível de confiança de 95%. Após analisar os resultados obtidos pela Tabela 2, realizou-se novamente a análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 90%, visto que, para a variável pH, no modelo linear, o valor de p foi menor que 0,1, indicando que a 95% de confiança o pH é marginalmente significativo. Neste caso, para o pH linear houve efeito significativo, e quanto maior o valor do pH menor a acidez volátil. Com relação as demais variáveis, temperatura e concentração enzimática, tanto o modelo linear quanto o quadrático não apresentaram efeitos significativos, visto que o valor de p ficou acima de 0,1.

De acordo com a literatura, conforme a temperatura da reação aumenta, maior é a atividade enzimática e, em temperaturas muito altas, ocorre a desnaturação da enzima (CHAMPE, HARVEY, FERRIER, 2006; JI *et al.*, 2010). Contudo, neste caso, não foi observada a relevância deste parâmetro. Outro fator a ser considerado é a concentração de enzima no meio, quanto mais enzimas ativas são disponibilizadas no meio, mais matéria orgânica é hidrolizada, o que também não foi verificado pelos ensaios. Isso se deve, possivelmente ao fato da variação entre as concentrações, usada neste trabalho, ser pequena, ou seja, para que a concentração de enzima fosse significativa, teriam que ser estudadas diferenças maiores, por exemplo: 0,1; 2 e 5%. Donoso-Bravo e Fdz-Polanco (2013), avaliaram a adição da enzima lipase para tratamento de esgoto sanitário. Os autores comentam que em concentrações de lipase abaixo de 0,5%, não há um incremento significativo no volume de biogás.

4. CONCLUSÃO

Devido aos resultados obtidos não apresentarem um bom ajuste aos modelos linear e quadrático, não foi possível encontrar um ponto ótimo para esse processo, ou seja, prever quais as melhores condições de pH, temperatura e concentração enzimática para a hidrólise dos lipídeos, pelo método de análise estudado, sugerindo-se que outro método seja testado. Com 90% de confiança, o termo linear do pH demonstrou ser uma variável com efeito significativo, diferentemente das outras variáveis que, dentro das condições estudadas, não afetaram o processo. Pode-se verificar, pelos ensaios 11 ao 17, em que o pH manteve-se em 7,0, os maiores valores de concentração de acidez volátil. As menores concentrações de acidez volátil foram obtidas para pH alcalino, sendo que a menor concentração foi obtida para pH 9,0, para a menor temperatura (25 °C) e menor concentração enzimática.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, M. M.; PEREIRA, M. A.; SOUSA, D. Z.; CAVALEIRO, A. J.; PICAVET, M.; SMIDT, H. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb. Biotechnol.*, v. 2 (5), p. 538-550, 2009. Doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00100.x.
- AMARAL, L. A. *Alternativas para tratamento de resíduos de couro curtido ao cromo: hidrólise enzimática e ação bacteriana*. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2008.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. São Paulo: Unicamp - Universidade Estadual de Campinas - Cid. Universitária, 2003.
- BERTON, A. C.; GEHM, D. H.; SCHNITZLER, D. C.; DURLI, E. Tratamento de efluentes de indústrias de alimentos com lipase comercial para redução de altos teores de óleos e graxas. *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2011.
- BUENO, P. R. M. Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes da indústria de alimentos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos),

Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2012.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova.*, v. 27, p. 46-156, 2004.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. *Process Biochem.*, v. 48, p. 484-487, 2013.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Guia técnico ambiental de abate (bovino e suíno) - série P+L*. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica ilustrada*. Porto Alegre – RS. Artmed, 3th ed., 2006.

DAMASCENO, F. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.*, v. 95, p. 241-246, 2012.

DONOSO-BRAVO, A.; FDZ-POLANCO, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and grease trap: Assessment of enzyme addition. *Process Biochem.*, v. 48, p. 936-940, 2013.

DORS, G.; MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FURIGO JR., A. Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. *Appl. Water. Sci.*, v. 3, p. 343-349, 2013. Doi: 10.1007/s13201-012-0075-9.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. *J. Hazard. Mater. B*, v. 145 (1-2), p. 127-135, 2007.

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, Amsterdã, v. 66 (3-4), p. 264-269, 2010.

LIMA JÚNIOR, A. F.; DEMONER, H. F.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F. *Biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos derivados de sistemas de tratamento de esgoto*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007.

MARQUES, R. V.; GUIDONI, L. L. BITTENCOURT, G. A.; DUVAL, E. H.; CORRÊA, E. K. Hidrólise microbiana de resíduos graxos bovinos: Pré-tratamento para produção de biodiesel. *4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente*, 2014.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no

tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Quím. Nova.*, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

RAMANI, K.; KENNEDY, L. J.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochem.*, v. 45, p. 1683-1691, 2010.

ROSA, D. R.; DUARTE, I. C.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.*, v. 100, n. 24, p. 6170-6176, 2009.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, v. 60, p. 219-225, 2007.

ZADINELO, I. V.; SERENISKI, R. M.; BORIN, R.; FAGNANI, K. C.; STREMEL, D. P.; GOMES, L. F. S. Potencial da produção de biogás a partir de efluente pré-tratado de abatedouro de aves da região Oeste do Paraná. *Ver. Bras. Energ. Renov.*, v. 2, p. 61-71, 2013.