



AValiação DA EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS E DE LIPASE SUÍNA NO PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CURTUME

Vívian de Oliveira Lima¹
Kátia Valeria Marques Cardoso Prates²
Ajadir Fazolo³

RESUMO

Diversas indústrias, dentre elas o Curtume, geram efluentes com elevado teor de óleos e gorduras (O&G). Tais compostos podem prejudicar o desempenho dos sistemas biológicos de tratamento. Por esse motivo, a remoção preliminar de O&G é recomendada, sendo a hidrólise enzimática de lipídios uma opção promissora no pré-tratamento de águas residuárias como alternativa ao uso de métodos físico-químicos. Este trabalho comparou a eficiência de bactérias lipolíticas isoladas em caixa de gordura com a lipase de pâncreas de porco e o produto comercial Enzilimp® no pré-tratamento do efluente de curtume em escala laboratorial. Realizaram-se dois ensaios preliminares para avaliar a influência da concentração dos inóculos, da diluição do efluente e da aeração. Posteriormente fez-se um estudo de otimização utilizando o Delineamento do Composto Central Rotacional, avaliando a influência da temperatura, da concentração do inóculo, da concentração do efluente e do pH. Concluiu-se que o efluente da graxaria do curtume é fonte potencial de bactérias lipolíticas e que tais cepas isoladas apresentam resultados de degradação de gordura semelhantes ao Enzilimp®. A atividade dos microrganismos é influenciada principalmente pela temperatura e pH, promovendo reduções de DQO e de O&G na ordem de 3,6 gO₂.L⁻¹ e 2,6 g.L⁻¹, respectivamente, em temperaturas próximas a 32°C e em uma faixa de pH de 8,0 a 8,5. Já a eficiência da lipase se mostrou diretamente relacionada à concentração do inóculo e do efluente no sistema, com reduções máximas de 7,8 gO₂.L⁻¹ e 2,5 g.L⁻¹ de DQO e O&G. Apesar dos melhores resultados, a lipase provoca aumento inicial da DQO e elevada acidificação do sistema. Além disso, os ensaios com esse inóculo tiveram baixa adequação ao modelo obtido pelas análises do DCCR. Assim é necessário avaliar os sistemas de pós-tratamento para escolher o melhor método de pré-tratamento aqui mencionados.

Palavras-chave: Lipase. Óleos e gorduras. Pré-tratamento. Bactéria lipolítica.

¹ Licenciada e bacharel em Ciências Biológicas, mestre em Engenharia Ambiental, doutoranda no programa de Microbiologia Agropecuária. Atualmente atua como Professora de Educação Básica, Técnica e Tecnológica (EBBT) no Instituto Federal de São Paulo (IFSP Câmpus Matão).

<http://orcid.org/0000-0002-5608-1634> E-mail: vlimabio@hotmail.com

² Graduada em Ciências Biológicas, Doutora em Ciências da Engenharia Ambiental. Docente na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina. E-mail: kprates@utfpr.edu.br

³ Graduado em Engenharia Sanitária, Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Docente na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina. E-mail: afazolo@utfpr.edu.br

EFFICIENCY ASSESSMENT OF LIPOLYTIC BACTERIAS AND PORCINE LIPASE IN PRE-TREATMENT OF TANNERY EFFLUENT

ABSTRACT

Several industries, among them the Tannery, generate effluents with high content of oils and grease (O&G). Such compounds can cause operational problems and interfere with the performance of biological treatment systems. For this reason, preliminary O&G removal is generally recommended. Enzymatic lipid hydrolysis has been shown to be promising in wastewater pretreatment as an alternative to the use of physicochemical methods. The objective of this work was to isolate lipolytic bacteria from the effluent of the tanning grease, to apply them in the pretreatment of this effluent in laboratory scale and to compare its effects with the commercial product Enzilimp® and with PPL enzyme (porcine pancreas lipase - Sigma Aldrich®). Three lipase producing strains were isolated. The MEG (positive staphylococci) strain, which presented a higher enzymatic index, was used in the tests. Two preliminary tests were carried out to evaluate the influence of inoculum concentration, the effects of effluent dilution and aeration. An optimization study was carried out using the Rotational Central Compound Design (RCCD), evaluating the influence of temperature, inoculum concentration, effluent concentration and pH for the COD_t, CODs, O&G and Acidity Index during 48 hours in a fermentative system and then 24 hours in an aerated system. At the end of the experiment it was concluded that the effluent from tannery grease is a potential source of lipolytic bacteria and that such isolated strains have similar behavior to Enzilimp®. The activity of the microbial enzymes is favored at temperatures close to 32 ° C and in a pH range of 8.0 to 8.5, promoting COD and O&G reductions in the order of 3.6 gO₂.L⁻¹ and 2,6 g.L⁻¹, respectively. The efficiency of the PPL enzyme was directly proportional to the concentration of inoculum and effluent in the system, with maximum reductions of 7.8 gO₂.L⁻¹ and 2.5 g.L⁻¹ of COD and O&G, respectively. Despite the better results with PPL, it causes initial COD increase and high acidification of the system. In addition, the assays with this inoculum had low adequacy to the model obtained by the RCCD analysis.

Keywords: Lipase. Oils and grease. Pre-treatment. Lipolytic bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Residências, restaurantes e outros estabelecimentos comerciais geram efluente que contém quantidades significativas de óleos e gorduras (O&G). Os efluentes industriais como os de laticínios, abatedouros, curtumes, refinarias, produtoras de óleos vegetais (soja, girassol, oliva, etc.) e biodiesel também podem conter elevada carga orgânica devido à presença de compostos lipídicos (MASSE,

KENNEDY E CHOU, 2001; EL-BESTAWY, EL-MASRY, EL-ADL, 2005; RAMANI, CHOCKALINGAM, SEKARAN, 2010; PRASAD E MANJUNATH, 2011; ROCHA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Águas residuárias com essas características, quando lançados em sistemas de tratamento convencional podem gerar problemas operacionais, reduzindo a eficiência e/ou entupindo tubulações de distribuição e aeração, danificando o sistema. Em sua maior parte, esses efluentes são lançados no corpo hídrico ou dispostos no solo sem receber tratamento adequado (OLIVEIRA et al., 2014). Porém no Brasil, as resoluções estabelecem como padrão máximo de lançamento em corpos d'água 50 mg.L⁻¹ de óleos e gorduras (O&G) (CONAMA 430/2011).

Tratamentos de efluente convencionais, físico-químicos e biológicos, apresentam baixa eficiência na remoção de O&G, e por isso têm-se estudado a realização de pré-tratamento enzimático para a degradação dos compostos lipídicos (MENDES, PEREIRA E CASTRO 2006; ROSA, CAMMAROTA E FREIRE 2006; MOBARAK-QUAMSARI et al. 2012). Ao contrário dos produtos químicos já utilizados nos tratamentos físico-químicos, o uso de enzimas tem possibilitado aumentar a eficiência de diversos processos industriais com menores riscos de impacto ambiental. Isso ocorre devido à especificidade que as enzimas apresentam com seu substrato (MENDES et al., 2005). A utilização dessas enzimas nos sistemas de pré-tratamento de águas residuárias além de ajudar na remoção de filmes oleosos em tubulações, aumentando a vida útil dos equipamentos, também proporciona redução de sólidos suspensos e triglicerídeos, garantindo melhores condições de tratamento em sistemas biológicos, uma vez que a ação microbiana será favorecida, tendo acesso às moléculas que são mais facilmente consumidas, tornando assim o tratamento mais eficiente (VALENTE et al., 2010). Trabalhos como o de Masse, Kennedy e Chou (2001) demonstram que o uso de enzimas no pré-tratamento de efluente lipídico com 2,5 a 3,0 g.L⁻¹ de O&G reduz em 60% o tamanho das partículas e o aumento da concentração de ácidos graxos livres, indicando a solubilização da gordura da água residuária de abatedouros.

Dentre as lipases utilizadas comercialmente, as de origem microbiana (bacteriana e fúngica) apresentam maior viabilidade comparada às de origem vegetal e animal. Isso devido à diversidade metabólica dos micro-organismos, a variedade de cepas produtoras existentes, a facilidade de manipulação gênica desses organismos, o rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo, além

da maior estabilidade da enzima (WISEMAN, 1995 apud HASAN, SHAH E HAMEED, 2006).

No Brasil, um dos ramos empresariais que mais se destaca como fonte poluidora e que gera efluentes com elevada concentração de lipídios são os curtumes. Esse potencial poluidor se deve pois, segundo a ABIEC (2014), o país possui o maior rebanho comercial do mundo, com 213,3 milhões de cabeças de gado de corte (BRAZILIAN LEATHER, 2013). Só entre os anos de 2000 e 2012 a produção de couro bovino aumentou 33%, atingindo em 2012 a produção de 40 milhões de couros, representando 12,7% de toda a produção mundial (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2014).

Com isso, esse trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do pré-tratamento de efluente lipídico de curtume utilizando lipases microbianas isoladas do próprio efluente, lipases microbianas comerciais e lipase purificada de pâncreas de porco.

2 MATERIAL E MÉTODOS



2.1 Água residuária

A água residuária utilizada foi obtida em um curtume no município de Rolândia, PR, proveniente da etapa de pré-descarne do couro (graxaria). As amostras foram coletadas em recipientes estéreis e armazenados sob refrigeração à 4°C.

2.2 Lipase e Microrganismos lipolíticos

Para os estudos de pré-tratamento do efluente de graxaria de curtume, foram testadas ações de enzimas comerciais purificadas e microrganismos produtores de lipase. A enzima utilizada foi a lipase extraída de pâncreas de porco (LPP Tipo II), comercializada por Sigma Aldrich®.

O produto comercial Enzilimp® foi utilizado como fonte de microrganismos lipolíticos. Segundo o fabricante, o produto contém farelo de trigo, cloreto de sódio e duas espécies de bactérias: *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, que atuam na degradação de resíduos orgânicos poluentes. O produto é indicado na remoção de

matéria orgânica da caixa de gordura de restaurantes e cozinhas industriais, rede de esgoto de residências e em estações de tratamento de esgoto (ETE).

Outra fonte de microrganismos lipolíticos foi obtida do efluente da graxaria de curtume (MEG). Amostras desse resíduo passaram por diluição seriada em solução salina 0,8%. Das diluições, inoculou-se 100 µL em meio de cultura sólido estéril contendo 1,0 (NH₄)₂SO₄, 1,0 extrato de levedura, 0,2 KH₂PO₄, 0,2 MgSO₄ · 7H₂O, 1,0 óleo vegetal, 18,0 ágar (g.L⁻¹). Os meios foram incubados à 37 °C por 24 horas.

As colônias isoladas do efluente de curtume foram submetidas ao Teste de Lipase (EL-BESTAWY et al., 2005) para seleção dos microrganismos produtores dessa enzima. As colônias lipase positivas foram submetidas à análise de Gram, morfologia e testes bioquímicos: catalase, tríplice açúcar ferro (TSI) e motilidade (MIL). O índice enzimático (IE) dos microrganismos foi obtido após 72 horas de incubação e calculado como a média entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro do halo de crescimento (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975). A cepa com maior IE foi selecionada para produção dos inóculos utilizados no pré-tratamento da água residuária.

2.3 Produção de Inóculos Microbianos

Para a preparação dos inóculos com MEG, a cepa lipolítica com maior IE foi primeiramente inoculada em 50 mL de solução de ativação estéril contendo: 1,0 (NH₄)₂SO₄, 1,0 extrato de levedura, 0,2 KH₂PO₄, 0,2 MgSO₄ · 7H₂O e 1,0 óleo vegetal (g.L⁻¹). O meio de ativação foi mantido sob agitação à 150 rpm a 35°C por 24 horas. Após ativação, produziu-se o pré-inóculo, adicionando 0,5 mL da solução de ativação em 50 mL de efluente de curtume estéril, mantidos sob as mesmas condições de incubação descritas anteriormente ao longo de 12 horas. Por fim, o inóculo foi obtido adicionando 1 mL do pré-inóculo em 100 mL de efluente de curtume estéril mantidos sob as mesmas condições de incubação e tempo da etapa anterior.

O inóculo de Enzilimp® foi preparado diluindo o produto em água estéril utilizando a concentração indicada pelo fabricante (4 g.L⁻¹) para ativação. As demais etapas de produção de pré-inóculo e inóculo foram as mesmas descritas anteriormente.

A concentração de células dos dois tipos inóculo foi mensurada por diluição em série e plaqueamento em meio de cultura sólido. Após incubação em estufa por

24 horas a 37°C foram contabilizadas o número de unidades formadoras de colônia (UFCs).

2.4 Pré-tratamento do efluente de graxaria de curtume

O primeiro ensaio avaliou a influência de diferentes concentrações de inóculos bacterianos e enzimáticos no pré-tratamento. Os testes foram preparados em tubos de vidro de 375 mL, mantidos por 72 horas em agitador incubador a 30 °C, 150 rpm e com pH inicial igual a 7,0. O segundo ensaio avaliou o efeito da diluição do efluente e da aeração, mantendo concentrações dos inóculos constantes. Nas primeiras 48 horas os tubos foram mantidos sob as mesmas condições de incubação do ensaio anterior. Nas 24 horas seguintes os frascos foram transferidos para um sistema de banho-maria a 30°C. Cada ensaio recebeu aeração individual utilizando bombas conectadas em mangueiras de silicone com difusores porosos em cada uma das ramificações. Demais informações referentes aos dois ensaios encontram-se descritos na Tabela 1.

2.5 Análises físico-químicas

Para caracterização do efluente foram realizadas as análises físico-químicas segundo metodologia APHA (2005), avaliando pH, condutividade, DQO total (DQOt), DQO solúvel (DQOs), sólidos totais (ST), sólidos fixo (SF), sólidos voláteis (SV), nitrogênio amoniacal e nitrogênio total. Além disso, avaliou-se também o teor de óleos e gorduras (O&G) (SUEHARA et al., 2005) e o índice de acidez (IA) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Tabela 1: Condições aplicadas nos ensaios de pré-tratamento do efluente de graxaria de curtume.

Ensaio	Inóculo	Concentração do Inóculo	DQO (g L ⁻¹)	Tempo de ensaio (h)	Frequência amostragem
1	MEG	10, 50 e 100 mL L ⁻¹	44-50	72	0h
	Enzilimp®				24h
	Enzima	10, 30 e 50 g L ⁻¹			48h
	LPP				72h
2	MEG	50 mL L ⁻¹	4,5-5,0	48	0 h
	Enzilimp®				48 h
	Enzima	10 g L ⁻¹		24 de aeração	72 h
	LPP				

2.6 Otimização do experimento

Com base nos resultados anteriores, foram realizados ensaios seguindo-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com quatro variáveis independentes e 6 repetições no ponto central, resultando em 30 ensaios. Os valores de referência das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental

Variáveis		Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
Temperatura (°C)		25,0	27,5	30,0	32,5	35,0
pH		7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Concentração inóculo	MEG (mL.L ⁻¹) (v/v %)	20 (2%)	40 (4%)	60 (6%)	80 (8%)	100 (10%)
	LPP (g.L ⁻¹) (p/v %)	2 (0,2%)	4 (0,4%)	6 (0,6%)	8 (0,8%)	10 (1,0%)
Diluição do efluente (mL.L ⁻¹)		12,5	25,0	37,5	50,0	62,5

Nesses 30 ensaios, o volume total de efluente e inóculo foi igual a 300 mL para cada tratamento. Os tubos foram armazenados em agitador incubador por 48 horas a 150 rpm, variando temperatura, pH, concentração do inóculo e concentração do efluente conforme determinado nos tratamentos do DCCR. Posteriormente os tubos foram mantidos em banho maria com aeração por 24 horas. A vazão de ar foi controlada visualmente por meio de pequenos registros individuais em cada frasco. As amostras para análises físico-químicas foram coletadas em 0h, 48h e 72 h de experimento.

As variáveis respostas analisadas foram DQOt, DQOs, teor de O&G e IA. Para determinar o efeito das variáveis independentes, realizou-se análises de variância (ANOVA) e produção das curvas de contorno, ao nível de significância de 0,1 utilizando o software STATISTICA 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química inicial do efluente estudado encontra-se descrita na Tabela 3, indicando um efluente com elevado teor de O&G e DQO.

Tabela 3: Caracterização físico-química da água residuária obtida da caixa de gordura de curtume

pH	Temp. (°C)	Condutividade (mS.cm ⁻¹)	O&G (g.L ⁻¹)	NTK (gN.L ⁻¹)	N amoniacal (gN.L ⁻¹)	DQO (gO ₂ .L ⁻¹)	ST (g.L ⁻¹)	SF (g.L ⁻¹)	SV (g.L ⁻¹)
6,31	70	6,10	17,14	1,81	0,56	44-50	27,34	1,70	25,64

A partir das amostras do efluente, foi possível isolar 3 cepas bacterianas produtoras de lipase. As morfologias, o IE e sua caracterização bioquímica estão descritos na Tabela 4. Para os ensaios de pré-tratamento foi selecionada a cepa de estafilococos positivo, por apresentar maior IE.

Tabela 4: Morfologia das cepas isoladas e seus respectivos índices enzimáticos (IE) e resultado dos testes bioquímicos de catalase, motilidade (MIL) e tríplice açúcar ferro (TSI).

Morfologia	Coloração de Gram	IE	Catalase	Mil	TSI
Estafilococo	+	1,53 – 1,68	-	-	Capaz de degradar apenas glicose
Estreptobacilo	+	1,06 – 1,33	+	+	Capaz de degradar glicose, sacarose e lactose.
Bacilo	-	1,26 – 1,37	+	+	Capaz de degradar glicose, sacarose e lactose. Com produção de gás.

Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental

A morfologia e as características dos três organismos isolados do efluente de curtume se aproximam das de microrganismos lipolíticos mais frequentemente citados na literatura, como a *Pseudomonas aeruginosas*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2015; PEIL et al., 2016; PRASAD E MANJUNATH, 2011; MOBARAK-QAMSARI et al., 2012). Nesses estudos os micro-organismos também foram isolados do ambiente como solos contaminados com óleos e gorduras, efluentes industriais e resíduos alimentícios.

No primeiro ensaio, observou-se que a enzima comercial LPP provoca maior taxa de hidrólise dos lipídios comparado aos inóculos microbianos, elevando o IA já no início do experimento (Figura 1). A hidrólise enzimática acentuada pode ser resultado da maior biodisponibilidade da enzima no meio, uma vez que as enzimas bacterianas levariam um certo tempo para serem sintetizadas e excretadas. A redução dos ácidos após 48 horas de ensaio com enzima LPP pode ser indicativo da redução dos compostos hidrolisáveis, prevalecendo o consumo desses produtos

intermediários pela microbiota naturalmente existente no efluente em relação à sua geração. Nos ensaios com inóculos microbianos, observou-se que a bactéria isolada (MEG) teve comportamento semelhante ao produto comercial (Enzilimp), promovendo redução do IA. Neste caso, é provável que a velocidade de consumo dos ácidos tenha sido superior a de formação, não havendo acúmulo no sistema.

Em um sistema de pré tratamento, o uso de enzimas é favorável por disponibilizar mais rapidamente uma concentração elevada de compostos intermediários mais facilmente consumíveis em tratamentos aeróbios e anaeróbios. Em condições anaeróbias é importante verificar se o resíduo irá apresentar alcalinidade suficiente para tamponar a acidificação do sistema provocada pela hidrólise enzimática e não desestabilizar o sistema de tratamento. É provável que o uso de inóculos microbiano em efluentes com elevada concentração de O&G exija maior tempo de detenção hidráulica, sendo necessário verificar a viabilidade do mesmo no processo industrial.

Avaliando a concentração de O&G no efluente (Figura 2) observa-se de modo geral uma tendência na redução da concentração. Observou-se a redução de 50% de óleos e gorduras após 72h com Enzilimp® a 1%, MEG a 5% e enzima LPP a 1%. No trabalho de Rocha e colaboradores (2013) foram obtidas eficiências de remoção de 80%, após 48 horas, em sistema fermentativo inoculado com bactérias isoladas a partir da água de lavagem de biodiesel (O&G inicial de 6,7 g.L⁻¹).

A quantidade excessiva de gordura no efluente do curtume pode ser fator limitante na eficiência de conversão e remoção lipídica. O trabalho de Jung, Cammarota e Freire (2002) demonstrou redução da eficiência do tratamento biológico do efluente conforme aumentava a concentração de lipídios, apresentando eficiência de remoção de DQO nula quando a concentração de óleos e gorduras aplicada foi igual ou superior a 800 mg.L⁻¹. Além disso, a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Com isso o trabalho de Rooney e Weatherley apud Mendes e colaboradores (2005) revelaram que quanto menor a razão óleo/água maior será a extensão da hidrólise. O excesso de óleos e gorduras, em especial ácidos graxos de cadeia longa, também poderia gerar efeitos inibidores no crescimento dos microrganismos anaeróbios e na produção de enzima, desestabilizando o sistema de pré-tratamento (VALENTE et al., 2010).

Figura 1: Variação temporal do Índice de Acidez (IA) dos testes com diferentes concentrações de inóculos.

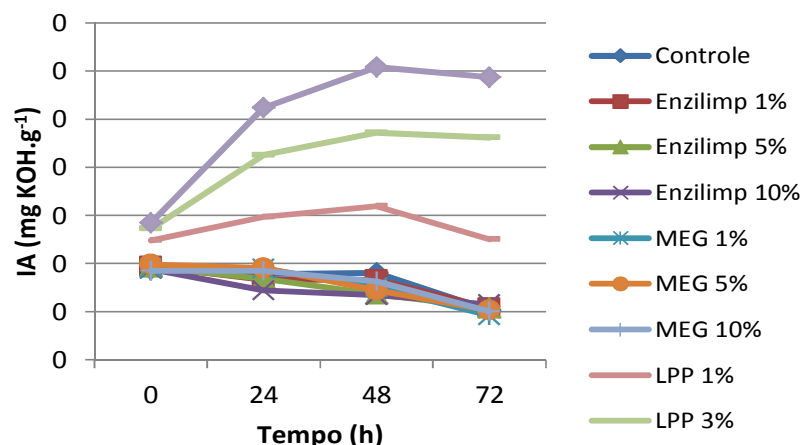
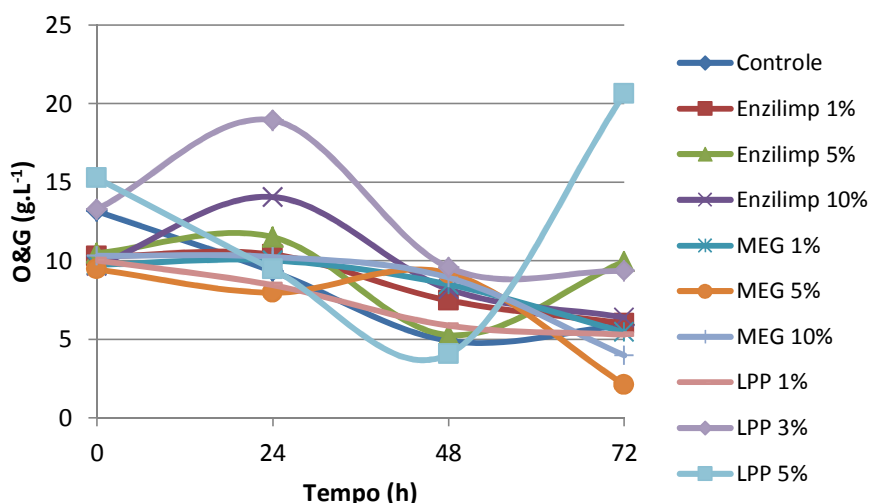


Figura 2: Variação temporal do teor de Óleos e Gorduras (O&G) dos testes com diferentes concentrações de inóculos.



Nos ensaios, notou-se que nas primeiras 24 horas houve aumento da DQOt para os três tipos de inóculo (Figura 3). Segundo Aquino e colaboradores (2006), a análise de DQO, baseada na digestão ácida dos compostos lipídicos, gera valores medidos menores que os teóricos, uma vez que o dicromato de potássio pode não oxidar completamente as moléculas complexas. De acordo com esses autores, a DQO experimental média do óleo de soja ($1,60 \text{ g DQO.g óleo}^{-1}$) foi 53% da DQO teórica do ácido graxo palmítico ($\text{C}_{51}\text{H}_{98}\text{O}_6$) utilizado no teste ($2,97 \text{ gDQO.glipídeo}^{-1}$). No efluente avaliado neste estudo, obteve-se relação de $2,2 \text{ g DQOt.gO\&G}^{-1}$, valor inferior ao típico teórico para lipídeos. Assim, possivelmente, após sofrer hidrólise pela ação dos microrganismos, os triacilglicerídeos podem ter sido fragmentados em

moléculas menores, favorecendo a oxidação pelo dicromato de potássio. Com relação à aplicação de enzima LPP, em geral, são relatadas na literatura adições de até 0,5% (p/v) em concentrações de O&G inferiores a 4,7 g.L⁻¹ (MENDES E CASTRO, 2005; DORS, 2013; MENDES, PEREIRA E CASTRO, 2006). Nesta pesquisa, com concentração inicial de O&G na faixa de 17 g.L⁻¹, optou-se por inocular quantidades maiores de 1%, 3% e 5% (p/v). Como consequência, verificou-se que os constituintes da enzima LPP contribuíram para a elevação dos valores iniciais de DQO. Tomando-se por base os valores medidos de DQO das amostras do efluente coletadas, momentos antes e depois da inoculação da enzima, pode-se estimar acréscimos na ordem de 1,10 gDQOt e 0,66 g DQOs por g de enzima.

A avaliação do potencial dos inóculos apenas pelas reduções de DQOt e DQOs pode não refletir as alterações ocorridas no meio, pois o processo de hidrólise não altera o estado de oxidação dos carbonos. Assim, a estimativa das frações solubilizadas ao longo dos experimentos, dada pela relação entre a DQOs e a DQOt pode indicar mudanças na estrutura da matéria orgânica. A Figura 4 exibe o comportamento da fração de DQOs, podendo-se verificar que, em todos os experimentos com inóculos bacterianos ocorreu aumento da solubilização. Os melhores resultados foram obtidos pelos inóculos Enzilimp® 1% e MEG 5%, com valores iniciais de 0,55 e máximos de 0,80, em 48 h de experimento e pequeno consumo das substâncias solubilizadas após este período.

No segundo experimento, mantendo a concentração fixa do inóculo, com um efluente com menor concentração e realizando a aeração nas últimas 24 horas observou que a aeração favoreceu o aumento do índice de acidez, especialmente para os inóculos microbianos (Tabela 5). Nas primeiras 48 horas os resultados mantiveram o padrão do ensaio anterior para os três diferentes inóculos.

Figura 3: DQO total em função do tempo de ensaio e da concentração dos inóculos.

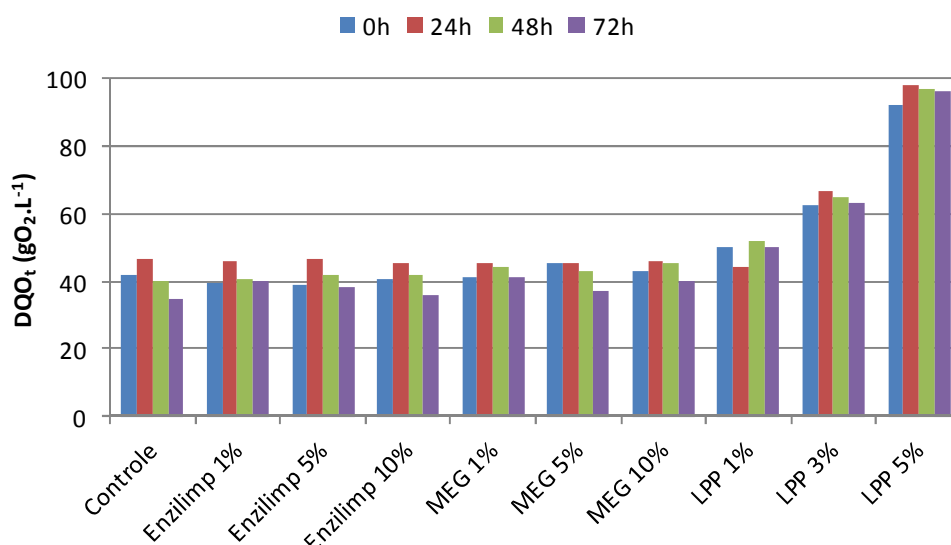
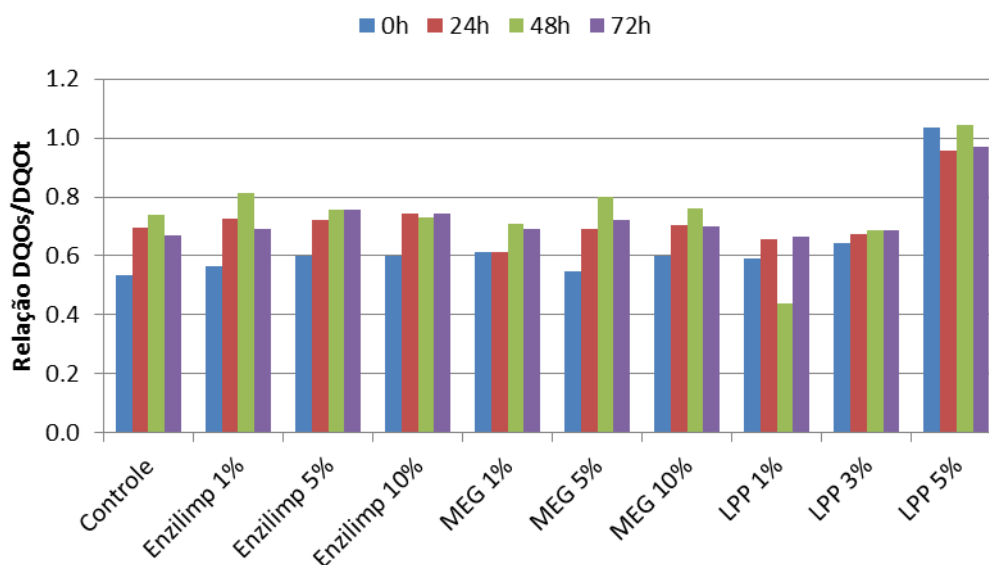


Figura 4: Relação de DQOs/DQOt ao longo do tempo e do tipo e concentração dos inóculos.



Nos ensaios com inóculos microbianos, a redução de O&G (Figura 5) e DQOt (Figura 6) foi maior nas primeiras 48 horas, reduzindo em 59% e 57% de O&G e em 44% e 31% de DQOt para MEG e Enzilimp®, respectivamente. Já nos ensaios com inóculo enzimático a redução de O&G e DQOt foi maior no período aerado. Porém a eficiência global da enzima na remoção de O&G e DQOt foi aproximadamente 30% menor que a eficiência global de MEG.

Tabela 51: Variação percentual (V%) do IA. Comparação dos ensaios conduzidos com efluente in natura e aqueles conduzidos com efluente diluído.

Inóculo	In natura			Diluída		
	Fermentação		Global	Fermentação		Global
	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h
Controle	-3,7	-43,2	-45,3	7,8	17,7	26,9
Enzilimp®	-29,5	-21,3	-44,6	-22,9	27,5	-1,6
MEG 5%	-27,7	-28,3	-48,1	-42,8	52,0	-13,1
LPP 1%	28,9	-21,5	1,2	73,9	9,4	90,2

Figura 5: Variação de O&G no segundo ensaio contendo efluente de curtume diluído.

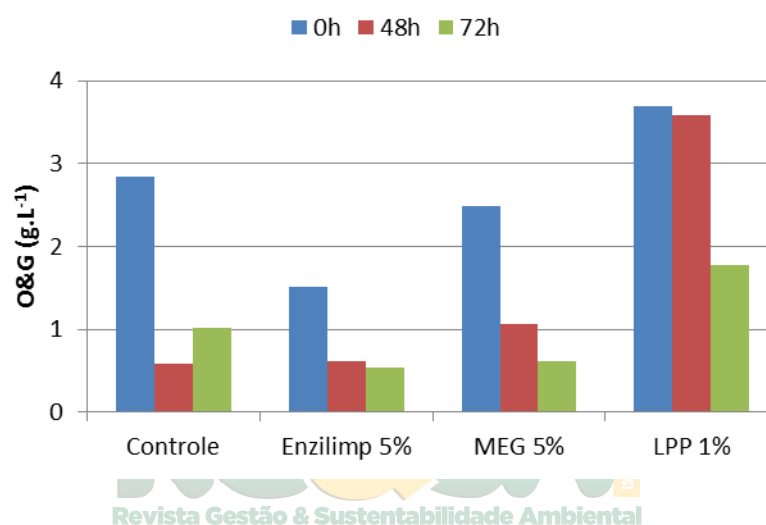
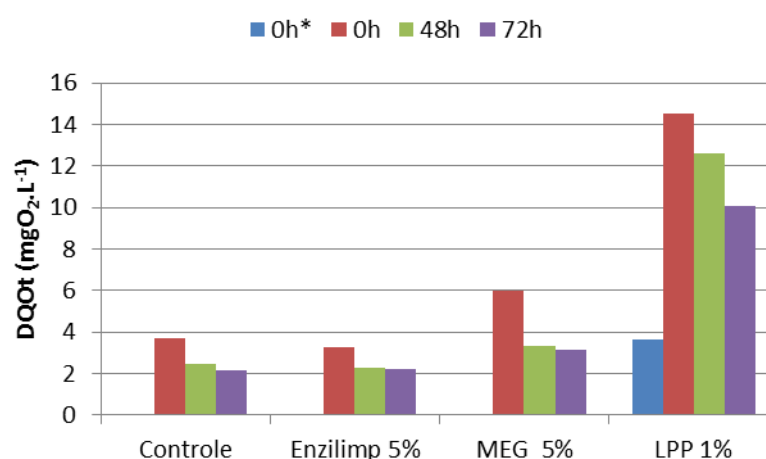


Figura 6: Valores de DQO total no segundo ensaio contendo efluente de curtume diluído.



Observamos que a diluição do efluente favoreceu a atuação dos inóculos microbianos e reduziu a eficiência do inóculo enzimático. Entretanto, a aeração teve efeito contrário nos dois tipos de inóculo. Na Tabela 6 é possível verificar ainda que

no efluente in natura ocorreu predomínio de solubilização da DQO, enquanto nos ensaios com efluente diluído houve consumo da DQOt.

Tabela 6: Variação percentual (V%) da DQOt e DQOs, comparando os ensaios conduzidos com efluente in natura e aqueles conduzidos com efluente diluído.

Água Residuária	Inóculo	In natura			Diluída		
		Fermentação 0-48h	Fermentação 48-72h	Global 0-72h	Fermentação 0-48h	Aeração 48-72h	Global 0-72h
DQOt	Controle	-4,1	-13,6	-17,1	-33,1	-13,9	-42,4
	Enzilimp 5%	6,9	-8,5	-2,2	-31,4	-1,1	-32,1
	MOV7 5%	-5,4	-13,6	-18,3	-44,3	-5,8	-47,6
	LPP 1%	4,1	-4,2	-0,2	-13,1	-19,9	-30,4
DQOs	Controle	33,2	-21,6	4,3	-43,9	-53,2	-73,7
	Enzilimp 5%	34,9	-8,5	23,4	-11,1	25,1	11,1
	MOV7 5%	38,2	-22	7,8	20,0	-20,8	-5,0
	LPP 1%	-22,3	45,2	12,8	-11,1	-5,9	-16,4

A análise do experimento utilizando o delineamento do composto central rotacional, observou que para os ensaios conduzidos com inóculos bacterianos, após 72 horas, as variáveis independentes temperatura, pH e concentração do efluente tiveram efeito significativo na redução do IA. Menores valores de IA foram obtidos com temperatura próxima de 32°C, pH abaixo de 8,0 e concentração do efluente igual a 50 mL.L⁻¹ ($R^2=0,71$ e $F_{\text{calculado}} = 10,32$), como observado na Figura 7. Valores de pH entre 8,0 e 8,5 contribuíram significativamente para redução de O&G ($R^2=0,72$ e $F_{\text{calculado}} = 44,0$), atingindo valores máximos de remoção de 2,6 g.L⁻¹, o que equivale a uma eficiência de 67%. Os fatores que influenciaram a variação global da DQOt foram a temperatura, a concentração de inóculo e o pH ($R^2=0,65$ e $F_{\text{calculado}} = 7,78$). Tal fato fica evidenciado nas curvas de contorno (Figuras 8 e 9), geradas a partir dos coeficientes de regressão reparametrizados, em que as maiores reduções da DQOt foram obtidas em concentrações mais elevadas de inóculo, pH próximo à 8,5 e temperatura elevadas (35 °C). A análise global do pré-tratamento revela eficiência de 62%, com redução máxima de DQOt 3,6 gO₂.L⁻¹.

Boa parte das lipases são capazes de atuar em ampla faixa de pH e temperatura. Bactérias lipolíticas, em sua maioria, desenvolvem-se melhor e secretam lipase com pH inicial próximo de 7,0, entretanto observa-se que a máxima atividade lipolítica ocorre em pH alcalino, conforme trabalhos citados por Gupta e Gupta (2004). Trabalhos como os de El-Bestawy, El-Masry, El-Adl (2005),

Jeganathan, Bassi e Nakhala (2006) Sirisha, Rajasekar e Narasu (2010) também demonstram maior estabilidade térmica das lipases em condições mesofílicas (30 a 37°C).

Figura 7: Curva de contorno da variação do IA em função do pH e da temperatura para os ensaios inoculados com MEG.

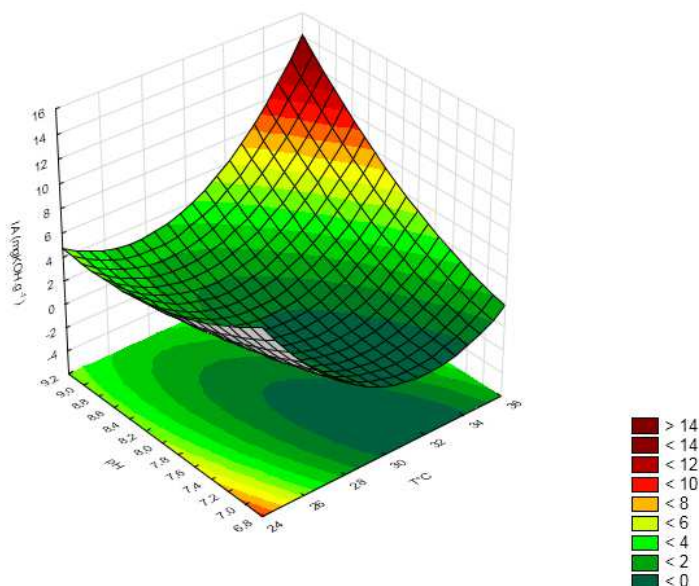


Figura 8: Curva de contorno da variação da DQOt em função do pH e da temperatura para os ensaios inoculados com MEG.

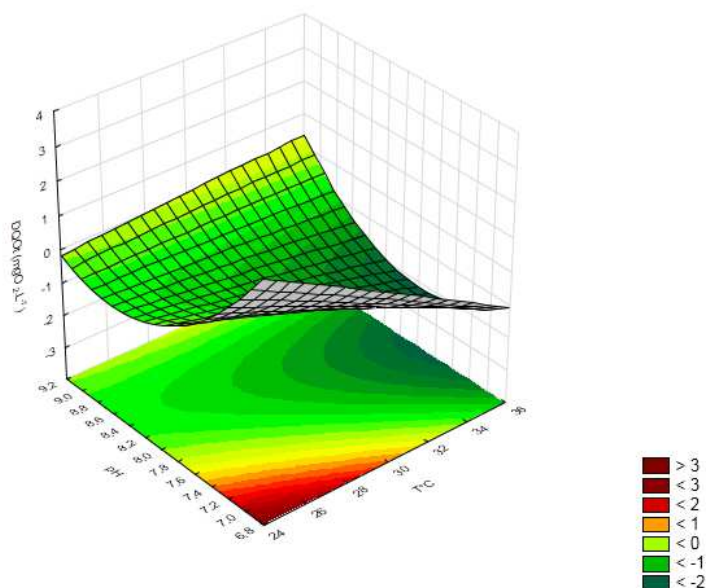
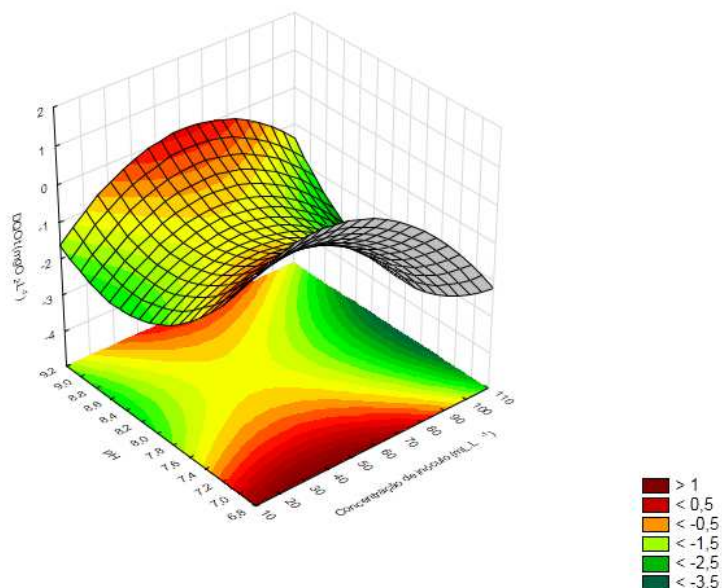


Figura 9: Curva de contorno da variação da DQOt em função do pH e da concentração do inóculo para os ensaios inoculados com MEG.



O delineamento mostrou que a concentração de inóculo e do efluente atuam mais significativamente nos ensaios conduzidos com inóculo enzimático. A redução do IA (Figura 10) e da DQOt (Figura 11) é diretamente proporcional à concentração do efluente e do inóculo enzimático (IA: $R^2 = 0,60$ e $F_{\text{calculado}} = 11,70$; DQOt: $R^2 = 0,61$ e $F_{\text{calculado}} = 18,60$). A análise global do pré-tratamento revela eficiência de 70%, com redução máxima de DQOt de 7,8 gO₂.L⁻¹ com enzima LPP, redução maior do que aquela realizada por MEG. Entretanto, comparando-se com os valores iniciais nos ensaios, com ambos os inóculos, observa-se que parcela substancial de DQO removida pela enzima é equivalente à DQO adicionada pela própria enzima. Assim como nos ensaios com MEG, a redução de O&G pela LPP também foi influenciada pelo pH, mais favorável entre 8,0 e 8,5, atingindo eficiência de 84% (remoção máxima de 2,5 g.L⁻¹).

O modelo proposto pelas equações geradas na análise de DCCR foi validado e seus resultados (Tabela 7) indicam que os ensaios conduzidos com inóculos bacterianos obtiveram valores mais próximos do que é esperado pelo modelo. A baixa adequação ao modelo para ambos os inóculos é esperada, baseando-se nos valores de F obtido nas análises. Isso indica que outras variáveis que não foram avaliadas no DCCR influenciam o comportamento do sistema.

Figura 10: Curva de contorno da variação do IA em função da concentração do efluente e da concentração do inóculo para os ensaios inoculados com LPP.

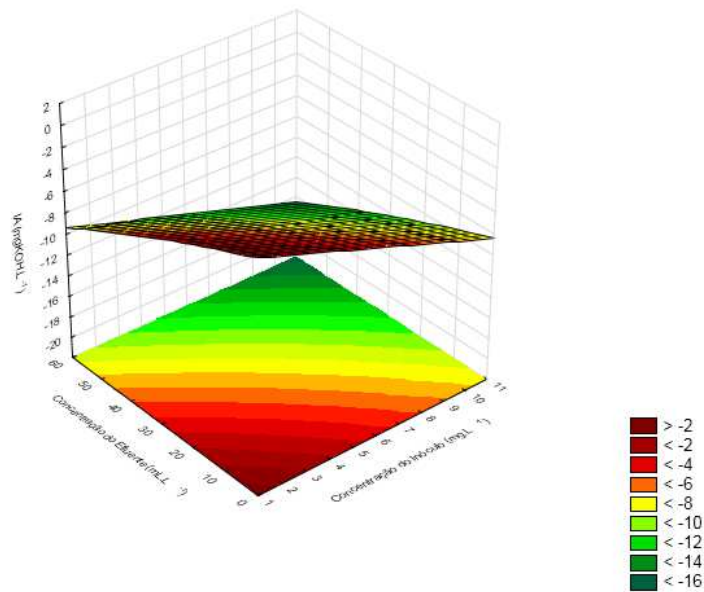


Figura 11: Curva de contorno da variação da DQOt em função da concentração do efluente e da concentração do inóculo para os ensaios inoculados com LPP.

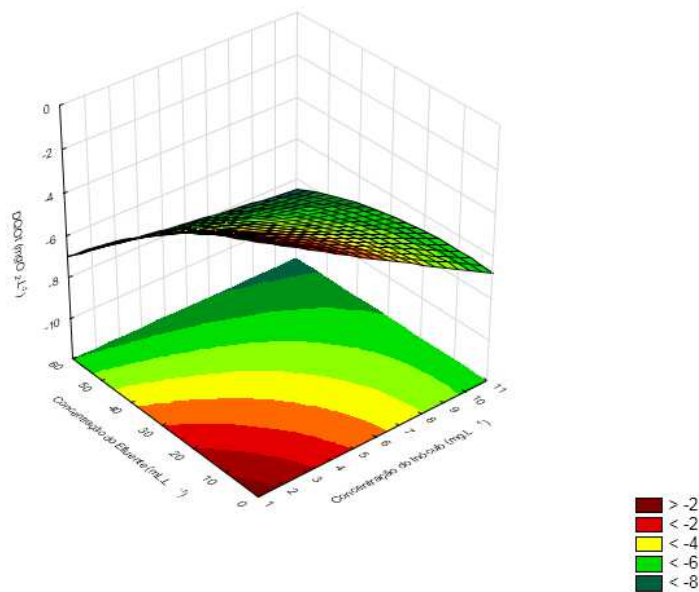


Tabela 2: Condições para validação do modelo, variação global dos resultados esperados e obtidos com inóculo MOV7

	Valor previsto				Valor obtido				Desvio Padrão			
	DQOt	DQOs	O&G	IA	DQOt	DQOs	O&G	IA	DQOt	DQOs	O&G	IA
MOV7	-1.85	-0.74	-0.24	1.69	-1.18	-0.1	-0.86	-0.5	0.47	0.45	0.44	1.55
LPP	-5.62	-4.7	-1.81	-9.28	-4.7	-4.24	-0.25	-5.22	0.65	0.32	1.10	2.87

4 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a atividade catalítica, das lipases microbianas são mais susceptíveis à variações de temperatura e pH, atuando mais fortemente na degradação de lipídios em pH levemente alcalino (8,0) e em temperaturas entre 32 e 35 °C. Enquanto isso, a degradação dessas moléculas por lipase comercial isolada é significativamente mais afetada pela concentração do inóculo e do efluente, sendo esses fatores diretamente proporcionais. A adição dessas lipases eleva a DQO inicial do efluente e proporcionam rápida acidificação do sistema. Dessa forma, seu uso deve ser avaliado conforme o sistema de tratamento que será utilizado em sequência. Os inóculos microbianos isolados de efluente de graxaria de curtume obtiveram comportamento e eficiência semelhante ao inóculo microbiano comercial Enzilimp®, indicando ser uma fonte promissora de microrganismos. Os inóculos microbianos são capazes de remover a acidez, O&G e solubilizar a DQO no sistema. Porém, neste estudo verificou-se que o tempo necessário para tais reações são elevados. O uso de microrganismos lipolíticos no pré-tratamento de efluentes lipídicos é promissor, uma vez que pode reduzir os custos do tratamento, entretanto é necessário que continuem os estudos para otimizar os processos e selecionar microrganismos mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Rebanho Bovino Brasileiro. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 22 ed, Washington, 2005.

Brazilian Leather. Disponível em: < <http://brazilianleather.com.br/wp-content/uploads/2013/04/Brazilian-Leather-Book-Mobile-PT1.pdf>>. Acesso em: 14 de jul. 2014.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D., SILVA, P. R., ROSA, T. S., MOURA, N. M. L., SANTOS, B. C. P., CARVALHO, D. B., SOUSA, J. S., CARVALHINHO, M. T. J. E., CASTRO, A. M., FREIRE, D. M. G. Methods to prevent acidification of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) fruit pulp oil: A promising oil for producing biodiesel. *Industrial Crops and Products*. v. 77, 703-707, 2015.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 01 ago. 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.*, n.3, p. 343-349, 2013.

EL-BESTAWY, E., EL-MASRY, M. H., EL-ADL, N. E. The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, n. 21, p. 815–822, 2005.

Guia Brasileiro do Couro. Dados Estatísticos. Disponível em: < <http://www.guiabrasileirodocouro.com.br/dados-estatisticos?ano=2013>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, n. 64, p. 763 – 781, 2004.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, p. 235–251, 2006.

Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tigela. São Paulo, 2008.

JEGANATHAN, J., BASSI, A., NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials*. 121-128, 2006.

- JUNG, F., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnol. Letters*. vol.24, 1797-1802, 2002.
- MASSE, L., KENNEDY, K. J., CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology*, n. 77, p. 145-155, 2001.
- MENDES, A. A., CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 135-142, 2005.
- MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B., JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. *Biochemical Engineering Journal*, n. 32, p. 185-190, 2006.
- MOBARAK-QAMSARI, E., KASRA-KERMANSHAHSI, R., NOSRATI, M., AMANI, T. Enzymatic Pre-Hydrolysis of high fat Content Dairy Wastewater as a Pretreatment for Anaerobic Digestion. *Int. J. Environ. Res*, 6(2):475-480, 2012.
- PEIL, G. H. S., KUSS, A. V., RAVE, A. F. G., VILLARREAL, J. P. V., HERNANDES, Y. M. L., NASCENTE, P. S. Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.88 no.3 supl.0 Rio de Janeiro, 2016 .
- PRASAD, M. P., MANJUNATH, K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian Journal of Biotechnology*, n. 10, p. 121-124, 2011.
- OLIVEIRA, J. P., ANTUNES, P. W. P., PINOTTI, L. M., CASSINI, S. T. A. Caracterização físico-química de resíduos oleosos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. *Química Nova*. v.37, n.4, 597-602, 2014.
- RAMANI, K., CHOCKALINGAM, E., SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 37, n. 5, p. 531-535, 2010.

- ROCHA, D., GOMES, B. M., GOMES, S. D., SENE, L., ZENATTI, D. C. Selection of microorganisms producer of lipase for fat removal from biodiesel purification water. Eng. Agrí. Jaboticabal, v. 33, n.2, p. 332-340, 2013.
- ROSA, D. R., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Production and Utilization of a Novel Solid Enzymatic Preparation Produced by *Penicillium restrictum* in Activated Sludge Systems Treating Wastewater with High Levels of Oil and Grease. Environmental Engineering Science, v.23, n.5, 2006.
- SIRISHA, E., RAJASEKAR, N., NARASU, M. L. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. Advances in Biological Research, v. 4, n. 5, p. 249-252, 2010.
- SUEHARA, K. KAWAMOTO, Y., FUJII, E., KOHDA, J., NAKANO, Y., YANO., T. Biological Treatment of Wastewater Discharged from Biodiesel Fuel Production Plant with Alkali-Catalyzed Transesterification. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, n.4, p. 437-442, 2005.
- 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, 30(2): 483-488, 2010.

