

II-112 – EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIPÍDEOS E BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA DA ESCUMA PROVENIENTE DE REATORES UASB TRATANDO ESGOTO DOMÉSTICO

Aracele Vieira Santos⁽¹⁾

Zootecnista pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Especialista em Meio Ambiente e Desenvolvimento pela UESB. Mestre em Ciência pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Doutoranda em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Engenheiro Civil e Sanitarista pela UFMG. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Newcastle upon Tyne – UK. Professor Associado do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

Lucas Castro

Graduando em Engenharia Química pela UFMG.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Artur Bernardes, 108 – São Bento - Belo Horizonte - MG - CEP: 30330-970 - Brasil - Tel: (31) 9315-6748 - e-mail: ara.celle@yahoo.com.br

RESUMO

Os reatores UASB têm sido amplamente reconhecidos como potencial alternativa em estudos de concepção de sistemas de tratamentos de esgotos no contexto do Brasil. Contudo, algumas limitações em termos de operação ainda são observadas sob a perspectiva do efetivo controle da espuma produzidas em reatores UASB. Considerando tal limitação, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de uma lipase comercial de origem microbiana (Lipolase 100L, Novozymes) sobre a espuma acumulada em reator UASB tratando esgoto doméstico, numa etapa preliminar à biodegradação anaeróbia, visando a hidrólise de triglicerídeos a moléculas mais facilmente assimiláveis em um tratamento anaeróbio posterior, como ácidos graxos (AG). Foram avaliadas diferentes concentrações enzimáticas na etapa de hidrólise, com base nas condições operacionais usuais de pH e temperatura em reatores UASB. O acompanhamento cinético da hidrólise foi avaliado através do monitoramento de ácidos graxos liberados.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da hidrólise na biodegradabilidade anaeróbia da espuma. Uma comparação entre o sistema pré-tratado e o não tratado foi avaliada, visando evidenciar a eficiência do processo, a partir da produção de metano. Os resultados revelam que a aplicação da lipase comercial (Lipolase 100 L) apresenta eficiência na hidrólise de triglicerídeos presentes na espuma em ácidos graxos e na biodegradação anaeróbia desse rejeito, com maior eficiência na conversão de metano como fonte de energia.

PALAVRAS-CHAVE: lipase, tratamento enzimático, degradação de espuma, separador trifásico, biogás, metano.

INTRODUÇÃO

A espuma constitui-se em um subproduto sólido gerado durante o tratamento de efluentes e, em geral, pode ser definida como uma camada de material flutuante composta por diferentes frações orgânicas, que se desenvolve na superfície de reatores. Junto a essa matriz residual podem estar presentes gorduras, óleos, ceras, sabões, restos de alimentos, cascas de frutas e vegetais, cabelo, papel e algodão, pontas de cigarros, materiais plásticos e materiais similares (METCALF & EDDY, 1991).

Os lipídeos correspondem à fração mais relevante da espuma, em função da sua baixa biodegradabilidade. Ao mesmo tempo, a gordura presente na espuma ao se solidificar, com a redução da temperatura, forma um filme de óleo sobre a superfície aquática dos reatores que retém o todo o material flutuante, formando a camada de espuma (VIDAL et al., 2000).

Em reatores UASB, a formação de espuma pode formar e causar problemas operacionais em dois locais distintos: i) no interior do separador trifásico, na interface de liberação dos gases formados durante a digestão anaeróbia; e ii) na superfície do decantador, conforme ilustrado na Figura 1. Dentro do separador trifásico, a

passagem do biogás para a saída pode ser comprometida, causando escape de biogás para a zona de decantação, sendo danoso à sedimentação do lodo. Adicionalmente, pode ocorrer também à formação de caminhos preferenciais pelo biogás no leito de lodo, causando o arraste da biomassa, o que prejudica a qualidade final do efluente. Esses problemas podem causar deficiência nos sistemas e panes em ocasiões eventuais (SOUZA, 2006).

No compartimento de decantação pode ocorrer ainda maior emissão de odores em função da presença de sulfeto (Souza, 2006). Dessa forma, a espuma representa custos adicionais na construção e na operação dos reatores UASB (CHERNICHARO et al., 2009).

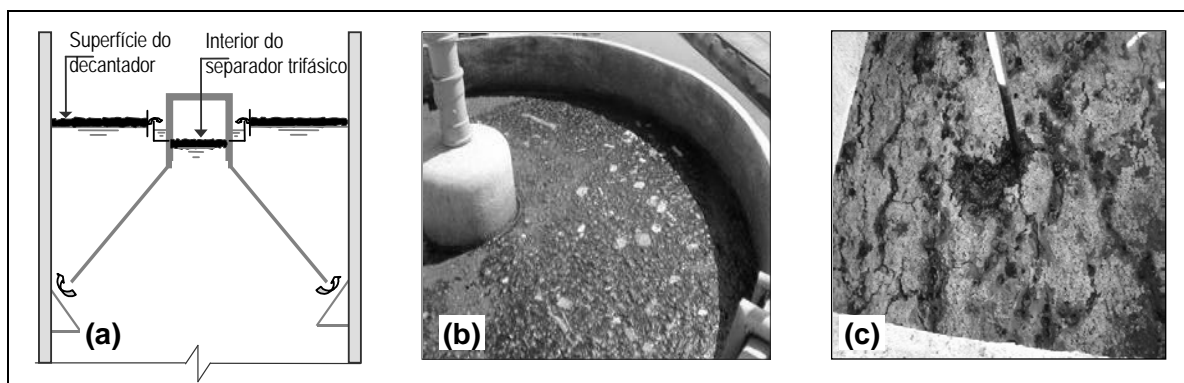


Figura 1: Locais de acumulação de espuma em reatores UASB: (a) representação esquemática; (b) superfície do decantador; (c) interior do separador trifásico.

Por outro lado, a espuma pode representar um à fonte de energia renovável através da biodigestão anaeróbia em que a matéria orgânica presente pode ser convertida em biogás, que é considerado um biocombustível, natural ou artificialmente. Com um conteúdo energético semelhante ao do gás natural, sua forma gasosa é constituída principalmente por uma mistura de hidrocarbonetos (compostos químicos formados por Carbono e Hidrogênio) como o Dióxido de Carbono (CO_2) e o gás Metano (CH_4). A grande vantagem do biogás é que ele é muito menos do que os combustíveis fósseis.

A digestão anaeróbia de rejeitos complexos como a espuma em compostos mais simples é um processo lento, tendo como etapa limitante a hidrólise de lipídeos e a liberação de ácidos graxos pelos microrganismos específicos com atividade lipolítica, devido ao baixo consumo de AGCL (ácidos graxos de cadeia longo) destes as bactérias. Os AGCL, em concentrações milimolares, podem se tornar inibidores dos microrganismos acetogênicos e metanogênicos, 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 (PERLE et al., 1995).

Atualmente, estudos envolvendo a aplicação de enzimas lipásicas têm sido investigados na degradação biológica de efluentes industriais, revelando-se promissores na degradação de óleos e graxas contendo AGCL, pois são os principais substratos dessas enzimas (LEAL et al., 2002; MENDES et al., 2005; VALENTE et al., 2011).

Lipases são enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, classificadas como glicerol éster hidrolases (E. C. 3.1.1.3). Elas atuam na interface orgânica/aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis com a liberação de ácidos graxos e glicerol. A utilização de lipases promove uma maior velocidade de reação de hidrólise sequencial dos grupos acila dos lipídeos, reduzindo o tempo de biodegradação destes compostos (MENDES & CASTRO, 2005).

A fim de melhorar a eficiência da digestão anaeróbia da espuma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da enzima comercial (Lipolase 100L) sobre a hidrólise e a biodegradabilidade anaeróbia da espuma proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo sobre o tratamento enzimático no controle da espuma pode proporcionar a melhoria da biodegradação anaeróbia da espuma e/ou aumento da conversão de matéria-orgânica a metano. Para tanto, é importante o conhecimento das características físico-químicas da espuma, da atividade lipásica da enzima a ser avaliada e das condições operacionais do processo de digestão anaeróbia.

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira, realizou-se uma avaliação do efeito de diferentes concentrações de enzima na hidrólise de lipídeos presentes na espuma em ácidos graxos, levando-se em conta os parâmetros operacionais do reator UASB. Na segunda etapa, baseando-se nos resultados obtidos na primeira etapa, foi avaliado o efeito da hidrólise enzimática na biodegradação anaeróbia da espuma, por meio da conversão da matéria orgânica em metano.

Foram utilizadas preparações de lipase comercial de origem microbiana (Lipolase 100 L), produzida pela Novozymes Latin America, obtida através de fermentação submersa a partir de um organismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*, que foi adquirida pela empresa Sigma – Aldrich Brasil Ltda. Foram utilizados o óleo de oliva como substrato e a goma arábica como emulsificante, para a dosagem da atividade lipásica da enzima.

A espuma foi coletada no separador trifásico de um reator UASB utilizado para o tratamento de esgotos domésticos no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA (CePTS), localizado na Estação de Tratamento de Esgotos do Ribeirão Arrudas, em Belo Horizonte – MG. As amostras foram armazenadas em recipientes plásticos de 2 litros, não esterilizados e levadas ao laboratório de análises físico-químicas do DESA/UFMG. Em seguida, foram trituradas em moinho de panelas e estocadas em freezer a 4 °C, para conservação das suas características. As duas etapas de trabalho são descritas a seguir:

PRIMEIRA ETAPA: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA ESCUMA

Dosagem da atividade lipásica

O método baseia-se na utilização de óleo de oliva como substrato conforme metodologia adotada por Pereira (2004). Foi preparada uma emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 50 mL de solução de goma arábica a 7% (p/v). Em frascos âmbar do tipo penicilina de 100 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 (1,2 g.mL⁻¹). Os frascos foram incubados em um shaker a 37°C por 10 minutos, com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ensaios foram realizados em duplicata. Foram preparados os brancos reacionais, seguindo o mesmo procedimento, utilizando água destilada no lugar da enzima. A reação foi paralisada pela adição da solução de 15 mL de acetona:etanol, na proporção 1:1 e posteriormente a atividade lipásica da enzima foi determinada.

Hidrólise enzimática da enzima

Foram realizados estudos prévios da hidrólise enzimática na espuma para a verificação da formação de ácidos graxos em diferentes concentrações enzimáticas. As reações foram realizadas utilizando-se a Lipolase 100L (após a determinação da atividade enzimática). As reações foram realizadas em um shaker e acompanhadas durante 24 h. A conversão em ácidos graxos foi avaliada pela titulação potenciométrica. Os pré-ensaios foram realizados em duplicatas e efetuados empregando concentrações de enzima de 0%, 0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0%; 2,5% e 5,0% (v/v).

As reações de hidrólise foram realizadas em frascos âmbar tipo penicilina de 100 mL. Em cada frasco foram adicionados 30 mL de espuma, acrescidas de cada concentração de enzima. Em seguida, os frascos foram incubados no shaker por 24 horas, a 25°C, pH igual a 7 e 100 rpm de agitação, visando simular as condições esperadas de mistura junto à interface gás/espuma, no topo dos separadores trifásicos de reatores UASB aplicados ao tratamento de esgoto doméstico. Esses parâmetros foram definidos tomando como base as condições operacionais do reator UASB tratando esgoto doméstico. A adição de enzima foi realizada após a estabilização da temperatura e do pH do meio reacional, sendo este ajustado através da adição de solução de NaOH 0,1M. A reação foi paralisada e o teor de ácidos graxos foi determinado.

Métodos Analíticos

A atividade lipásica e o teor de ácidos graxos na etapa de pré-hidrólise enzimática foram determinados por titulação com NaOH 0,1M até pH 11, conforme descrito por Freire *et al.* (1997). Uma unidade de atividade lipásica correspondente à quantidade de enzima que produz 1 μ mol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio.

SEGUNDA ETAPA: BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ESCUMA

De posse dos resultados obtidos na primeira etapa, ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da espuma foram realizados visando determinar o potencial de conversão da matéria orgânica em biogás (metano). Optou-se por testar duas concentrações enzimáticas a 1,0 e 5,0%, para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia da espuma, realizados em triplicata.

Para simular os biorreatores anaeróbios, os ensaios foram conduzidos em frascos tipo penicilina com volume de 100 mL, com 70 mL de volume útil, contendo de espuma bruta, lodo anaeróbio composto de espuma bruta (controle - adição de água destilada) e lodo anaeróbio composto de espuma pré-hidrolisada. O lodo empregado nos testes de biodegradabilidade anaeróbia foi proveniente de um reator UASB tratando esgoto doméstico. A quantidade de espuma e de lodo utilizada em cada ensaio foi calculada para se manter a relação DQO da espuma em relação a SSV do lodo anaeróbio de 2:1 e 5:1. O pH da espuma foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ antes da mistura com o lodo.

Após adição do inóculo, cerca de 10% do volume dos frascos foi reservado para atmosfera interna (headspace). Os frascos foram fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio, e o headspace foi lavado com fluxo de N_2 , por 2 minutos. Os frascos foram incubados em incubadora shaker a 25°C, com agitação de 100 rpm. O ensaio durou até atingir o pico de produção de metano (7 dias).

Uma comparação entre o sistema pré-tratado enzimaticamente e o não tratado foi avaliada, para evidenciar a eficiência do processo. O fluxograma com o teste de biodegradabilidade pode ser observado na Figura 2:

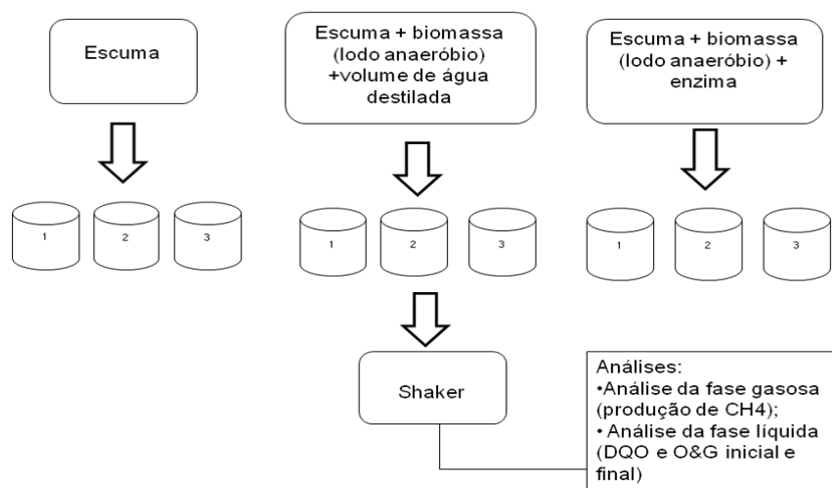


Figura 2: Fluxograma do teste de biodegradabilidade anaeróbia da espuma

A biodegradabilidade foi avaliada através da medida de eficiência de remoção de DQO, O&G e produção de metano. Alíquotas para determinação da DQO inicial foram tomadas após a hidrólise, sem a mistura com o lodo anaeróbio. A DQO final foi determinada no último dia do ensaio de biodegradabilidade, após abertura dos frascos, de acordo com o Standart methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

A medida do volume de biogás foi realizada por deslocamento do êmbolo de seringas esmerilhadas, graduadas de 20 mL, conectadas aos frascos. O teor de metano das amostras de biogás foi analisado em cromatográfico gasoso, em dias alternados, até se verificar diminuição na produção de biogás. Para comparação entre as médias dos desempenhos dos tratamentos foi utilizado o teste de Kruskal – Wallis a 5% ($P > 0,05$) de significância utilizando-se o programa Estatística 8.

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

A enzima comercial Lipolase 100L apresentou uma atividade enzimática de 120 U/mL de atividade lipásica para as condições estabelecidas neste estudo.

O monitoramento da produção de ácidos livres durante a hidrólise enzimática de óleos e graxos é uma forma de avaliar a extensão da mesma devido à capacidade da lipase em hidrolisar compostos complexos em moléculas mais simples.

A figura 3 ilustra a eficiência da aplicação da lipase comercial na produção de ácidos graxos formados pela hidrólise enzimática de compostos lipídicos presentes na escuma, por meio da Lipase comercial (Lipolase 100L), em 24 horas de hidrólise.

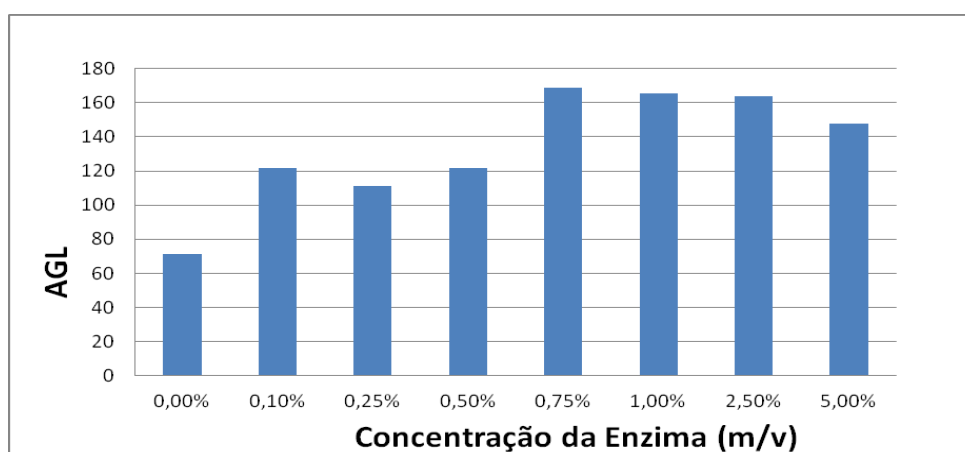


Figura 3: Produção de ácidos graxos livres formados ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) em 24 horas de hidrólise enzimática, a 25°C e 100 rpm de agitação, para diferentes concentrações de enzima.

Como esperado, o aumento da concentração da enzima correspondeu a aumentos significativos da quantidade de ácidos graxos produzidos, conforme demonstrado na Figura 2, em que foi verificada diferença estatística ($P>0,05$) entre o tratamento controle e as demais concentrações enzimáticas na produção de ácidos.

Constatou-se que os melhores resultados foram obtidos empregando-se as concentrações de enzima a 0,75%, 1%, 2,5% e 5% (v/v), as quais apresentaram desempenhos satisfatórios e semelhantes entre si, revelando-se um aumento na concentração de ácidos livres de aproximadamente 2,5 vezes de hidrólise a 25 °C. Embora tenha sido verificada uma redução da hidrólise na concentração a 5%, essa redução não foi confirmada estatisticamente ($P>0,05$) quando comparada com as concentrações de melhor desempenho. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a concentração ideal de enzima situa-se na faixa entre 0,75 e 5% (v/v) para as condições avaliadas.

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

As Figuras 4a e 4b ilustram a produção de biogás ao longo do período de incubação, em cada uma das condições avaliadas (proporção alimento:biomassa de 5:1 e 2:1). As curvas de produção de biogás mostram que a escuma bruta sob agitação a 25 °C, sem adição de enzima (experimento controle), não modifica sua composição, quando comparado aos demais experimentos empregando escuma e lodo com e sem adição de enzima, em que houve uma produção de biogás significativa. No entanto, verificou-se que nos experimentos com a escuma previamente hidrolisada, os volumes finais, assim como as velocidades máximas de produção de biogás, não atingem valores significativamente maiores, comparados aos respectivos controles (com adição de água destilada). Verificou, ainda, que, a produção de biogás formada nos testes de biodegradabilidade anaeróbia foi maior na proporção 5:1 (DQO da escuma: STV do lodo anaeróbio), revelando uma velocidade de reação superior de conversão de matéria orgânica pelos microrganismos (Figura 4a).

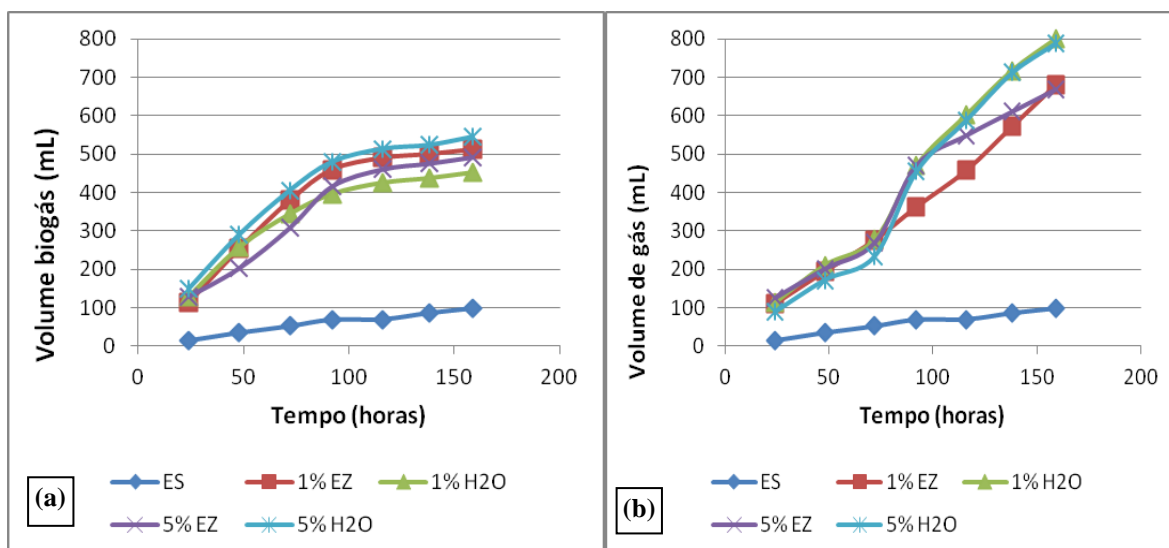


Figura 4: Produção de biogás nos testes de biodegradabilidade anaeróbica de espuma: (a) proporção 5:1, (b) proporção 2:1
(ES: espuma bruta; 1%EZ: espuma + inóculo + 1% enzima; 1%H₂O: espuma + inóculo + 1% água; 5 H₂O: espuma + inóculo + 5% água %)

Por outro lado, os teores de metano no biogás amostrado ao longo do teste foram superiores para os frascos em que houve a adição de enzima, destacando-se a hidrólise com 5% de enzima, para ambas as proporções espuma:inóculo (resultados não apresentados nesse trabalho). Observou-se, ainda, que a espuma bruta não apresentou uma produção de biogás e metano representativa, o que era esperado, em função da ausência da biomassa ativa para degradar o substrato.

Os tratamentos controle (sem adição de enzima) e com 1,0% de enzima apresentaram um menor percentual de metano quando comparado ao tratamento enzimático, provavelmente por conter ácidos graxos de cadeia longa. Estas substâncias podem inibir os microrganismos anaeróbios e reduzir a eficiência da biodegradabilidade e, consequentemente, reduzir a conversão da matéria orgânica em metano (PERLE et al., 1995). Esta hipótese também está sendo avaliada através do emprego da cromatografia gasosa.

A produção e composição de biogás, assim como a concentração de O&G e DQO (entre o melhor desempenho e o grupo controle) foram os parâmetros empregados para a avaliação da eficiência da biodegradação anaeróbica da espuma. Estes parâmetros são largamente utilizados em diversos trabalhos, para avaliar a eficiência do tratamento (VIDAL et al., 2000; MENDES et al., 2005; VALENTE et al., 2011).

O efeito do tratamento enzimático dos lipídeos presentes na espuma foi observado por meio das análises de O&G de todo o conteúdo dos frascos de reação, ao fim do experimento, para o tratamento com 5,0% (v/v) de enzima, conforme observado na Tabela 1. Os resultados revelaram uma concentração média final de $13,0 \pm 0,001$ g/L. Como a espuma pré-hidrolisada apresentou um teor de O&G inicial médio de $31,5 \pm 0,002$ g/L, o tratamento enzimático resultou em uma remoção de 42% de O&G contra 12% do tratamento controle (espuma bruta).

Tabela 1: Valores médios da caracterização físico-química da espuma bruta e pré-hidrolisada

| Parâmetros | O&G (g/L) | | DQO (g/L) | |
|-----------------------------|--------------|--------|--------------|--------|
| | 1º dia | 7º dia | 1º dia | 7º dia |
| Escuma bruta | 33,9 | 29,8 | 113,0 | 110,0 |
| Escuma pré-hidrolisada (5%) | 31,5 | 13,0 | 113,0 | 111,0 |

A redução do teor de DQO foi pouco significativa, com o tratamento enzimático, devido à alta concentração de lipídeos, presente no efluente utilizado. Segundo Leal et al. (2002), elevadas concentrações de lipídeos (0,8 a 1,2 g/L) diminuí a eficiência de remoção de DQO. Apesar da pequena redução de DQO constatada, o tratamento enzimático foi bastante satisfatório, promovendo a hidrólise de lipídeos presentes no efluente testado neste trabalho.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A aplicação da lipase comercial (Lipolase 100 L) numa etapa de hidrólise enzimática, anterior ao tratamento biológico, como coadjuvante na degradação da espuma, apresentou uma melhor eficiência na hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos, nas concentrações enzimáticas de 0,75, 1,0, 2,5 e 5,0%, revelando ser uma alternativa promissora para o controle da espuma.

A avaliação da biodegradabilidade anaeróbia, realizado com a espuma contendo um valor médio de 31,5 g/L de O&G e 5,0% de enzima, durante sete dias, resultaram em uma redução de 42% do teor de O&G na biomassa e produção específica de metano superior.

Os resultados obtidos demonstram a eficiência do tratamento enzimático na hidrólise de resíduos com altas concentrações de gordura, sendo uma alternativa promissora como coadjuvante no tratamento da espuma, além do aproveitamento energético a partir melhoria da conversão de matéria orgânica a biogás (metano).

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro para o fomento ao desenvolvimento científico e tecnológico da pesquisa, concedido pela agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHERNICHARO, C. A. L.; ALMEIDA, P. G. S.; COUTO T. C.; SOUZA, C. L.; BORGES, J. M. Contribuição para a melhoria do projeto e da operação de reatores UASB tratando esgotos domésticos: gerenciamento da espuma. In: Anais do 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Recife - PE. 2009.
2. FREIRE D. M., TELES E. M, BON E. P, SANT' ANNA G. L. JR. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Applied Biochemistry Biotechnology*. v. 63-65, pp. 402-421, 1997.
3. LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. E SANT'ANNA JR, G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.
4. MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p.296 –305, 2005.
5. METCALF & EDDY. *Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse*. 3º ed. McGraw-Hill, Singapore, 1334p, 1991.
6. PERLE, M., KIMCHIE, S., AND SHELEF, G. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Res.* 29, 1549, 1995.
7. SOUZA, C. L. Estudo quantitativo e qualitativo de espuma acumulada em reatores UASB tratando esgotos domésticos. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006, 100p.
8. VALENTE, A. M., ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.3, n.2, 2010.
9. VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Thenology*, v. 74, p. 231 – 239, 2000.