

Fosfolipase imobilizada na hidrólise da fração lipídica de efluente de frigorífico de suínos: comparação com a enzima livre

Phospholipase immobilized in the hydrolysis of lipid fraction of the wastewater slaughterhouse swine: comparison with enzyme free

Aniela Pinto Kempka^{1*}, Elisandra Fagundes², Graciélen Padilha dos Santos²,
Katiane Mafessoni², Vanessa Daiane Heinzen²

RESUMO

Este estudo pretendeu verificar as melhores condições operacionais para a hidrólise de lipídeos presentes em efluente de frigorífico de suínos, comparando uma fosfolipase comercial livre e uma imobilizada, assim como o potencial para reutilização da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise e sua manutenção de capacidade lipolítica em condições de armazenamento. Analisaram-se a influência da temperatura, o pH e a concentração da fosfolipase na hidrólise, obtendo-se como valores ótimos 36°C, 8,5 e 1,1% (mv⁻¹), respectivamente. Os valores de ácidos graxos livres obtidos para a enzima livre e imobilizada diferiram significativamente ($p < 0,05$), sendo os valores para a enzima imobilizada superiores, com máximo de 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foram realizados 18 ciclos de reuso da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise, e até o 17º reuso a atividade relativa ficou acima de 50%. A enzima imobilizada estocada em temperatura de refrigeração manteve a mesma liberação de ácidos graxos até o sétimo dia de armazenamento.

Palavras-chave: lipídeos; efluente; hidrólise; fosfolipase; imobilização.

ABSTRACT

This study intended to determine the best operating conditions for the hydrolysis of lipids present in wastewater of slaughterhouse swine comparing a free commercial phospholipase and an immobilized one, as well as the potential for reuse of the immobilized phospholipase in hydrolysis reactions and the maintenance of its lipolytic capacity in storage conditions. The influence of temperature, pH and concentration of phospholipase hydrolysis were analyzed, yielding optimal values such as 36°C, 8.5 and 1.1% (wv⁻¹), respectively. The amounts of free fatty acids obtained for free and immobilized enzyme differed significantly ($p < 0.05$); the values were higher for the immobilized enzyme, with a maximum of 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. There were performed 18 cycles of reuse in immobilized phospholipase hydrolysis reactions, and until the 17th reuse the relative activity was above 50%. The immobilized enzyme stored at refrigeration temperature remained the same fatty acids release until the 7th day of storage.

Keywords: lipids; wastewater; hydrolysis; phospholipase; immobilization.

INTRODUÇÃO

Efluentes de frigoríficos caracterizam-se por conter altas concentrações de matéria orgânica biodegradável, sendo constituída, principalmente, de lipídeos e proteínas (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007). Nesse sentido, os lipídeos representam uma fração importante da carga orgânica particulada, sendo aproximadamente 40% da demanda química de oxigênio (DQO) total (MASSE; MASSÉ; KENNEDY, 2003). Geralmente, os óleos e gorduras apresentam-se de duas formas: como óleo/gordura livre ou emulsionados (DUMORE; MUKHOPADHYAY, 2012).

Vários métodos convencionais estão disponíveis para a remoção de óleos e gorduras dos efluentes, tais como filtração por membranas, coagulação/flotação, adsorção etc., porém o tratamento biológico utilizando micro-organismos ainda se caracteriza como a alternativa mais rentável (mesmo em altas concentrações de óleos e gorduras) em comparação com as demais (DUMORE; MUKHOPADHYAY, 2012).

Entre os processos biológicos, têm-se os processos anaeróbios e os aeróbios. Sistemas anaeróbios caracterizam-se pela existência de condições anaeróbias para o desenvolvimento dos micro-organismos, ou seja, a ausência de oxigênio no meio. São sistemas em que a estabilização

¹Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) - Pinhalzinho (SC), Brasil.

²Discente do Departamento de Engenharia de Alimentos da UDESC - Pinhalzinho (SC), Brasil.

*Autor correspondente: aniela.kempka@udesc.br

Recebido: 30/04/13 - Aprovado: 02/03/17 - Reg. ABES: 116471

é lenta em razão da multiplicação celular que ocorre em baixa taxa (LEITÃO *et al.*, 2006; VON SPERLING, 1996; RAMALHO, 2010). Nos processos aeróbicos, os lipídeos podem dificultar a transferência de oxigênio do meio necessário para a biodegradação. Essa dificuldade dá-se pela formação de uma camada lipídica ao redor dos flocos de micro-organismos ou pela formação de filme de lipídeos na superfície do efluente (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; VON SPERLING, 1996; RAMALHO, 2010). Sendo assim, ainda podem ocorrer problemas operacionais em função do elevado conteúdo de óleos e gorduras, como, por exemplo, a solidificação desses materiais em baixa temperatura, podendo ocasionar danos operacionais, como a obstrução de tubulações (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007).

Nesse sentido, uma das alternativas que pode auxiliar no melhoramento do tratamento biológico de efluentes gordurosos é a utilização de enzimas que fazem a hidrólise dos lipídeos: as lipases. Essas enzimas são caracterizadas como enzimas hidrolíticas (quando exógenas) e apresentam três características importantes comuns às enzimas: são proteínas, são catalisadores e exibem seletividade sobre substratos. Caracterizam-se por ser a forma mais comum e ubíqua de catálise biológica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; NELSON; COX, 2011). A função biológica das lipases é catalisar a hidrólise de ésteres para produzir ácidos graxos livres, di e monoglicerídeos e glicerol (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Fosfolipases caracterizam-se como lipases que podem hidrolisar as ligações éster de fosfolípidos (JIANG *et al.*, 2011).

O princípio do uso de lipases baseia-se na hidrólise dos lipídeos com disponibilização de diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos mais facilmente metabolizados pelos micro-organismos do sistema de tratamento, aumentando, portanto, a eficiência do processo de biodegradação. Entretanto, o uso dessas enzimas na forma livre acarreta em custo adicional ao processo, fazendo com que a sua reutilização se torne vantajosa.

A imobilização de lipases permite que estas sejam fisicamente separadas do meio reacional e prontamente reutilizadas. Além disso, oferece alguns benefícios para a aplicação industrial, como estabilidade ao pH, temperatura, fácil recuperação e redução da inibição pelos produtos, tornando possível seu uso em operações contínuas (PALLA; PACHECO; CARRÍN, 2011).

Uma das formas de imobilização das lipases é o aprisionamento, o qual faz com que elas sejam retidas em uma estrutura/matriz de polímero. A lipase imobilizada por aprisionamento é mais estável do que a lipase fisicamente adsorvida, além de o aprisionamento ser um método simples que permite que a enzima mantenha grande parte de sua atividade e estabilidade (MORENO-PIRAJÁN; GIRALDO, 2011).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar as melhores condições operacionais para a hidrólise dos lipídeos presentes em efluente de frigorífico de suínos, comparando uma fosfolipase comercial livre e uma imobilizada, bem como o potencial para reutilização da

fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise e a manutenção de sua capacidade lipolítica em condições de armazenamento.

METODOLOGIA

O efluente, que passou somente pelo processo de peneiramento, foi coletado em uma estação de tratamento de um frigorífico de suínos localizado na cidade de Chapecó (SC), em horário de abate, sendo coletadas duas frações em diferentes horários de produção, as quais foram homogeneizadas. Os experimentos de hidrólise da fração lipídica que utilizaram a fosfolipase imobilizada e livre foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). A enzima utilizada como biocatalisador foi um preparado comercial à base de uma fosfolipase (Megazyn AB — Prozyn, São Paulo, São Paulo, Brasil) comercializada para uso em panificação.

Caracterização físico-química do efluente

Para a caracterização físico-química do efluente, realizaram-se análises de DQO, teor de óleos e graxas (TOG), teor de sólidos totais (TST) e nitrogênio total (NT) de Kjeldahl de acordo com o *Standard Methods of Water and Wastewater Examination* (APHA; AWWA; WEF, 2012). O valor do pH foi obtido utilizando-se potenciômetro digital (modelo Q400AS — Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil), sendo o eletrodo imerso diretamente na amostra de efluente em temperatura ambiente.

Imobilização da fosfolipase em esferas de alginato de cálcio

O procedimento utilizado para imobilizar a fosfolipase foi semelhante ao procedimento empregado por Silva *et al.* (2008). A concentração de 3,5% (m.v⁻¹) de alginato de sódio foi solubilizada em 50 mL de água destilada, e posteriormente foi efetuado o aquecimento da mistura usando chapa de aquecimento até temperatura próxima a 50°C. Após o resfriamento da solução em temperatura abaixo de 30°C, adicionou-se à concentração do preparado enzimático correspondente a cada experimento. Essa solução de alginato de sódio, que continha o preparado enzimático, foi gotejada utilizando-se uma seringa de vidro de 20 mL em uma solução de cloreto de cálcio (4% m.v⁻¹), formando esferas de alginato de cálcio instantaneamente, que ficaram imersas por 1 hora. Após esse período, as esferas com a enzima imobilizada foram retiradas da solução com o auxílio de uma peneira e lavadas repetidas vezes com água destilada para imediato uso nos ensaios de hidrólise.

Atividade enzimática e atividade relativa da fosfolipase

A atividade enzimática da fosfolipase livre e da fosfolipase imobilizada foi obtida pela determinação de ácidos graxos liberados no meio reacional

ao longo do tempo de 12 horas de hidrólise (KEMPKA; CELUPPI; REVELLO, 2013), utilizando a metodologia de Freire, Gomes e Bom (1997). O meio reacional foi constituído de uma emulsão de goma arábica, tampão fosfato de sódio 100 mm, pH 7,0 e azeite de oliva, sendo este último o substrato lipídico. Após a reação de hidrólise, o meio reacional que continham os ácidos graxos livres foi titulado com NaOH 0,1 M até pH 11, sendo calculado o valor de atividade enzimática em $U \cdot g^{-1}$. Dessa maneira, as determinações ocorreram em duplicatas.

Para obtenção dos valores de atividade relativa (%), após a determinação da atividade enzimática, considerou-se o maior valor de atividade enzimática obtido (como 100% de atividade relativa) e ponderaram-se os demais em relação ao valor maior.

Planejamento experimental e otimização das condições operacionais de hidrólise

Para otimização das condições de hidrólise da fração lipídica do efluente, utilizaram-se as metodologias de planejamento experimental e superfície de resposta. A Tabela 1 mostra o planejamento composto central rotacional com pontos axiais e ponto central, com seus respectivos valores das variáveis e dos níveis entre parênteses. As variáveis de estudo foram: temperatura ($^{\circ}C$), pH e concentração de enzima (% $m \cdot v^{-1}$). Todos os experimentos foram realizados com agitação de 50 rpm e em duplicata.

As reações de hidrólise foram conduzidas em erlenmeyers de 125 mL. O pH do efluente foi ajustado utilizando-se NaOH 0,1 M ou solução HCl 20%. Nos erlenmeyers, foram adicionados 50 mL de efluente e

Tabela 1 - Planejamento composto central rotacional (DCCDR) com pontos axiais e ponto central utilizado na hidrólise da fração lipídica do efluente de frigorífico de abate de suínos.

Experimento	Temperatura ($^{\circ}C$)	pH	Concentração de enzima (% $m \cdot v^{-1}$)
E1	27 (-1,0)	6,0 (-1,0)	0,2 (-1,0)
E2	27 (-1,0)	6,0 (-1,0)	2,0 (+1,0)
E3	27 (-1,0)	11,0 (+1,0)	0,2 (-1,0)
E4	27 (-1,0)	11,0 (+1,0)	2,0 (+1,0)
E5	45 (+1,0)	6,0 (-1,0)	0,2 (-1,0)
E6	45 (+1,0)	6,0 (-1,0)	2,0 (+1,0)
E7	45 (+1,0)	11,0 (+1,0)	0,2 (-1,0)
E8	45 (+1,0)	11,0 (+1,0)	2,0 (+1,0)
E9	21 (-1,68)	8,5 (0,0)	1,1 (0,0)
E10	51 (+1,68)	8,5 (0,0)	1,1 (0,0)
E11	36 (0,0)	4,0 (-1,68)	1,1 (0,0)
E12	36 (0,0)	13,0 (+1,68)	1,1 (0,0)
E13	36 (0,0)	8,5 (0,0)	0,0 (-1,68)
E14	36 (0,0)	8,5 (0,0)	2,6 (+1,68)
E15	36 (0,0)	8,5 (0,0)	1,1 (0,0)
E16	36 (0,0)	8,5 (0,0)	1,1 (0,0)

a concentração de fosfolipase imobilizada ou livre, de acordo com o planejamento experimental. A dosagem de ácidos graxos liberados ao longo do tempo seguiu a metodologia proposta por Leal *et al.* (2002), que consiste na titulação até pH 11 empregando-se a solução de NaOH 0,01 M.

Reúso da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise

Ao final do tempo da reação, para avaliar o reúso da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise da fração lipídica do efluente, procedeu-se à lavagem com água destilada das esferas que continham a enzima, as quais foram imediatamente adicionadas em erlenmeyer contendo o efluente, para o reinício de uma nova batelada de reação de hidrólise, até a verificação do valor de atividade relativa igual ou imediatamente inferior a 50%.

Manutenção da atividade da fosfolipase imobilizada ao longo do armazenamento

Para verificação da manutenção da atividade da fosfolipase imobilizada ao longo do tempo de armazenamento em refrigeração, imobilizou-se a fosfolipase em esferas de alginato de cálcio, de acordo com a descrição anterior e em quantidade suficiente para a realização das reações de hidrólise. As esferas que continham a enzima imobilizada foram acondicionadas em solução de cloreto de cálcio (4% $m \cdot v^{-1}$) previamente esterilizada em autoclave a $121^{\circ}C$ por 15 minutos. O tempo total de estocagem foi de 28 dias em refrigerador doméstico (com temperatura aproximada de $10^{\circ}C$). A cada sete dias, uma quantidade de esferas contendo a concentração otimizada de fosfolipase imobilizada foi utilizada em reações de hidrólise dos lipídeos do efluente. Também foi determinada a atividade enzimática da fosfolipase imobilizada.

Análise estatística dos dados experimentais

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada mediante o *software* Statistica® 10.0 (StatSoft, Inc., Austin, Texas, Estados Unidos). Por meio do teste de Tukey, compararam-se os valores das médias, e aplicando a regressão dos dados se verificaram os efeitos isolados e de interação entre as variáveis, indicando o nível de 95% de confiabilidade.

RESULTADOS

Caracterização físico-química do efluente de frigorífico de suínos

O efluente de frigorífico de suínos caracteriza-se pela alta concentração de matéria orgânica. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das determinações físico-químicas de caracterização do efluente.

Atividade relativa da fosfolipase livre e imobilizada ao longo do tempo

As atividades relativas obtidas do longo de 12 horas para a fosfolipase livre e imobilizada estão mostradas na Figura 1.

Ao longo do tempo, ocorreu aumento na atividade da enzima, livre ou imobilizada, comportamento visualizado até a sétima hora de reação, que correspondeu aos valores de atividade enzimática de $26,95 \pm 0,21 \text{ U.g}^{-1}$ para a fosfolipase livre (100% de atividade relativa) e $28,85 \pm 0,21 \text{ U.g}^{-1}$ (100% de atividade relativa) para a fosfolipase imobilizada. Após sete horas de reação, verificou-se declínio na atividade relativa, e os valores ao final de 12 horas de reação passaram de 27,46% na fosfolipase livre e 64,64% na fosfolipase imobilizada, correspondendo aos valores de atividade enzimática de $7,40 \pm 0,20 \text{ U.g}^{-1}$ e $18,65 \pm 0,92 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente, mostrando que a fosfolipase imobilizada possui mais estabilidade da atividade ao longo do tempo do que a fosfolipase livre.

Hidrólise enzimática dos lipídeos do efluente

A hidrólise dos lipídeos do efluente de frigorífico de suínos foi verificada por meio da obtenção de ácidos graxos livres, também ao longo do tempo. A Tabela 3 mostra os resultados das médias para os ensaios do planejamento experimental, utilizando a fosfolipase livre e a fosfolipase imobilizada.

Tabela 2 – Resultados da caracterização físico-química do efluente de frigorífico de suínos.

Parâmetro	Valor
Demanda química de oxigênio ($\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$)	$4.750,30 \pm 137,45$
Teor de óleos e graxas (mg.L^{-1})	$1.543,50 \pm 50,32$
Sólidos totais (mg.L^{-1})	$7.654,85 \pm 231,56$
Nitrogênio total de Kjeldahl (mg.L^{-1})	$356,87 \pm 50,86$
pH	$6,57 \pm 0,03$

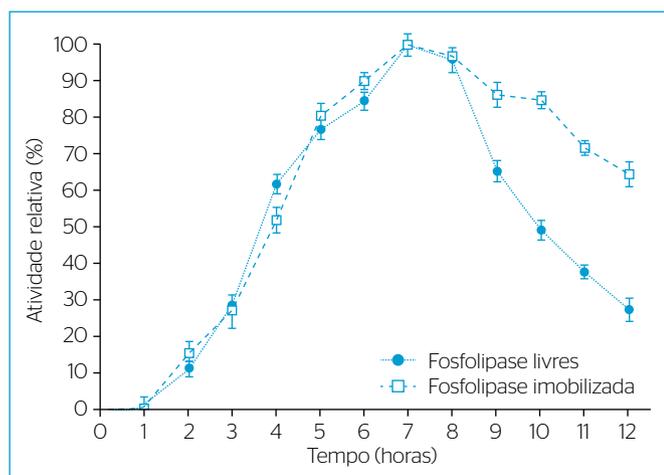


Figura 1 – Atividades Relativas (%) da fosfolipase livre e imobilizada ao longo do tempo.

Para a fosfolipase livre, os maiores valores obtidos de ácidos graxos livres foram correspondentes aos dos experimentos E15 e E16, iguais em relação às variáveis do planejamento, sendo esses valores correspondentes ao ponto central (36°C , pH 8,5 e 1,1% de enzima) e também iguais pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); seguidos de E14 (36°C , pH 8,5 e 2,6% de enzima), iguais estatisticamente aos de E16 ($p > 0,05$), porém diferentes de E15 ($p < 0,05$). Utilizando-se a fosfolipase imobilizada, os experimentos que apresentaram a maior geração de ácidos graxos livres também foram o E15, o E16 e o E14, sendo o E15 igual estatisticamente ($p > 0,05$) ao E16 e diferente do E14 ($p < 0,05$). O valor médio de ácidos graxos liberados nos experimentos E6 (45°C , pH 6,0 e 2,0% de enzima) e E5 (45°C , pH 6,0 e 0,2% de enzima) foi igual estatisticamente ($p > 0,05$) aos valores obtidos no experimento E14.

Comparando-se os valores de ácidos graxos obtidos para a fosfolipase livre e para a fosfolipase imobilizada, percebeu-se que os experimentos E15 e E16 se diferenciaram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), sendo os valores de ácidos graxos livres obtidos para a fosfolipase imobilizada superiores aos valores obtidos ao utilizar-se a fosfolipase livre, diferentemente do que se verificou em relação aos valores encontrados para as condições do experimento E14.

Na Figura 2 é possível observar os perfis de geração de ácidos graxos dos experimentos E14, E15 e E16, experimentos em que houve a maior liberação de ácidos graxos para a fosfolipase livre e para a imobilizada.

Tabela 3 – Médias de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) obtidas das reações de hidrólise enzimática para a fosfolipase livre e para a fosfolipase imobilizada em alginato de cálcio.

Experimento	Ácidos graxos livres ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) \pm desvio padrão	
	Fosfolipase livre	Fosfolipase imobilizada
E1	$10,60^{cA} \pm 0,42$	$8,65^{bCA} \pm 0,49$
E2	$18,00^{eA} \pm 0,28$	$13,00^{dB} \pm 1,41$
E3	$12,55^{cA} \pm 0,21$	$12,50^{cdA} \pm 0,71$
E4	$16,65^{dA} \pm 0,35$	$13,50^{dB} \pm 0,71$
E5	$18,55^{eA} \pm 1,77$	$26,00^{fB} \pm 2,83$
E6	$23,15^{fA} \pm 0,35$	$29,50^{gB} \pm 0,71$
E7	$5,35^{bA} \pm 0,49$	$7,00^{bA} \pm 1,41$
E8	$15,10^{dA} \pm 0,14$	$13,00^{dB} \pm 0,00$
E9	$21,95^{fA} \pm 0,92$	$16,50^{dB} \pm 0,71$
E10	$22,70^{fA} \pm 0,42$	$23,25^{eA} \pm 0,35$
E11	$10,40^{cA} \pm 0,42$	$8,50^{bCA} \pm 0,71$
E12	$11,65^{cA} \pm 0,49$	$8,50^{bcB} \pm 0,71$
E13	$0,00^{aA} \pm 0,00$	$1,25^{aB} \pm 0,35$
E14	$28,10^{gA} \pm 0,71$	$29,50^{gA} \pm 0,71$
E15	$31,10^{hA} \pm 0,42$	$34,00^{hB} \pm 0,71$
E16	$29,90^{gA} \pm 0,14$	$33,50^{gB} \pm 0,71$

Médias com letras minúsculas na vertical, seguidas de letras diferentes, diferem em nível de 95% de confiabilidade pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação aos experimentos. Médias com letras maiúsculas na horizontal, seguidas de letras diferentes, diferem em nível de 95% de confiabilidade pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação à fosfolipase livre e à imobilizada.

Pode-se perceber que a fosfolipase livre apresentou perfil de aumento próximo à linearidade e constante na liberação dos ácidos graxos em relação ao tempo, o que não se passou com a fosfolipase imobilizada, em que para o experimento E14 houve aumento da liberação de ácidos graxos do tempo inicial até a primeira hora, permanecendo em variações expressivas até a quarta hora, voltando a ocorrer aumento a partir da quinta hora. Os perfis para E15 e E16 para a fosfolipase imobilizada são próximos, ocorrendo aumento gradativo na liberação dos ácidos graxos com o tempo.

Análise estatística dos dados experimentais

Com os resultados das médias de ácidos graxos liberados ao longo da hidrólise, realizou-se a análise estatística para verificação da influência das variáveis na liberação de ácidos graxos pela fosfolipase. A Figura 3 mostra os diagramas de Pareto obtidos para o efluente hidrolisado com a fosfolipase livre e com a fosfolipase imobilizada.

Em relação às variáveis isoladas do planejamento proposto, verifica-se na Figura 2A que a concentração de enzima (E) exerceu efeito positivo

significativo na liberação de ácidos graxos nas reações de hidrólise. Já para a enzima imobilizada, as variáveis isoladas que exerceram efeito positivo significativo foram na concentração de enzima (E) e temperatura (T). Por meio dos valores dos coeficientes de regressão, obtiveram-se os modelos matemáticos que representam a hidrólise dos lipídeos em termos de geração de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), os quais são apresentados nas Equações 1 e 2 para a fosfolipase livre ($R^2=0,88$) e para a imobilizada ($R^2=0,83$), respectivamente.

$$\text{AGL} = -110,97 + 20,24 \cdot E - 0,83 \cdot \text{pH}^2 - 7,16 \cdot E^2 - 0,12 \cdot T \cdot \text{pH} \quad (1)$$

$$\text{AGL} = -185,09 + 5,21 \cdot T + 19,20 \cdot E - 0,04 \cdot T^2 - 1,04 \cdot \text{pH}^2 - 6,93 \cdot E^2 - 0,04 \cdot T^2 - 0,22 \cdot T \cdot \text{pH} \quad (2)$$

Em que:

AGL = ácidos graxos livres em $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$;

T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

E = concentração de fosfolipase (enzima) em % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$).

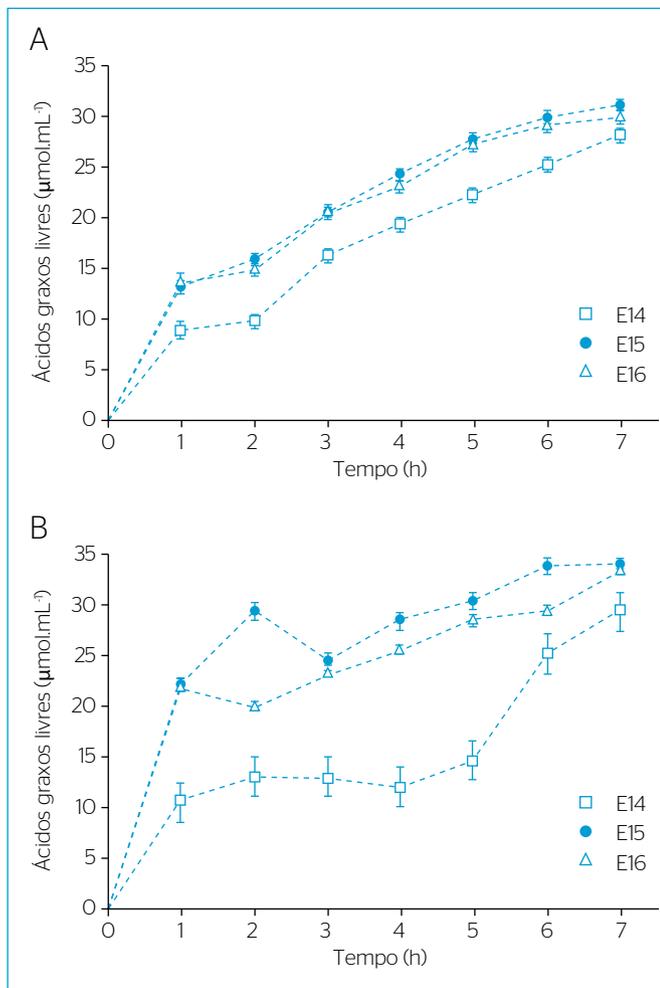


Figura 2 - Perfis de obtenção de ácidos graxos para os experimentos E14, E15 e E16 utilizando (A) fosfolipase livre e (B) fosfolipase imobilizada.

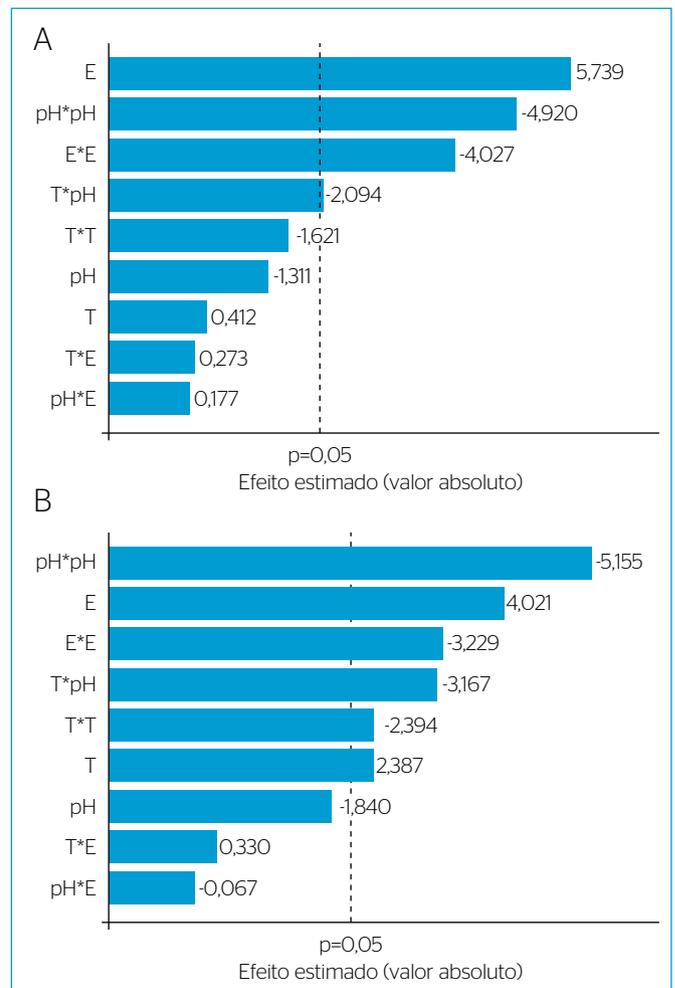


Figura 3 - Diagramas de Pareto para as reações de hidrólise do efluente de frigorífico de suínos utilizando (A) fosfolipase livre (B) fosfolipase imobilizada.

Os modelos matemáticos apresentados nas Equações 1 e 2 permitiram a construção das superfícies de resposta correspondentes ao processo de hidrólise, mostradas na Figura 4. Observa-se que a região de maximização de ácidos graxos livres equivale ao ponto central do planejamento experimental, ou seja, temperatura de 36°C, pH 8,5 e concentração de fosfolipase de 1,1% (m.v⁻¹).

Reúso da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise

A Figura 5 mostra os resultados do reúso da fosfolipase imobilizada nas reações de hidrólise.

Pode-se observar o perfil de queda da atividade relativa da fosfolipase imobilizada ao longo dos ciclos, chegando a 41,43%

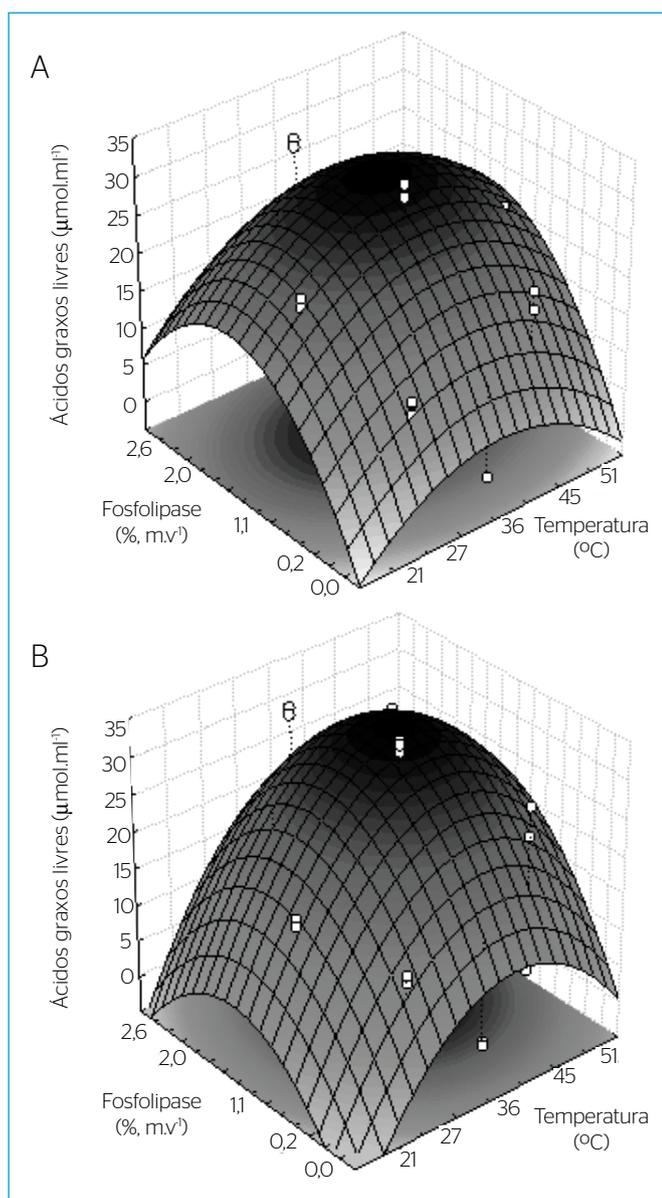


Figura 4 - Superfícies de resposta obtidas para as reações de hidrólise do efluente de frigorífico de suínos utilizando (A) fosfolipase livre e (B) fosfolipase imobilizada.

de atividade relativa ao final de 18 ciclos de reúso nas reações de hidrólise do efluente de frigorífico de suínos. Até o 17º ciclo de reúso da fosfolipase imobilizada, a atividade relativa ficou acima de 50%.

Manutenção da atividade enzimática e obtenção de ácidos graxos livres ao longo do armazenamento das esferas contendo fosfolipase imobilizada

A Figura 6 mostra os perfis de geração de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e de atividade relativa (%), utilizando-se a fosfolipase imobilizada e estocada ao longo de 28 dias, sob refrigeração a 10°C. Verificou-se, com isso, que ocorreram perfis de queda tanto de geração de ácidos graxos livres pelas reações de hidrólise como para a atividade relativa. Após 28 dias de armazenamento, a fosfolipase permaneceu com 63,64% da sua atividade inicial, o que corresponde a $28,05\pm 0,21 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$.

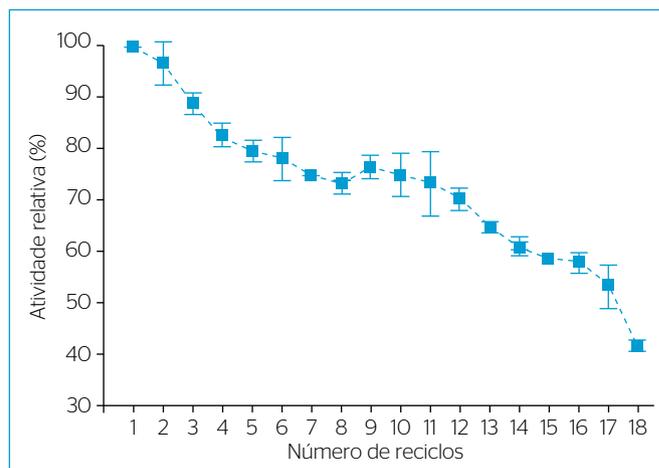


Figura 5 - Atividade relativa (%) da fosfolipase imobilizada no reúso da fosfolipase nas reações de hidrólise.

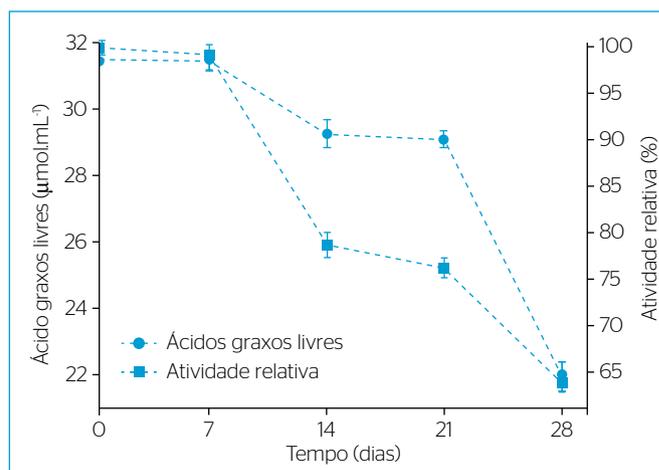


Figura 6 - Ácidos graxos livres ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e atividade relativa (%) da fosfolipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio mantidas em refrigeração durante 28 dias.

DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização físico-química (Tabela 2) confirmam o elevado teor de matéria orgânica que está expressa em termos da DQO, principalmente por causa da alta concentração de gordura e sólidos. Segundo Rigo *et al.* (2008), valores de DQO para efluente de frigoríficos podem chegar a 4.500 mg O₂.L⁻¹, porém Dors *et al.* (2013) e Valladão, Freire, Cammarota (2007), ao caracterizarem efluente de frigorífico de aves, obtiveram valores de 2.005 mg O₂.L⁻¹ e 1.181 mg O₂.L⁻¹, demonstrando que esses valores podem variar em uma ampla faixa. Os teores de óleos e graxas também variam, sendo citados na literatura os valores de 8.462 mg.L⁻¹ para efluente e frigorífico de suínos e bovinos pré-flotado (RIGO *et al.*, 2008) e 230 mg.L⁻¹ para efluente de frigorífico de aves após a flotação. Em relação ao pH, segundo Schmidell *et al.* (2001), a faixa ótima de pH para o crescimento de bactérias anaeróbias nos processos biológicos de tratamento de efluentes corresponde ao valor de 6,8 a 7,4, estando o valor do presente estudo nessa faixa.

A obtenção da atividade relativa da fosfolipase ao longo do tempo (Figura 1) teve como objetivo a verificação do tempo ótimo de hidrólise para etapas posteriores, bem como da estabilidade da enzima. O comportamento decrescente tanto para a fosfolipase livre como para a imobilizada ocorre em função da liberação de ácidos graxos no processo de hidrólise, chegando a valores de pH de aproximadamente 3,5 em 24 horas de reação (KEMPKA; CELUPPI; REVELLO, 2013). Segundo Devlin (2011), como praticamente todas as enzimas envolvem catálise ácido/base, espera-se que a velocidade da reação seja afetada pelo pH, porém observa-se que a fosfolipase imobilizada possui maior estabilidade se comparada à fosfolipase livre, com valor de atividade relativa 42,48% maior em 12 horas de reação.

Segundo Won *et al.* (2005), o aprisionamento é uma das técnicas de imobilização definidas como uma restrição física da enzima dentro de um espaço confinado, ou de uma rede que permite a transferência de massa. Assim, as enzimas imobilizadas apresentam maior resistência à desnaturação térmica e química, bem como maior resistência ao armazenamento e estabilidade operacional, podendo ainda reduzir o efeito de inibidores (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BETANCOR; LUCKARIFT, 2008; YANG *et al.*, 2009). A desnaturação química da enzima também é minimizada na imobilização por aprisionamento, em razão da inexistência de interações químicas entre a enzima e a matriz de imobilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000), nesse caso o alginato de cálcio. Verificou-se ainda que o comportamento da liberação de ácidos graxos se diferenciou ao longo do tempo para a fosfolipase livre e para a imobilizada (Figura 2). Já em enzimas aprisionadas em uma matriz, as taxas de difusão do substrato e produto podem diminuir, fazendo com que essas taxas estejam ligadas ao tamanho da matriz, à porosidade e ao tamanho de poros (VILLENEUVE *et al.*, 2000; KEMPKA; SOUZA; SOUZA, 2014).

As variáveis do estudo isoladas que exerceram efeito significativo (Figura 3) para a fosfolipase imobilizada foram concentração de enzima

(E) e temperatura (T), apresentando efeitos positivos. O efeito positivo significa que, quando se passa do nível -1 para o nível +1 do planejamento experimental, ocorre aumento da atividade da fosfolipase. Todavia, isso não pode ser considerado uma regra, pois existem interações entre as variáveis que podem levar à determinada condição otimizada. A condição de maximização da liberação de ácidos graxos tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada correspondeu às condições experimentais do ponto central do planejamento (36°C, pH 8,5 e 1,1% de enzima) (Tabelas 1 e 3 e Figura 4), com valor chegando a 34 µmol.mL⁻¹ para a fosfolipase imobilizada. Kempka, Celuppi e Revello (2013) obtiveram valores de ácidos graxos liberados próximos a 31 µmol.mL⁻¹ utilizando fosfolipase pancreática livre e que obteve, posteriormente, na etapa de biodegradação, aumento na eficiência em torno de 90%. Leal *et al.* (2006), ao estudarem a hidrólise de efluente de laticínio utilizando lipase, testaram três diferentes temperaturas (25, 35 e 45°C), otimizando o processo de hidrólise em 35°C, chegando a valores próximos a 12 µmol.mL⁻¹ de ácidos graxos livres.

A viabilidade do uso de uma enzima imobilizada depende da sua possibilidade de reúso (Figura 5) (KEMPKA; SOUZA; SOUZA, 2014). Durante a reutilização de enzimas imobilizadas, é comum a perda de atividade enzimática ao longo dos ciclos, e essa perda de atividade deve ser determinada para que se possa fixar o número máximo de reúsos sem afetar a produtividade do processo de forma significativa. Jeganathan, Bassi e Nakhla *et al.* (2006), ao usarem lipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio para hidrolisarem a fração de gordura de efluente de indústria de alimentos para pequenos animais, concluíram que a lipase imobilizada poderia ser reutilizada por até quatro ciclos, mantendo até 55% de atividade relativa. Já no presente estudo, obteve-se aproximadamente 50% de atividade relativa em 17 ciclos de reutilização.

Won *et al.* (2005), ao avaliarem o reúso em três ciclos de utilização da lipase imobilizada em alginato, mistura de alginato e quitosana e mistura de alginato e silicato, alcançaram 72, 77 e 87% da atividade inicial, respectivamente, sendo apenas o último resultado próximo ao obtido neste estudo, cujo valor de atividade relativa para o terceiro ciclo foi de 89,12%. Desai, Dave e Devi (2004), ao imobilizarem lipase em k-carragena, obtiveram aproximadamente 60% de atividade da enzima no quinto ciclo. Kempka, Souza e Souza (2014), quando imobilizaram lipase em matrizes de gelatina e manitol, reticuladas com glutaraldeído, obtiveram dez ciclos de reúso e até o quinto ciclo a lipase imobilizada apresentou 77,66% da atividade enzimática inicial.

Em relação à manutenção da fosfolipase imobilizada (Figura 6), em 7 e 28 dias de armazenamento, a fosfolipase permaneceu, respectivamente, com 99,11 e 65% de atividade relativa. Dong *et al.* (2012), que estudaram a imobilização de lipase via adsorção em organobentonita, verificaram que a lipase imobilizada reteve 80,7% de sua atividade inicial quando armazenada em solução tampão a 4°C por oito dias. Yang *et al.* (2009), ao estudarem a

imobilização por encapsulamento de lipase de *Arthrobacter sp.* em materiais hidrofóbicos (vinil-trimetóxi-silano, trietoxi(octil)silano, 3-metacriloxipropil-trimetoxi-silano, tetraetoxissilano), visando à melhoria das propriedades catalíticas, constataram que a lipase imobilizada e seca, armazenada em temperatura ambiente, manteve 54% da atividade inicial após 60 dias.

CONCLUSÕES

A fosfolipase de panificação utilizada no presente estudo pode ser aplicada para a hidrólise da fração lipídica de efluente de frigorífico de suínos tanto na forma livre como na imobilizada. O valor máximo de ácidos graxos livres obtido, se utilizada

a fosfolipase imobilizada, indica que esse efluente pode ser biodegradado com mais facilidade pelos micro-organismos anaeróbios do sistema de tratamento, considerando a disponibilidade do substrato previamente hidrolisado. Assim, a condição otimizada de hidrólise da fração lipídica do efluente foi a condição central do planejamento experimental.

Além disso, os resultados mostraram o possível reúso da enzima imobilizada por sucessivos ciclos, bem como a possibilidade de armazenamento da fosfolipase imobilizada em temperatura de refrigeração e em solução de cloreto de sódio por até 28 dias. Novos estudos devem ser realizados para avaliar a biodegradabilidade do efluente pré-hidrolisado, visando verificar possíveis incrementos em taxas de reação e na geração de biogás.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). (2012) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 22. ed. Washington, D.C.: APHA. 1496 p.
- BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H.R. (2008) Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 10, p. 566-572. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.06.009
- CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. (2006) A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 17, p. 2195-2210. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.030
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O.R. (2010) *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 900 p.
- DESAI, P.D.; DAVE, A.M.; DEVI, S. (2004) Entrapment of lipase into K-Carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 31, n. 4-6, p. 143-150.
- DEVLIN, T.M. (2011) *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. 7. ed. São Paulo: Blucher. 1199 p.
- DONG, H.; LI, J.; LI, Y.; HU, L.; LUO, D. (2012) Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chemical Engineering Journal*, v. 181-182, p. 590-596. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.095>
- DORS, G.; MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; FURIGO JR., A. (2013) Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. *Applied Water Science*, v. 3, n. 1, p. 343-349.
- DUMORE, N.S.; MUKHOPADHYAY, M. (2012) Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 68, p. 65-70.
- FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BOM, E.P.S. (1997) Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 28, n. 1, p. 6-12.
- JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. (2006) Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials B*, v. 137, n. 1, p. 121-128. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.11.106
- JIANG, F.; WANG, J.; KALEEM, I.; DAI, D.; ZHOU, X.; LI, C. (2011) Degumming of vegetable oils by a novel phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens* BIT-18. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 17, p. 8052-8056. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.050>
- KEMPKA, A.P.; CELUPPI, R.; REVELLO, J.H.P. (2013) Lipase and phospholipase in the hydrolysis of lipids in wastewater from swine slaughterhouse and subsequent biological treatment study. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, v. 3, p. 757-765.
- KEMPKA, A.P.; SOUZA, S.M.A.G.U.; SOUZA, A.A.U. (2014) Lipase immobilisation in matrix comprised of gelatin of different bloom numbers with the addition of hydrophilic plasticisers. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 92, n. 6, p. 989-999. DOI: 10.1002/cjce.21956
- KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 377-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>

- LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR., G.L. (2002) Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. In: *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 175-180. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322002000200013>
- LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA JR., G.L. (2006) Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. In: *Process Biochemistry*, v. 41, n. 5, p. 1173-1178. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.12.014
- LEITÃO, R.C.; HAANDEL, A.C.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. (2006) The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 9, p. 1105-1118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.007>
- MASSE, L.; MASSÉ, D.I.; KENNEDY, K.J. (2003) Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 9, p. 1365-1372. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00020-7
- MORENO-PIRAJÁN, J.C.; GIRALDO, L. (2011) Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.019>
- NELSON, D.L.; COX, M.M. (2011) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 1274 p.
- PALLA, C.A.; PACHECO, C.; CARRIN, M.E. (2011) Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 55, n. 3, p. 199-207. DOI: 10.1016/j.bej.2011.04.008
- RAMALHO, R.S. (2010) *Tratamiento de águas residuales*. Barcelona: Reverté. 716 p.
- RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; LUCCIO, M.D. (2008) Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater. *Environmental Engineering Science*, v. 25, n. 9, p. 1243-1248. <https://doi.org/10.1089/ees.2007.0197>
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001) *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Blucher. v. 3. 593 p.
- SILVA, R.L.F.O.B.; SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. (2008) Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 642-648.
- 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, n. 4, p. 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.03.005>
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 4-6, p. 113-148. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00107-1)
- VON SPERLING, M. (1996) *Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 2. ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG. 243 p.
- WON, K.; KIM, S.; KIM, K.-J.; PARK, H.W.; MOON, S.-J. (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 6, p. 2149-2154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>
- YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. (2009) Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol-gel materials. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 19, p. 4311-4316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.069>