

## II-246 – TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PESCADO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO ANAERÓBIA TERMOFÍLICAS

**Jaqueline Greco Duarte<sup>(1)</sup>**

Bióloga pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IB/UFRJ). Mestranda em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ).

**Larissa Loureiro Salguero Silva<sup>(2)</sup>**

Graduanda em Química pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ).

**Melissa Limoeiro Estrada Gutarra<sup>(3)</sup>**

Doutora em Ciência de Alimentos pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ). Professora adjunta do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**Denise Maria Guimarães Freire<sup>(4)</sup>**

Doutora em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ). Professora Associada I do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Magali Christe Cammarota<sup>(5)</sup>**

Doutora em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ). Professora Associada III do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Endereço<sup>(5)</sup>:** Avenida Horácio Macedo 2030, Centro de Tecnologia, Bloco E sl.203– Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21941-909 - Brasil - Tel: (21) 2562-7568 - e-mail: [christe@eq.ufrj.br](mailto:christe@eq.ufrj.br)

### RESUMO

Efluentes de indústrias de processamento de pescado apresentam elevada temperatura, demanda química de oxigênio (DQO) e concentração de óleos e graxas (O&G), podendo acarretar sérios danos ambientais se descartados inadequadamente. A aplicação de enzimas hidrolíticas é uma alternativa que pode melhorar o tratamento destes efluentes como verificado em estudo anterior, no qual a melhor condição de tratamento de um efluente contendo 1500 mgO&G/L foi obtida após 8 h de hidrólise com 0,5 % (m/v) ou 0,67 U/mL de um preparado enzimático sólido (PES) seguida de tratamento anaeróbico por até 12 dias, sendo ambas as etapas conduzidas a 30°C. O PES, rico em lipases, é obtido por fermentação em estado sólido (FES) do fungo *Penicillium simplicissimum* empregando torta de babaçu como substrato. Considerando que a lipase apresenta atividade ótima a 50°C e que o efluente pode ser gerado a altas temperaturas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da hidrólise e tratamento anaeróbico a 50°C. Para tal, foi utilizado um efluente sintético com concentração de 1500 mg O&G/L. Cinéticas de hidrólise foram realizadas com diferentes atividades lipásicas (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,67 U/mL de efluente) verificando-se que com 0,16 e 0,32 U/mL foram produzidos  $4,71 \pm 0,96$  e  $6,60 \pm 0,26$   $\mu\text{mol/mL}$  de ácidos livres, respectivamente, após 4h de hidrólise a 50°C. Nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 50°C, em três bateladas consecutivas com efluente hidrolisado com 0,16 U/mL, obteve-se produção específica de metano (PEM) de 117, 115 e 10 mL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>removida</sub> sugerindo uma possível inibição na terceira batelada. No entanto, em testes comparativos, conduzidos em três condições: termofílica (hidrólise e tratamento anaeróbico a 50°C), mesofílica (hidrólise e tratamento anaeróbico a 30°C) e híbrida (hidrólise a 50°C e tratamento anaeróbico a 30°C), os melhores resultados (97,5% de remoção de DQO e 105,4 mL de CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>removida</sub>) foram obtidos na condição híbrida em apenas 68h de tratamento. Conclui-se que a hidrólise termofílica, além de permitir uma diminuição na atividade enzimática utilizada e no tempo de reação, se aplicada em conjunto com um tratamento anaeróbico mesofílico acelera este processo. Tal condição diminui os custos totais do tratamento sendo, portanto, um importante alvo de estudos para uma possível aplicação industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipase, Hidrólise, Tratamento anaeróbico.

## INTRODUÇÃO

Os despejos de indústrias de pescado se caracterizam por apresentarem valores elevados de vazão, demanda química de oxigênio (DQO), temperatura, óleos e graxas e sólidos suspensos totais. Geralmente, tais efluentes são descartados nos corpos d'água após tratamento incompatível com seu grau de poluição, o que agrava, por sua vez, os danos ambientais. Por conterem altas concentrações de material orgânico facilmente assimilável em sua composição, o tratamento biológico anaeróbio é o mais indicado. No entanto, este é prejudicado com a presença de elevadas concentrações de óleos e graxas nos efluentes, que podem gerar aglomerados ou ainda *pellets* entre os flocos de lodo, dificultando a sedimentação do lodo, além de emitirem odores desagradáveis, e reduzirem a eficiência do tratamento anaeróbio (CHOWDHURY et al., 2010; ROLLÓN, 1999; 2002).

Portanto, torna-se necessário o estudo de alternativas de tratamento destes efluentes, que permitam diminuir o conteúdo de óleos e graxas presentes, favorecendo o tratamento biológico posterior. Neste contexto, a tecnologia enzimática surge como uma alternativa no tratamento dos efluentes ricos em gorduras, destacando-se dentro do grupo das hidrolases, as lipases. As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes a um grupo que atua, geralmente, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis (SHARMA et al., 2001). A aplicação destas enzimas vem crescendo progressivamente no meio industrial, por serem capazes de catalisar uma ampla gama de reações, dentre estas, a hidrólise dos óleos e gorduras em efluentes provenientes de indústrias alimentícias como, por exemplo, as indústrias de processamento e conserva de pescado. No entanto, para que esta etapa de pré-tratamento enzimático no tratamento de efluentes seja viabilizada, torna-se necessário o estudo de alternativas menos custosas à produção destas enzimas sendo uma alternativa à redução de custos a fermentação no estado sólido (FES).

A FES, normalmente, é conduzida na ausência ou quase ausência de água livre e utiliza, geralmente, resíduos agroindustriais como suporte e substrato para o crescimento dos micro-organismos que, além de diminuir o custo total do processo, são biodegradáveis. O preparado enzimático sólido (PES), assim obtido, pode ser empregado diretamente no tratamento de efluentes, sem necessidade das etapas de extração e/ou recuperação das enzimas da fase líquida. Deste modo, a FES atribui valor a um resíduo que antes seria descartado (KRISHNA, 2005; VALLADÃO et al., 2007).

A etapa de hidrólise consiste em um pré-tratamento que possibilita a melhoria do tratamento biológico posterior, que pode ser aeróbio ou anaeróbio. Embora os primeiros sejam tradicionalmente empregados, os processos anaeróbios vêm obtendo destaque, ultimamente, devido às vantagens apresentadas sobre os aeróbios, como a de serem potenciais geradores de metano e a de serem utilizados para degradar a matéria orgânica de efluentes de “alta carga” – DQO maior que 4000 mg/L – como no caso dos efluentes de pescado (CHERNICHARO, 2007; CHAN et al., 2009).

Desta forma, a utilização do pré-tratamento enzimático permitirá uma melhor atuação da população microbiana em uma etapa posterior de tratamento biológico, uma vez que não haverá o acúmulo de gorduras no lodo. Além disso, possibilitará a conversão de compostos orgânicos complexos na forma de gorduras e proteínas, antes descartadas como resíduos sólidos problemáticos, em metano, o qual pode ser aproveitado como fonte de energia na própria indústria.

Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o tratamento anaeróbio de efluente de indústria de pescado, com e sem uma etapa preliminar de hidrólise, sendo ambas as etapas conduzidas a 50°C, aproveitando-se, desta forma, da alta temperatura na qual o efluente é gerado para implementar uma hidrólise de curta duração na qual empregou-se um *pool* de enzimas rico em hidrolases termofílicas obtidas por FES.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Efluente sintético.* O efluente sintético foi preparado segundo metodologia proposta por Rollón (1999), com modificações. O efluente foi preparado utilizando-se 160g de cabeças, vísceras, ossos e caudas de sardinha fresca (*Sardinella sp.*) adicionadas a 400 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada em liquidificador na menor velocidade por 1 min. sendo, em seguida, peneirada para obtenção de um efluente concentrado.

*Micro-organismo e propagação.* Foi utilizada uma cepa do fungo *Penicillium simplicissimum*, selecionada como produtora de lipases em diferentes meios semi-sintéticos (FREIRE et al., 1996) e em meio composto por

torta de babaçu (GUTARRA et al., 2005). A cepa foi propagada a 30°C por 7 d em meio com a seguinte composição (% m/v): amido solúvel 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,025;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5;  $\text{CaCO}_3$  0,5; extrato de levedura 0,1; óleo de oliva 1,0; e agar 2,5. Os esporos foram raspados e suspensos em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) estéril, formando a suspensão de esporos cuja concentração foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer.

**Fermentação no estado sólido (FES):** A matéria-prima empregada como meio de fermentação foi a torta de babaçu obtida a partir do rejeito da produção de óleo de babaçu, fornecida pela empresa Tocantins Babaçu S.A suplementada com melaço de cana 6,25% (m/m), um rejeito da produção de açúcar cristalizado. A torta obtida foi triturada em moinho de faca, obtendo-se partículas com diâmetros de até 3 mm, sendo utilizada a faixa < 1,18mm para a produção do preparado enzimático sólido (PES). Para as fermentações, os reatores foram inoculados com  $10^7$  esporos/g de massa seca de torta de babaçu e incubados em uma câmara com temperatura e umidade controladas a 30°C e 90%, respectivamente.

**Hidrólise:** A hidrólise foi realizada em *erlenmeyers* de 500mL contendo 250mL de efluente com concentração inicial de 1500 mgO&G/L, agitados em *shaker* a 150 rpm a 50°C para as hidrólises termofílicas e a 30°C para as hidrólises mesofílicas. No caso das cinéticas termofílicas foram retiradas alíquotas de 10 mL de 4 em 4 h até 24 h, a fim de se avaliar a produção de ácidos livres.

**Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia:** Após a hidrólise, os efluentes pré-tratados enzimaticamente e o efluente bruto (sem adição de enzimas) foram empregados nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia. Os ensaios foram conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL com 90% do volume útil composto de lodo anaeróbio e efluente bruto ou pré-tratado. O lodo foi coletado em reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) mesofílico em operação em indústria de abate de aves, sendo adaptado ao efluente sintético que simulava o efluente de indústria de processamento de pescado tanto a 30°C quanto a 50°C. O volume de biogás produzido nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foi medido pelo deslocamento do êmbolo de seringas de 20 mL, conectadas aos frascos. O biogás produzido foi recolhido em ampolas gasométricas e injetado diretamente no cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900 para determinação do percentual de metano.

**Métodos analíticos:** A atividade lipásica foi medida pelo método espectrofotométrico que se baseia na formação de um produto cromóforo obtido através da hidrólise do p-nitrofenil laurato catalisada por lipases, conforme descrito por GUTARRA et al. (2009). O monitoramento da produção de ácidos livres durante a hidrólise foi realizado em titulador automático (*end point* pH 11) utilizando como titulante NaOH 0,04M. Todas as análises referentes à caracterização do efluente foram realizadas conforme descrito no *Standard Methods* (APHA, 2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização do efluente sintético produzido no presente trabalho é apresentada na Tabela 1, em comparação com dados de efluentes industriais. Os efluentes geralmente são compostos por vísceras e partes das cabeças, caudas e ossos dos peixes (EIROA et al., 2012). Além disto, em porções como a cabeça e vísceras dos peixes está o maior conteúdo de óleo e gorduras do animal. Sendo assim, estes foram os conteúdos utilizados das *Sardinella sp.* para a confecção do efluente.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, os valores obtidos para o efluente sintético, à exceção dos maiores valores de sólidos voláteis totais (SVT), estão dentro das faixas obtidas na caracterização do efluente industrial. A maior concentração de SVT é devido à inclusão de praticamente todo o material suspenso obtido na composição do efluente sintético, pois o peneiramento remove apenas sólidos grosseiros, enquanto nos efluentes industriais este tipo de material é separado durante o processamento do pescado.

Devido à presença de sangue, proveniente principalmente das cabeças dos peixes, o efluente sintético apresentou cor avermelhada e DQO muito elevada. Destaca-se também como característica do efluente os elevados valores de óleos e graxas.

**Tabela 1: Caracterização do efluente sintético em comparação ao efluente industrial.**

	<b>Efluente sintético</b>	<b>Efluente industrial (VALENTE, 2009)</b>
<b>pH</b>	6,5 – 6,9	5,5 – 7,2
<b>DQO (mg/L)</b>	6000 – 15767	1313 – 12025
<b>DBO (mg/L)</b>	2122	967 – 2900
<b>NKT (mg/L)</b>	123,3	5,3 – 499
<b>PT (mg P/L)</b>	56,8	51 – 1400
<b>O &amp; G (mg/L)</b>	2111 - 6317	78 – 3656
<b>ST (mg/L)</b>	2271	848 – 1485
<b>SFT (mg/L)</b>	208	140 – 230
<b>SVT (mg/L)</b>	2063	618 - 1345

Anteriormente, Valente et al. (2010) estudou a hidrólise do efluente de indústria de pescado contendo 1500 mg O&G/L com 0,2%, 0,5% e 1,0% (m/v) de PES cuja atividade era de  $(134 \pm 7 \text{ U/g})$  a  $30^\circ\text{C}$  por até 18h. A condição de hidrólise que resultou nas melhores produções de metano foi a que utilizou 0,5% de PES (0,67 U/mL de efluente) em 8 h de hidrólise. Nesta condição a autora obteve uma produção de  $4,7 \mu\text{mol/mL}$  de ácidos livres. Neste trabalho a atividade lipásica média obtida foi  $46,05 \pm 17,8 \text{ U/g}$  a  $30^\circ\text{C}$  e de  $74,6 \pm 28,83 \text{ U/g}$  a  $50^\circ\text{C}$ , sendo assim o melhor método de comparar ambos os trabalhos seria através da atividade lipásica utilizada nas hidrólises e não da porcentagem de PES empregada. Sendo assim, foram feitos testes iniciais de hidrólise utilizando-se diferentes atividades enzimáticas (U/mL), sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2: Produção de ácidos livres em 4 e 24 h de hidrólise do efluente a  $50^\circ\text{C}$  utilizando PES com diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.**

<b>Condição</b>	<b>Variação de ácidos livres (<math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>	
	<b>4h</b>	<b>24h</b>
<b>Controle (sem PES)</b>	0,28	1,87
<b>0,04 U/mL de efluente</b>	2,15	3,17
<b>0,08 U/mL de efluente</b>	3,64	6,81
<b>0,16 U/mL de efluente</b>	5,60	8,21
<b>0,32 U/mL de efluente</b>	9,70	13,34

A produção de ácidos livres aumentou com a concentração/atividade enzimática e seguiu um comportamento similar em todas as condições avaliadas, o que indica que possivelmente os micro-organismos presentes no efluente não possuem atuação significativa na decomposição do mesmo a  $50^\circ\text{C}$ . Como o efluente sintético é composto apenas de água e sardinhas, a maior parte dos micro-organismos nele presentes faz parte da biota do próprio peixe. As partes utilizadas para produzi-lo, tais como as vísceras e cabeças, são as porções responsáveis pela maior parte da flora bacteriana, que geralmente fica concentrada nos intestinos e guelras dos peixes (ARGENTA, 2012). As sardinhas utilizadas na confecção deste efluente são provenientes do litoral brasileiro, ou seja, peixes de águas tropicais e, portanto, de temperaturas medianas. Argenta (2012) afirmou que a flora bacteriana encontrada nos frutos do mar acompanha os hábitos dos organismos nos quais vivem. Sendo assim, a maior parte das bactérias presentes nestes organismos seriam mesófilos confirmando a hipótese anterior.

Na Tabela 2 pode-se perceber que em 4h de hidrólise obteve-se a maior variação de ácidos livres para todas as atividades enzimáticas avaliadas. Valladão et al. (2007) utilizaram um *pool* enzimático de *P. restrictum* no tratamento de efluentes de abatedouros de aves com 1200 mgO&G/L e obtiveram uma variação máxima de  $7,3 \mu\text{mol/mL}$  de ácidos livres em 22 h de hidrólise utilizando 1% (m/v) de PES. Leal et al. (2006), utilizando efluente de laticínio com 1000 mg O&G/L e 0,1% do mesmo PES, obteve com 24h de hidrólise a  $35^\circ\text{C}$  um aumento no teor inicial de ácidos livres próximo de  $8 \mu\text{mol/mL}$ . Valente et al. (2010), utilizando 0,5 % (m/v) do mesmo PES deste trabalho, obteve  $4,7 \mu\text{mol/mL}$  em 8 h de hidrólise na melhor condição de produção de biogás. Neste trabalho, ao se utilizar uma atividade de 0,16 e 0,32U/mL de efluente, a produção de ácidos graxos livres foi de 5,6 e  $9,7 \mu\text{mol/mL}$  em 4 h de hidrólise. Tal resultado indica, pela avaliação dos resultados obtidos em trabalhos anteriores, que estas atividades enzimáticas seriam as melhores condições de hidrólise para a produção de metano.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia nas três bateladas consecutivas com o efluente não hidrolisado (Controle) e os efluentes previamente hidrolisados com 0,16 ou 0,32 U/mL. Na primeira e terceira bateladas a produção de biogás estabilizou em 72 h, enquanto na segunda batelada a produção demorou mais a estabilizar, necessitando de 96 h. Este tempo foi bem reduzido quando comparado, por exemplo, ao trabalho de Valente et al. (2010) que demorou cerca de 12 d para a completa estabilização da produção de biogás a 30°C. Verificou-se, em todas as três bateladas realizadas, que não houve fase *lag*, indicando que o lodo estava bem adaptado aos constituintes do efluente sintético, assim como à temperatura de 50°C.

**Tabela 3: Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para a utilização do PES com 0,16 e 0,32 U/mL de efluente e na condição Controle.**

Condição	DQO Inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Remoção de DQO (%)	Volume de biogás a 50°C (mL)	Percentual de Metano (%)	PEM média a 50°C (mL de CH <sub>4</sub> /g DQO removida)
<b>Primeira Batelada</b>						
<b>Controle</b>	6580 ± 10	284 ± 8	95,3	67,3 ± 5,8	74,0 ± 0,3	88
<b>0,16*</b>	7220 ± 200	318 ± 10	95,0	92,5 ± 10,0	68,0 ± 0,2	101
<b>0,32*</b>	8065 ± 250	341 ± 10	95,2	86,0 ± 9,0	72,0 ± 0,2	89
<b>Segunda Batelada</b>						
<b>Controle</b>	5865 ± 10	1040 ± 5	82,3	19,8 ± 1,0	43,5 ± 0,1	20
<b>0,16*</b>	7780 ± 110	1045 ± 10	86,6	74,3 ± 4,5	93,0 ± 0,1	114
<b>0,32*</b>	8600 ± 100	1060 ± 10	87,7	83,5 ± 4,7	82,0 ± 0,2	101
<b>Terceira batelada</b>						
<b>Controle</b>	7845 ± 15	2454 ± 20	68,72	4,3 ± 1,5	33,3 ± 0,5	3
<b>0,16*</b>	7590 ± 210	1972 ± 35	74,02	9,3 ± 3,5	53,7 ± 0,7	10
<b>0,32*</b>	7770 ± 160	2440 ± 25	68,60	9,5 ± 0,5	40,4 ± 0,4	8

\* U/mL de efluente

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 3, percebe-se que no primeiro contato do lodo com efluente contendo 1500 mg O&G /L, todas as condições avaliadas apresentaram remoções de DQO e percentuais de metano produzidos similares. No entanto, o Controle apresentou volume de biogás sempre menor que nos experimentos com efluente pré-tratado, embora a diferença tenha sido bem pequena, cerca de 22 mL. Já no segundo contato do lodo com o efluente, nota-se uma evidente queda no percentual de metano produzido no Controle, assim como no volume de biogás, diferentemente do que ocorreu para as demais condições nas quais houve o pré-tratamento enzimático. O Controle apresenta uma redução acentuada da produção de biogás, de 67,3, em média, para 19,8 mL (uma redução de 70,6%). Enquanto nos experimentos com efluente pré-tratado com 0,16 e 0,32 U/mL ocorre uma redução bem menor no volume de biogás produzido, de 20% e 3%, respectivamente. Estes resultados já eram esperados, pois no Controle há a adsorção de gorduras não hidrolisáveis na biomassa microbiana, o que prejudica a metabolização do material orgânico do efluente (ROLLÓN, 1999). Entretanto, nota-se que possivelmente também há um acúmulo de gorduras não hidrolisadas nas demais condições testadas, uma vez que há a diminuição na porcentagem de remoção de DQO em todas as condições.

No terceiro contato, apesar do Controle continuar mantendo produção de biogás menor que nos efluentes pré-tratados, a produção de biogás cai acentuadamente nas três condições avaliadas. Uma hipótese para tal resultado seria o acúmulo de gorduras no lodo anaeróbio em todas as condições testadas, pois houve uma diminuição significativa de todos os parâmetros avaliados em todas as condições. Valladão et al. (2007) observou um comportamento oposto ao deste trabalho, à medida que as bateladas eram conduzidas, a biomassa microbiana se tornava mais adaptada e, portanto, a produção de metano aumentava. Neste trabalho, no entanto, os resultados sugerem que o acúmulo de gordura supera a adaptação do lodo prejudicando a atuação destes micro-organismos na remoção de DQO e produção de metano.

A temperatura elevada é outro fator que pode ter interferido na produção de metano, pois a hidrólise termofílica pode liberar ácidos graxos de cadeia longa no meio reacional, conhecidos inibidores das arqueas metanogênicas (HATAMOTO et al., 2007). Ainda assim, com os resultados encontrados foi possível chegar à



melhor condição dentre todas testadas, sendo esta a de menor atividade enzimática. Em todas as bateladas, esta condição (0,16 U/mL de efluente) apresentou as melhores respostas de produção específica de metano – 101, 114 e 10 mL de CH<sub>4</sub>/g DQO removida - quando comparada às demais. Além de representar uma redução de aproximadamente 4,2 vezes na quantidade de enzima utilizada anteriormente por Valente et al. (2010) no seu tratamento, o que diminui os custos do processo.

Esta condição foi a que mais se aproximou do valor teórico máximo de PEM esperado, que leva em consideração o aproveitamento de toda a matéria orgânica introduzida apenas para a formação de metano, que é de 414 mL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>removida</sub> a 50°C. Valente et al. (2010), utilizando a melhor condição obtida pela autora em seus ensaios – 8h de hidrólise a 30°C utilizando 0,5% (m/v) PES – chegou ao valor de 216 mL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>removida</sub> a 30°C. Este valor corresponde a 230 mL CH<sub>4</sub>/g DQO<sub>removida</sub> a 50°C o que significa aproximadamente 56% do valor teórico máximo esperado. Porém, o valor de biogás alcançado foi muito maior (155 mL) do que o obtido no presente trabalho. Esta diferença pode ter acontecido devido à maior temperatura utilizada na hidrólise e nos ensaios de biodegradabilidade. Ou ainda ao efluente, uma vez que o efluente utilizado neste trabalho é sintético, enquanto o efluente utilizado por Valente et al. (2010) era industrial. Desta forma, uma comparação entre os dois trabalhos, utilizando o efluente sintético, tornou-se necessária para uma melhor avaliação de produtividade. Sendo assim, optou-se por repetir a melhor condição encontrada pela autora (Valente et al., 2010) e comparar com a melhor condição encontrada neste trabalho, empregando o efluente sintético.

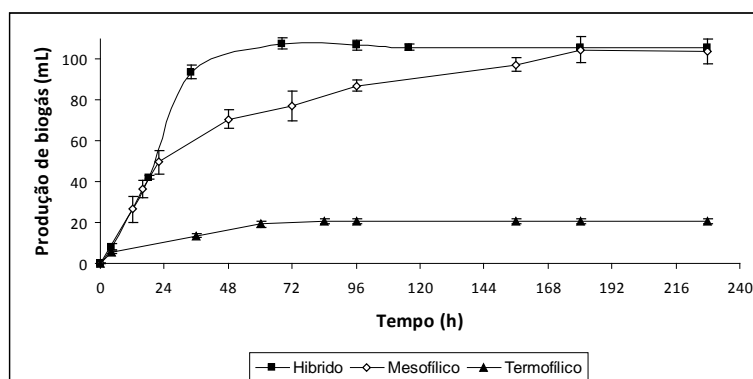
O elevado consumo energético para manutenção da temperatura de 50°C durante o tratamento anaeróbio pode ser um fator limitante para a viabilização deste processo nas indústrias. Ao mesmo tempo, a utilização desta temperatura para uma hidrólise de apenas 4h pode ser viável, considerando que os efluentes industriais são gerados a elevadas temperaturas e vazões. Estas condições possivelmente garantiriam a manutenção da temperatura durante o tempo necessário à hidrólise. Desta forma, sugeriu-se a realização de uma cinética mantendo-se a hidrólise a 50°C e verificando-se o tratamento anaeróbio a 30°C ou 50°C para fins comparativos com as demais condições testadas neste e no trabalho de Valente et al.(2010).

Para realizar estas cinéticas, lodos pré-adaptados às condições termofílica e mesofílica foram submetidos a três bateladas consecutivas com o efluente hidrolisado tanto a 50°C quanto a 30°C no tempo de 4 e 8h (Valente et al., 2010), respectivamente até que houvesse remoção de DQO acima de 80%. Sendo assim, os resultados que serão apresentados correspondem ao quarto contato do lodo com o efluente a 1500mg O&G/L, hidrolisado em cada uma das condições, de maneira a comparar os três tratamentos com o mesmo PES e efluente.

A produção de biogás nas três condições (termofílica, mesofílica e híbrida) ao longo do tempo é apresentada na Figura 1. Verifica-se que nos tratamentos híbrido e termofílico a produção de biogás estabilizou em torno de 68 h (2,8 d), diferentemente da condição mesofílica, que demorou cerca de 180 h (7,5 d) para a estabilização da produção de biogás. Valente et al. (2010) observaram a estabilização da produção de biogás nesta mesma condição em 12 d, o que provavelmente está relacionado ao emprego de um efluente industrial.

A condição termofílica, estudada inicialmente neste trabalho, não apresentou bons resultados, chegando a 20,9 ± 1,2 mL de biogás ou 18,8 mL de metano. Conforme visto anteriormente, na terceira batelada há uma drástica redução da produção de biogás, que se repete na quarta batelada e possivelmente em todas as seguintes. Mesmo assim, o tempo de estabilização da produção de biogás continua curto quando comparado ao tempo exigido pelo tratamento puramente mesofílico.

O valor mais próximo de 3 d para a estabilização da produção de biogás foi obtido por Silva (2011) que, ao sexto dia de ensaio, verificou que não havia mais produção de biogás sendo os quatro primeiros dias responsáveis pela maior diferença de produção. Mendes et al. (2006), por sua vez, ao utilizar uma hidrólise de 12 h a 35°C obteve a maior variação em 2 d de ensaio apesar de demorar 8 d para a estabilização da produção de biogás. A hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente e a conseqüente liberação dos ácidos graxos livres pode funcionar como um estímulo para os micro-organismos do lodo, acelerando o processo de tratamento anaeróbio (MENDES et al., 2006).

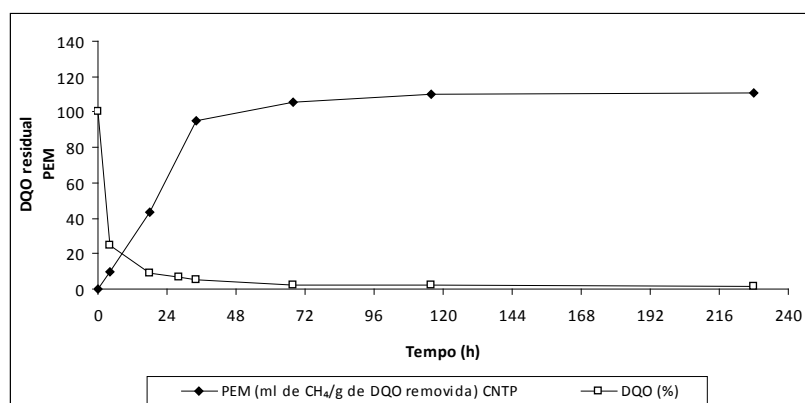


**Figura 1: Produção de biogás ao longo do tempo nas condições mesofílica, termofílica e híbrida.**

No caso do presente trabalho, apesar do tempo de hidrólise ser consideravelmente menor (apenas 4 h), a temperatura utilizada aumenta a velocidade da reação de hidrólise, possibilitando que em menos tempo haja a quebra das gorduras presentes no efluente em ácidos graxos livres e glicerol, que são moléculas mais simples de serem degradadas pelo consórcio microbiano acelerando o processo posterior de tratamento biológico anaeróbico. Além disso, o processo de digestão anaeróbia é facilitado quando o tratamento ocorre após uma hidrólise termofílica (ZHOU et al., 2013). Percebe-se na Figura 1 que nas primeiras 24 h de degradação a 30°C, os efluentes oriundos de hidrólises a 30°C ou 50°C mantêm a mesma velocidade de produção de biogás (cerca de 2,3 mL/h). No entanto, o efluente oriundo da hidrólise a 30°C a partir daí reduz gradativamente a velocidade de produção de biogás até a estabilização em 180 h. Enquanto o efluente oriundo da hidrólise a 50°C mantém a velocidade de produção de biogás por mais 20 h e estabiliza em seguida. Tal comportamento indica que a hidrólise a 50°C libera mais produtos de mais rápida assimilação pela população microbiana, o que é de extrema importância para o processo de tratamento anaeróbico.

Observa-se que a condição híbrida apresentou os melhores resultados de produção de biogás –  $106,0 \pm 1,7$  mL, sendo 95,5 mL de metano. Desta forma, uma maior temperatura de hidrólise permite produções de biogás tão altas quanto às encontradas na condição mesofílica –  $104,1 \pm 6,2$  mL de biogás ou 93,8 mL de metano, porém em tempos muito menores.

Uma comparação da produção específica de metano (PEM), calculada em condições normais de temperatura e pressão (CNTP), nas três condições, revela que na condição termofílica obtem-se uma PEM de  $19,5 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$ , valor muito abaixo do valor teórico ( $350 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$  nas CNTP). Tal resultado pode ser devido a uma baixa concentração de arqueas metanogênicas adaptadas a 50°C tenha permanecido no lodo, coletado em um reator operando na condição mesofílica. Na condição mesofílica uma PEM máxima de  $125 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$  foi obtida em 180 h de ensaio. Valente et al. (2010), ao utilizar efluente proveniente de indústria de pescado na condição mesofílica, obteve  $194,6 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$ . Isto indica que, possivelmente, os efluentes industriais podem ter componentes que auxiliam a conversão do material orgânico em metano. A condição híbrida (Figura 2) apresentou PEM máxima de  $110,6 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$  em 228 h. No entanto, em apenas 68 h já havia atingido um valor de  $105,4 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$ , diferentemente do que ocorreu na condição mesofílica na qual somente em 96 h valores próximos do máximo ( $98,6 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}_{\text{removida}}$ ) foram atingidos. Quanto à remoção de DQO, em apenas 4 h de ensaio, a DQO residual chegou a 25% da inicial, o que significa uma redução de DQO de 75%. Em 28 h a remoção já havia atingido 93,3%, em 116 h atingiu o patamar de 97,9% chegando em 98,2% em 228 h. Em 68 h houve uma remoção de DQO de 97,5% e a PEM atingiu níveis próximos ao máximo obtido no tempo do ensaio. Sendo assim, um tempo de 68 h seria suficiente para que o efluente chegasse aos níveis desejados.



**Figura 2: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbica na condição híbrida: produção específica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.**

Tais resultados sugerem que o fator limitante para a diminuição do tempo de tratamento não está na biodegradabilidade anaeróbica termofílica, mas sim na hidrólise termofílica. Esta última provavelmente promove a liberação de componentes que auxiliam na biodegradabilidade do efluente (ZHOU et al., 2013) e também na formação de metano, além de permitir a utilização de menores quantidades de enzima.

Desta forma, os resultados observados nas cinéticas de PEM e remoção de DQO levam a crer que a hidrólise a 50°C, além de reduzir a atividade enzimática e diminuir o tempo de reação, pode ser a chave para a aceleração de um tratamento biológico anaeróbio mesofílico posterior, que por ser conduzido a temperaturas medianas não representaria aumento nos custos do processo. Tal processo pode ser conduzido à temperatura ambiente, devido às condições ambientais brasileiras, que garantem uma temperatura elevada na maior parte do tempo. Mesmo que a temperatura de hidrólise tenha de ser mantida, possivelmente o maior consumo energético seria compensado com a diminuição do tempo de tratamento como um todo. O que torna tal condição um importante alvo para estudos de escalonamento do processo visando sua posterior aplicação industrial.

## CONCLUSÕES

Hidrólises realizadas a 50°C com efluente sintético com características semelhantes aos efluentes industriais, utilizando cabeças, vísceras, caudas e ossos de *Sardinella sp*, mostraram que após 4h com 0,32 e 0,16 U/mL de PES obteve-se concentrações de ácidos livres dentro da faixa utilizada em vários trabalhos para melhores respostas no tratamento biológico anaeróbio posterior. Fator este que leva à relevante redução da quantidade de enzima, em comparação à hidrólise conduzida a 30°C.

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbica termofílica demonstraram que a menor quantidade de enzima avaliada (0,16 U/mL) levou a maiores valores de PEM. Com o aumento no número de bateladas, ocorreu uma diminuição na remoção de DQO, produção de metano e também na PEM, sendo estes resultados mais agravados no Controle, no qual uma brusca redução na PEM ocorreu a partir da segunda batelada.

A PEM nos ensaios com pré-hidrólise e tratamento anaeróbio a 50°C foi maior que nos ensaios Controle. Apesar disto, os resultados obtidos sob condições termofílicas foram inferiores aos obtidos a 30°C. No entanto, ao se avaliar uma condição híbrida, na qual a hidrólise a 50°C foi mantida e o tratamento biológico anaeróbio foi conduzido a 30°C, obteve-se os mesmos resultados encontrados a 30°C, porém em 68 h de ensaio. O que indica que este tratamento pode ter relevância significativa para a aplicação em sistemas industriais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, AWWA, WPCF, 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19<sup>th</sup> edition, New York.
2. ARGENTA, F.F., 2012, Tecnologia de pescado: Características e processamento da matéria prima, Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto alegre, Brasil, 60p.



3. CHAN, Y. J., CHONG, M. F., LAW, C. L. & HASSEL, D. G., 2009, A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater, *Chemical Engineering Journal*, v. 155, p. 1-18.
4. CHERNICHARO, C. A. L., 2007, Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 2ª edição, v. 5: Reatores Anaeróbios. DESA/UFGM.
5. CHOWDHURY, P., VIRARAGHAVAN, T. E SRINIVASAN, A., 2010, Biological Treatment processes for fish processing wastewater – A Review, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 439 - 449.
6. EIROA, M., COSTA, J.C., ALVES, M.M., KENNES, C., VEIGA, M.C., 2012, Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste, *Waste Management*, v. 32, p. 1347 – 1352.
7. FREIRE, D.M. G., TELES, E.M. F., BON, E. P. S., SANT'ANNA, G. L. JR., 1996, "Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration" *Applied Biochemistry and Biotechnology* v.63, p. 429 – 421.
8. GUTARRA, M.L.E., GODOY, M.G., SILVA, J. N., GUEDES, I.A., LINS, U., CASTILHO, L.R. E FREIRE, D.M.G., 2009, Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations, *Biotechnology Journal*, v. 4, p.1450 - 1459.
9. GUTARRA, M.L.E., CAVALCANTI, E.D.C., FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JR, G.L., 2005, Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 105-116.
10. HATAMOTO, M., IMACHI, H., OHASHI, A., HARADA, H., 2007, Identification and Cultivation of Anaerobic, Syntrophic Long-Chain Fatty Acid-Degrading Microbes from Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludges, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, pp. 1332 - 1340.
11. KRISHNA, C., 2005, Solid-State fermentation systems- an overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 25, p. 1-30.
12. MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., CASTRO, H. F., 2006, Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion, *Biochemical Engineering Journal*, v. 32 p. 185–190.
13. ROLLON, A. P. Anaerobic digestion of fish processing wastewater with especial emphasis on hydrolysis of suspended solids. London: Taylor & Francis, 1999.
14. ROLLON, A. P., ZEEMAN, G., LUBBERDING, H.J., LETTINGA, G., ALAERTS, G.J., 2002, Treatment of fish processing wastewater in a one- or two-step upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, *Water Sci. Technol.*, v. 45 (10), p. 207–212.
15. SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C., 2001, Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662.
16. SILVA, J.N., 2011, Otimização da extração de lipase de *Penicillium simplicissimum* obtida por fermentação em estado sólido e aplicação na hidrólise de efluente com elevado teor de gordura. Monografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de química. Rio de Janeiro, Brasil, 77p.
17. VALENTE, A. M., 2009, Aplicação de enzimas hidrolíticas no tratamento biológico anaeróbio de efluente de indústria de pescado. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 111p.
18. VALENTE, A.M., ALEXANDRE, V.M., CAMMAROTA, M. C. e FREIRE, D.M.G., 2010, Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30 (2), p. 483 - 488.
19. VALLADÃO, A. B. G., FREIRE, D. M. G., CAMMAROTA, M. C., 2007, Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses, *International Biodeterioration & Biodegradation* v.60 p. 219–225.
20. ZHOU, Y., TAKAOKA, M., WANG, W., LIU, X. e OSHITAL, K., 2013, Effect of thermal hydrolysis pre-treatment on anaerobic digestion of municipal biowaste: A pilot scale study in China *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press.