

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE GORDURAS DE ORIGEM ANIMAL

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Ernesto Raizer Neto

Rogério Gross

Florianópolis, Março de 1996

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE GORDURAS DE ORIGEM ANIMAL

por

Rogério Gross

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química
especialidade **Engenharia Química**
área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**
e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação.

BANCA EXAMINADORA:



Ernesto Raizer Neto, Dr.
(Orientador)



Geraldo Lippel Santana, Dr.



Eliane Moretto, Dr.

Florianópolis, 29 de Março de 1996

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ernesto Raizer Neto pela orientação.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos que colaboraram na realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Fundação Banco do Brasil pelo suporte financeiro na aquisição de equipamentos e reagentes necessários à realização deste trabalho.

"Quem ama a disciplina ama o conhecimento"
(Salomão)

À

Isolina

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.0 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 3 |
| 2.1 Introdução | 3 |
| 2.2 Gorduras | 4 |
| 2.2.1 Ocorrência e composição das gorduras | 4 |
| 2.3 Enzimas | 6 |
| 2.3.1 Definição e natureza | 7 |
| 2.3.2 Classificação das enzimas | 9 |
| 2.4 Cinética enzimática | 10 |
| 2.4.1 Hidrólise enzimática de óleos e gorduras | 10 |
| 2.4.2 Atividade enzimática | 11 |
| 2.4.3 Principais fatores que influenciam na atividade enzimática | 11 |
| 2.4.4 Cinética enzimática em fase homogênea | 15 |
| 2.5 Lipase - caracterização e aplicação | 20 |
| 2.6 Tratamento de efluentes gordurosos | 22 |
| 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Preparo dos reagentes | 24 |
| 3.1.1 Preparo das soluções | 24 |
| 3.1.2 Preparo dos triglicerídeos | 24 |
| 3.1.3 Preparo da solução de lipase | 25 |
| 3.2 Métodos analíticos | 25 |
| 3.2.1 Índice de saponificação | 25 |
| 3.2.2 Acidez | 26 |
| 3.2.3 Percentual de hidrólise H(%) e taxa de hidrólise, h | 28 |
| 3.2.4 Atividade enzimática | 29 |
| 3.2.5 Análise de glicerol | 30 |
| 3.3 Ensaios para determinação das condições adequadas de operação | 31 |
| 3.3.1 Agitação | 31 |
| 3.3.2 Temperatura | 33 |
| 3.4 Ensaios de hidrólise enzimática | 35 |
| 3.5 Determinação das propriedades físicas e químicas dos substratos | 36 |
| 3.5.1 Ponto de fusão | 36 |
| 3.5.2 Densidade | 37 |
| 3.5.3 Peso molecular | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.6 Resultados obtidos na determinação das propriedades físicas e químicas dos substratos | 38 |
| 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 4.1 Resultados dos métodos analíticos | 40 |
| 4.1.1 Índice de saponificação de Koettstorfer | 40 |
| 4.1.2 Atividade enzimática | 41 |
| 4.2 Ensaio para a determinação das condições adequadas | 42 |
| 4.2.1 Agitação | 42 |
| 4.2.2 Temperatura ótima | 43 |
| 4.3 Ensaio de hidrólise enzimática | 46 |
| 5.0 CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 53 |
| ABSTRACT | 54 |
| BIBLIOGRAFIA | 55 |
| APÊNDICE | 58 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----|---|---|
| 01 | Composição química das gorduras | 4 |
| 02 | Principais ácidos graxos que compõem as gorduras de origem animal | 5 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----|--|----|
| 01 | Condições dos ensaios de atividade enzimática | 29 |
| 02 | Condições dos ensaios de agitação | 32 |
| 03 | Condições dos ensaios na determinação da temperatura ótima | 34 |
| 04 | Condições para os ensaios de hidrólise enzimática | 35 |
| 05 | Propriedades físicas e químicas dos substratos | 38 |
| 06 | Índices de saponificação | 40 |
| 07 | Atividade enzimática | 41 |
| 08 | Temperatura ótima | 43 |
| 09 | Resumo dos resultados obtidos na hidrólise enzimática | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----|--|----|
| 01 | Cadeias estendidas dos ácidos graxos | 6 |
| 02 | Energia de ativação de uma reação com ou sem catalisador | 7 |
| 03 | Especificidade da enzima em relação ao substrato..... | 8 |
| 04 | Atividade enzimática em função do pH | 12 |
| 05 | Atividade enzimática em função da temperatura | 13 |
| 06 | Atividade enzimática em função da agitação | 14 |
| 07 | Atividade enzimática em função da concentração de enzima | 14 |
| 08 | Curva de aparecimento do produto em função do tempo | 16 |
| 09 | Representação esquemática da equação de Michaelis-Menten | 18 |
| 10 | Determinação de K_m e V_m pelo método de Lineweaver-Burk | 18 |
| 11 | Influência da agitação na atividade enzimática | 42 |
| 12 | Temperatura ótima para a banha de porco | 44 |
| 13 | Temperatura ótima para a banha de frango | 45 |
| 14 | Temperatura ótima para o sebo de boi | 45 |
| 15 | Hidrólise da banha de porco | 47 |
| 16 | Hidrólise do sebo de boi | 48 |
| 17 | Hidrólise da banha de frango | 49 |
| 18 | Influência da concentração de substrato na cinética enzimática | 50 |
| 19 | Formação de mono e diglicerídeos durante a reação enzimática | 51 |

RESUMO

Nas estações de tratamento de efluentes de abatedores, a primeira etapa realizada pelos microorganismos para degradar as gorduras residuais, é a produção de enzimas capazes de hidrolizar os triglicerídeos presentes, formando assim, ácidos graxos, glicerol e água. Como esta etapa do processo é muito lenta e nem sempre há a presença de microorganismos específicos para a produção de lipase, os sistemas convencionais de tratamento, em geral, não conseguem atingir bons resultados no que diz respeito à degradação de gorduras.

Este trabalho estuda a hidrólise enzimática de triglicerídeos, utilizando uma enzima comercial: lipase sp 398, gentilmente cedida pela empresa, Novo Nordisk, e três substratos distintos: sebo de boi, banha de porco e banha de frango. Estes substratos, com exceção da banha de porco, adquirida no comércio local, foram processados em laboratório a partir de gorduras obtidas em abatedores.

Foram realizados vários ensaios para a obtenção de parâmetros cinéticos e avaliação das condições ótimas de operação, como temperatura, e agitação, para um valor de pH e concentração de substrato pré-fixados e escolhidos em conformidade com as condições em que se encontram normalmente os efluentes de abatedores.

Uma vez conhecida a temperatura ótima para cada substrato, foram iniciados os experimentos para determinar o percentual de hidrólise no tempo, fazendo-se uso da titulometria como método de análise.

As temperaturas encontradas para o sebo de boi, banha de porco e banha de frango foram 50 °C, 50 °C e 40 °C respectivamente. A concentração inicial de substrato utilizada foi de 5000 mg/l, o pH igual a 7,2 e a velocidade de agitação igual a 200 r.p.m.

O percentual de hidrólise, atingiu o seu valor máximo (100%), em aproximadamente 3 h, para os três substratos estudados.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise enzimática, nota-se que este processo apresenta um grande potencial de aplicação no pré-tratamento de efluentes gordurosos, tornando mais eficientes os sistemas convencionais, com a redução do tempo de residência e a eliminação da camada gordurosa nas lagoas de estabilização.

1.0 INTRODUÇÃO

A qualidade ambiental é um tema que frequentemente tem tomado espaço na mídia, através de documentários e debates que mostram os problemas gerados pela poluição do meio ambiente.

Este fato, somado às normas internacionais para certificar a qualidade ambiental, como a ISO 14000, e uma legislação ambiental cada vez mais restritiva, tem obrigado as empresas a buscarem novas tecnologias no combate a poluição.

Os abatedores pertencem a um setor industrial que apresenta sérios problemas nos sistemas de tratamento de efluentes, devido ao fato da degradação natural das gorduras residuais ser um processo biológico muito lento; o que leva normalmente à formação de uma camada gordurosa sobre as lagoas de estabilização comprometendo mais ainda a eficiência destes sistemas.

Empresas especializadas em processos biotecnológicos, utilizando culturas de microorganismos selecionados, melhoraram a eficiência dos sistemas convencionais de tratamento de efluentes gordurosos, porém não conseguiram resolver o problema, uma vez que camadas gordurosas continuaram a formar-se (embora mais lentamente).

Pode-se encontrar na literatura, muitos trabalhos descrevendo processos enzimáticos para hidrolisar triglicerídeos, em geral, utilizando óleo de oliva como substrato, no entanto, poucos são os trabalhos que utilizam gorduras de origem animal como substrato.

Este trabalho propõe um pré-tratamento para as gorduras residuais, utilizando um processo enzimático eficaz, com o objetivo de eliminar a camada gordurosa das lagoas e diminuir o tempo de degradação destes rejeitos. Para tanto estudou-se a hidrólise enzimática de três substratos: sebo de boi, banha de porco e banha de frango, utilizando uma enzima comercial, lipase sp 398 (Novo Nordisk). A partir deste estudo determinou-se as condições ótimas de operação, bem como os parâmetros cinéticos das reações.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Introdução

Este capítulo tem como objetivo, fundamentar conceitos e definições utilizadas neste trabalho, evidenciando também a natureza e principais características dos substratos e das enzimas.

Uma revisão bibliográfica apresentando vários trabalhos desenvolvidos na caracterização e aplicação de lipases é apresentada no final deste capítulo, bem como são enfocados os principais problemas encontrados nos sistemas convencionais de tratamento de efluentes gordurosos.

Os itens 2.2, 2.3 e 2.4, foram escritos baseando-se principalmente na seguinte literatura:

Borzani, W. et al [1], Cornish-Bowden, A. [3], Hubert, R.[9], Morrison, R. [15], Stryer,T. [17].

Outras citações são encontradas no próprio texto.

2.2 Gorduras

2.2.1 Ocorrência e composição das gorduras

As gorduras ou triglicerídeos são uma das mais importantes reservas alimentares do organismo. Nos mamíferos, o maior acúmulo dos triglicerídeos ocorre no citoplasma das células adiposas (células gordurosas), estas células são especializadas para a síntese e armazenamento dos triglicerídeos e para sua mobilização em moléculas combustíveis que são transportadas a outros tecidos pelo sangue.

Quimicamente, as gorduras são ésteres carboxílicos derivados de um único álcool, o glicerol e por isso conhecidas como triglicerídeos. Como se pode ver no Quadro 01 (extraído de: Morrison,R., et al. pg. 1236) [15], cada gordura está constituída por triglicerídeos derivados de numerosos ácidos carboxílicos diferentes. As proporções dos vários ácidos variam de gordura para gordura e cada gordura tem sua composição característica.

| <i>Gorduras</i> | <i>Ácidos saturados (%)</i> | | | | | <i>Ácidos insaturados (%)</i> | | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | | | <i>C:1</i> | <i>C:1</i> | <i>C:1</i> | <i>C:1</i> | <i>C:2</i> |
| | <i>C₁₂</i> | <i>C₁₄</i> | <i>C₁₆</i> | <i>C₁₈</i> | <i>C₂₀</i> | <i>C₁₄</i> | <i>C₁₆</i> | <i>C₁₈</i> | <i>C₂₀</i> | <i>C₁₈</i> |
| Sebo de boi | 0.2 | 2-3 | 25-30 | 21-26 | 0.4-1 | 0.5 | 2-3 | 39-42 | 0.3 | 2 |
| Banha de porco | | 1 | 25-30 | 12-16 | | 0.2 | 2-5 | 41-51 | 2-3 | 3-8 |

Quadro 01 - Composição química das gorduras

Os ácidos graxos usualmente possuem um número par de átomos de carbono, tipicamente entre 14 e 24. Os ácidos graxos em C₁₆ e C₁₈ são os mais comuns. A cadeia hidrocarbonada é quase sempre não ramificada, nos ácidos graxos de origem animal, podendo ser saturada ou possuir uma ou mais duplas ligações. A configuração da dupla ligação na maioria dos ácidos não saturados é *cis*. As duplas ligações nos ácidos poli-insaturados estão separadas, no mínimo, por um grupo metileno.

As propriedades dos ácidos graxos e dos lipídeos derivados são acentuadamente dependentes do comprimento da cadeia e do número de duplas ligações. Os ácidos graxos não saturados tem um ponto de fusão mais baixo do que os ácidos saturados com cadeia de igual comprimento, como pode ser visto no Quadro 02.

| <i>n° de carbonos</i> | <i>Nome comum</i> | <i>Fórmula</i> | <i>P.f (°C)</i> |
|-----------------------|-------------------|--|-----------------|
| C ₁₂ | Láurico | CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH | 44 |
| C ₁₄ | Mirístico | CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH | 54 |
| C ₁₆ | Palmítico | CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH | 63 |
| C ₁₈ | Estearico | CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH | 70 |
| C _{16:1} | Palmitoleico | CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH | |
| C _{18:1} | Oleico | CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH | 16 |
| C _{18:2} | Linoleico | CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ OOH | -5 |

Quadro 02 - Principais ácidos graxos que compõem as gorduras de origem animal

As ligações duplas com configuração *cis* tem um efeito de significado biológico vital: faz baixar o ponto de fusão. As cadeias dos ácidos saturados estão estendidas em forma linear, com o ziguezaguear próprio dos ângulos tetraédricos das ligações e ajustam-se bastante bem umas às outras. As cadeias dos ácidos insaturados *trans*, podem encontrar-se também estendidas em conformações lineares que se casam bastante bem com as cadeias dos ácidos saturados, como pode ser visto na Figura 01. As cadeias dos ácidos insaturados *cis* tem uma dobra na ligação dupla, e ajustam-se mal tanto umas às outras, como às cadeias saturadas. Em consequência, a insaturação *cis* baixa o ponto de fusão da gordura.

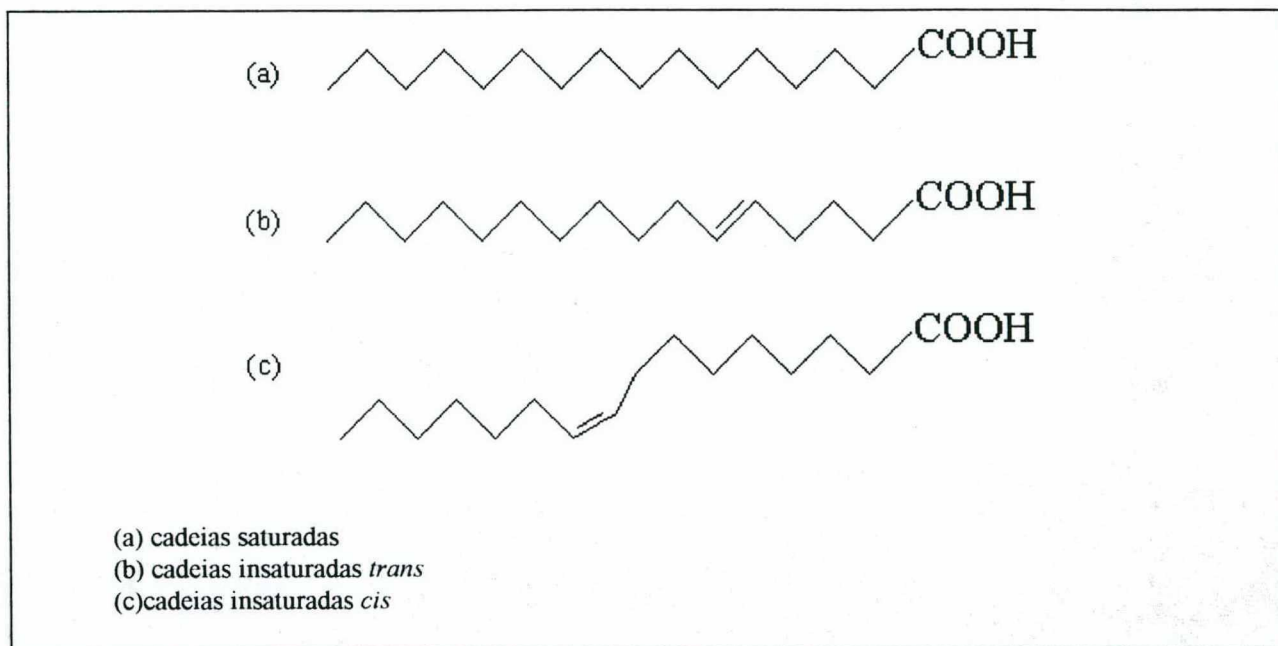


Figura 01 - Cadeias estendidas dos ácidos graxos

2.3 Enzimas

2.3.1 Definição e natureza

Quando duas moléculas diferentes se chocam, a energia produzida pode ser dissipada sob a forma de calor ou absorvida pelas moléculas. Se a energia absorvida pelo substrato (S) for suficiente para transpor uma barreira de potencial, denominada energia de ativação (E), o substrato pode se transformar em produto (P). Como esta energia de ativação é, geralmente, elevada e não compatível com as condições do meio no qual devem se desenvolver as reações do metabolismo do organismos vivos: pH próximo da neutralidade, temperatura entre 0 e 40 °C e pressão atmosférica, a realização de tais reações necessita de catalisadores bioquímicos, as enzimas, cuja ação consiste em diminuir a energia de ativação, Figura 02, acelerando assim a velocidade da reação.

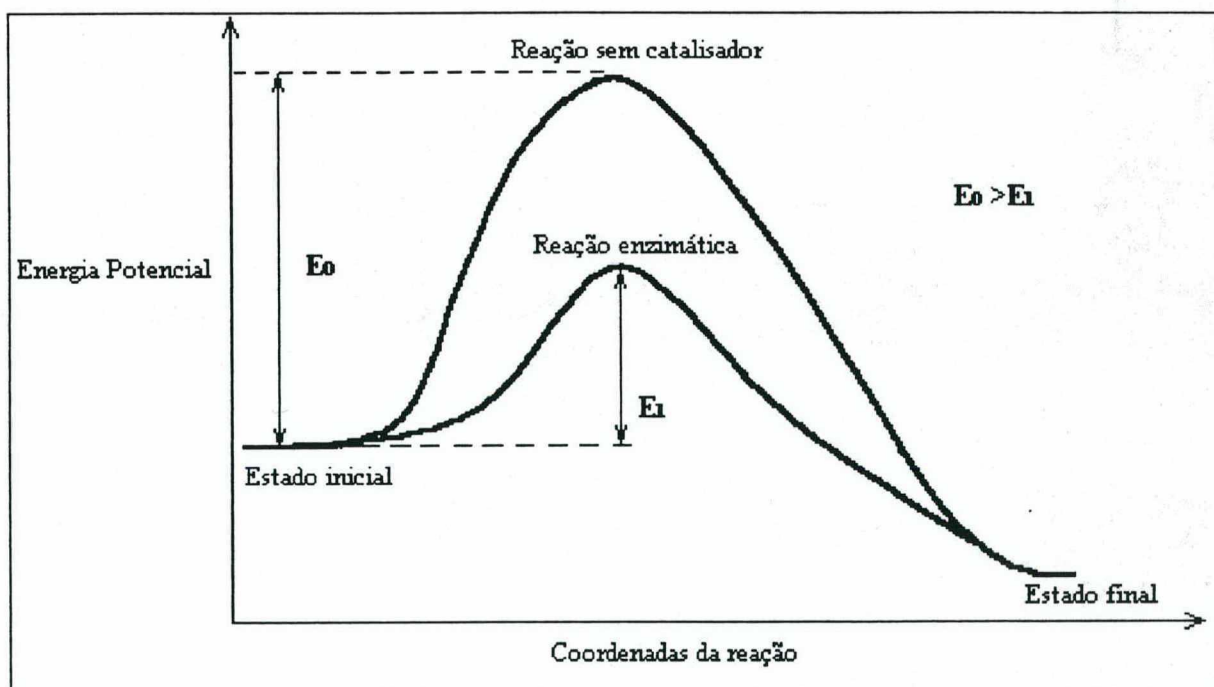


Figura 02 - Energia de ativação de uma reação, com ou sem catalisador

Ao final de cada ciclo de reação, a enzima permanece intacta.



As enzimas são, portanto, catalisadores biológicos de natureza protéica, todas elas são macromoléculas que pertencem à classe das proteínas globulares, que intervêm em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis às quais elas aceleram por ativação específica.

Uma das características principais da catálise enzimática é sua especificidade, que apresenta um duplo aspecto:

- Especificidade quanto à reação: Uma enzima só pode catalizar um dado tipo de reação, como por exemplo: a hidrólise de ligações ésteres.

- Especificidade quanto ao substrato: A proteína enzimática fixa o substrato pelo estabelecimento de ligações do tipo hidrogênio, hidrofóbicas ou forças de Van der Waals. A conformação da proteína enzimática é tal que ela só reconhece um tipo de substrato, Figura 03. A pequena porção de enzima implicada na fixação e no posicionamento do substrato, assim como na reação da catálise, delimita um volume chamado de “sítio ativo”.

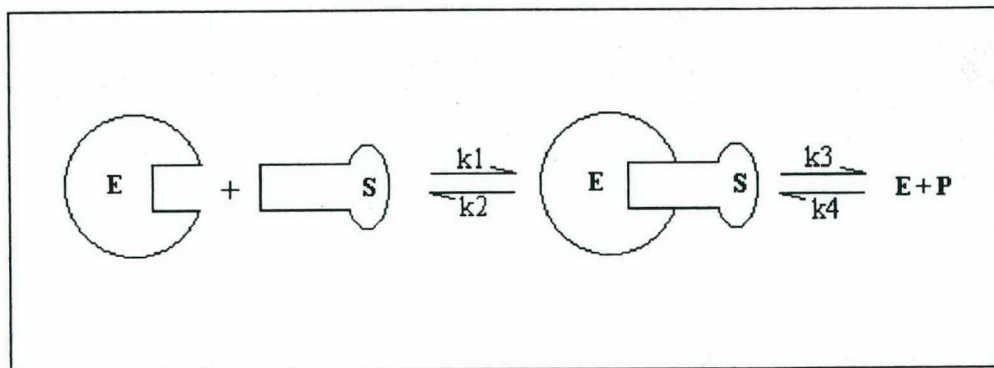


Figura 03 - Especificidade da enzima em relação ao substrato.

2.3.2 Classificação das enzimas

A classificação das enzimas foi normalizada pela Comissão Sobre as Enzimas da União Internacional de Bioquímica, criada em 1955. Essas classes, em número de 6, são definidas de acordo com a natureza geral da reação catalisada, como apresentado abaixo:

Classe 1 - Oxi-redutases

Elas catalisam as reações de oxi-redução; transferência de hidrogênio ou de elétrons de um doador, que está oxidado, para um aceptor que está reduzido; por exemplo: Álcool desidrogenase.

Classe 2 - Transferases

Elas catalisam as reações de transferência de radicais ou de agrupamentos; por exemplo: Alanina amino-transferase.

Classe 3 - Hidrolases

Elas provocam a hidrólise de diversos tipos de ligações; por exemplo: Triacilglicerol acil-hidrolase.

Classe 4 - Liases

São as enzimas que rompem as ligações C-C, C-O, C-N ou outras por meio diferente da hidrólise ou da oxidação com a criação de uma dupla ligação sobre um dos fragmentos; por exemplo: Pectina-liase.

Classe 5 - Isomerases

Elas catalisam as reações de isomerização: racemização, epimerização, isomerização *cis trans* ou, a transferência de grupo ou oxidorredução; por exemplo: Xilose isomerase.

Classe 6 - Ligases ou Sintetases

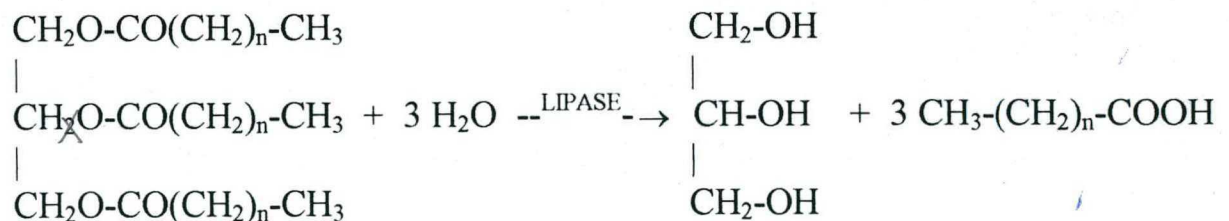
São enzimas que catalisam a reação de duas moléculas ligadas, com a ruptura, sem intervenção de água, de uma ligação pirofosfórica no ATP ou, eventualmente, no nucleotídeo trifosfórico do mesmo tipo; por exemplo: Asparagina-sintetase.

2.4 Cinética enzimática

2.4.1 Hidrólise enzimática de óleos e gorduras

Antes de se dar início ao processo de degradação de gorduras contidas em um efluente, deve-se dar a hidrólise dos triglicerídeos.

Nas lagoas de estabilização de efluentes de abatedores os microorganismos inicialmente produzem lipases capazes de hidrolizar os triglicerídeos, segundo a reação abaixo:



Nas lagoas de estabilização as condições para que a reação de hidrólise ocorra não estão otimizadas e em geral encontram-se muito distantes das condições apropriadas, como por exemplo: temperatura, pH e agitação, que é praticamente nula.

Torna-se portanto necessário um pré-tratamento cuja cinética esteja bem estabelecida e mostre as condições como temperatura, agitação e pH em que a reação é favorecida.

2.4.2 Atividade enzimática

A determinação da atividade da enzima envolve a medida da velocidade da reação. A Comissão Sobre Enzimas da União Internacional de Bioquímica, recomenda as seguintes definições:

“Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato, ou a formação de 1 μ mol de produto por minuto”, nas condições de ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato, etc). Pode-se ainda relacionar esta unidade com a quantidade (mg) de proteína da enzima, passando a chamar-se então de atividade específica (U/mg). Quando considera-se a transformação de 1 mol de substrato por segundo, a unidade passa a chamar-se **katal**.

2.4.3 Principais fatores que influenciam na atividade enzimática

Influência do pH

Todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração em H^+ do meio. Em geral elas são ativas somente numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo bem definido, Figura 04. Há vários efeitos que influenciam a determinação deste pH ótimo:

- Efeito do pH na reversibilidade da reação.

- Efeito do pH sobre a afinidade enzima-substrato, devida ao decréscimo da saturação da enzima com o substrato;
- Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, que pode destruí-la irreversivelmente.

Estes efeitos normalmente ocorrem ao mesmo tempo e podem ser facilmente observados experimentalmente.

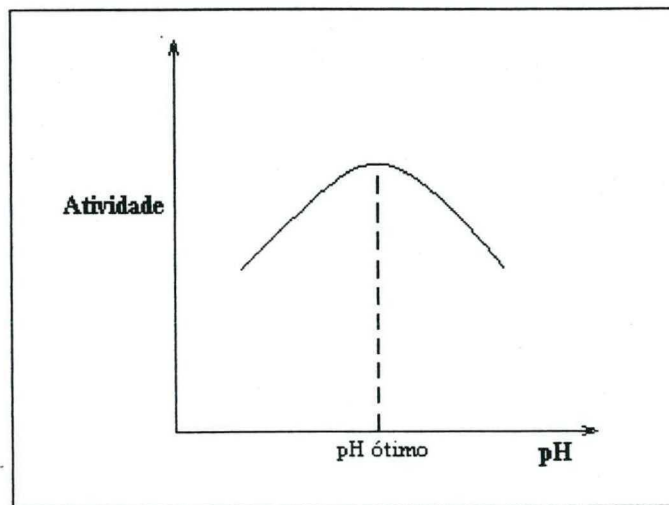


Figura 04 Atividade enzimática em função do pH

Influência da temperatura

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente:

- A taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas, devido ao aumento da frequência das colisões entre o substrato e a enzima;
- A estabilidade da enzima decresce devido a desnaturação da proteína enzimática, Figura 05. Esta desnaturação vai modificar a estrutura da proteína e fazer, portanto,

a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade.

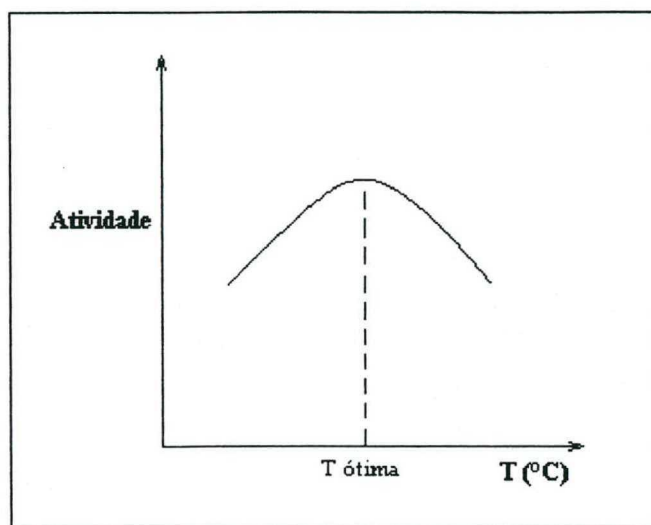


Figura 05 - Atividade enzimática em função da temperatura

Influência da agitação

Para o caso da lipase situada na interface óleo-água, a agitação mostra-se um fator essencial para aumentar a frequência das colisões entre a enzima e o substrato de modo a acelerar o desenvolvimento da reação enzimática como pode ser visto na Figura 06.

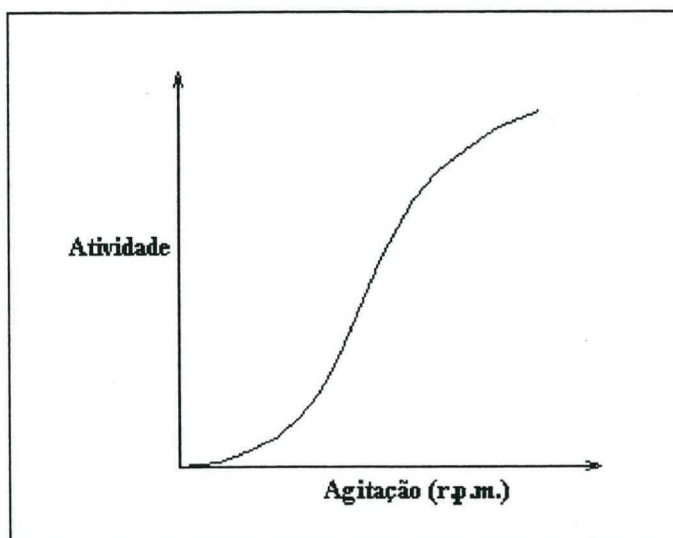


Figura 06 - Atividade enzimática em função da agitação

Influência da concentração de enzima

O estudo da concentração de enzima nos mostra que as velocidades iniciais variam de modo não linear, como pode ser visto na Figura 07. A curva apresenta uma trajetória hiperbólica que corresponde ao fato que, além de uma certa concentração de enzima, a totalidade do substrato encontra-se sob a forma de complexo enzima-substrato.

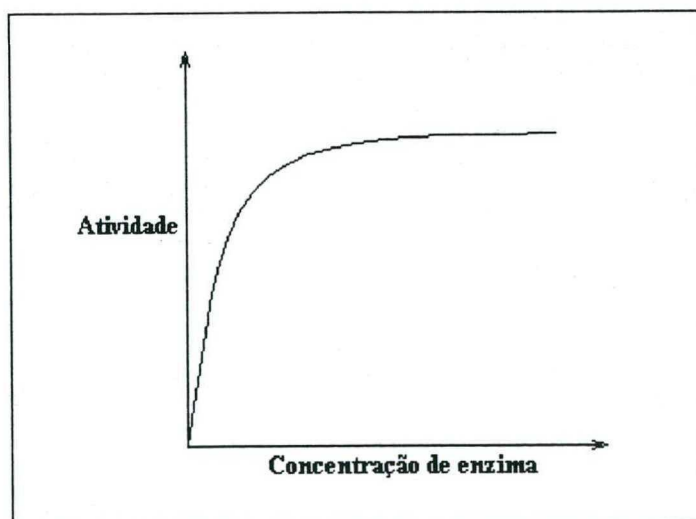


Figura 07 - Atividade enzimática em função da concentração de enzima

2.4.4 Cinética enzimática em fase homogênea

Por cinética enzimática, entende-se a análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influenciam a atividade enzimática, avaliada através do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada. A atividade da enzima, e portanto a cinética enzimática, é determinada pela concentração da enzima, concentração do substrato e sua disponibilidade, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores (quando presentes), e ainda pH e temperatura.

Convencionalmente, em cinética enzimática o conceito de velocidade de reação está associado à velocidade inicial, onde a influência de muitos fatores é desprezível.

Um dos modelos cinéticos mais aceitos para explicar a influência da concentração de substrato na cinética de uma reação enzimática é o de Michaelis-Menten. Este modelo, admite que, inicialmente a enzima e o substrato interagem reversivelmente, formando um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato (ES) que, por sua vez, ou se decompõe ou interage com outra substância, regenerando a enzima e formando os produtos da reação segundo o seguinte esquema :



onde:

E enzima;

S substrato;

ES complexo enzima-substrato;

k₁, k₂, k₃ constantes de velocidade de formação ou dissociação de ES.

A velocidade de formação de produto (dP/dt) ou desaparecimento do substrato ($-dS/dt$), é representada pela inclinação da tangente à curva, que diminui em função do tempo em consequência do desaparecimento do substrato durante a reação. No entanto no início da reação a velocidade permanece constante (Figura 08), e é denominada de velocidade inicial.

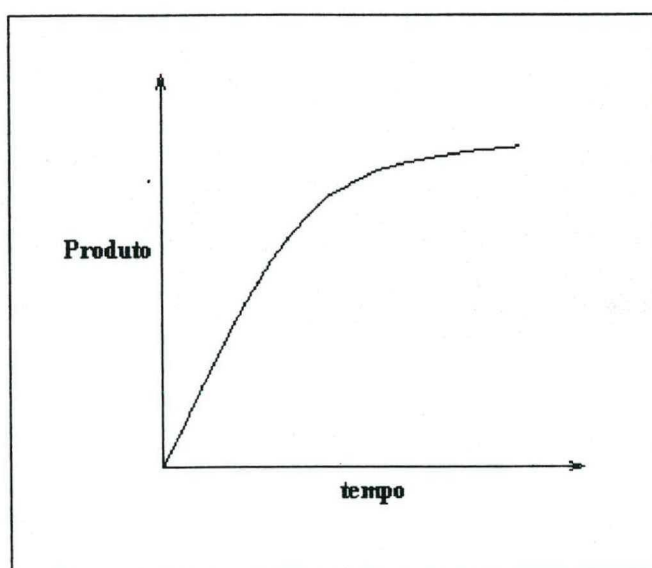


Figura 08 - Curva de aparecimento do produto em função do tempo

Considerando a hipótese de Michaelis-Menten, juntamente com a hipótese do estado estacionário de Briggs e Haldane:

- (i) $k_3 \ll k_2$;
- (ii) E e S estão em equilíbrio;
- (iii) A velocidade de formação do complexo ES é igual a sua velocidade de decomposição.

tem-se:

$$k_1(E)(S) = (k_2 + k_3)ES \quad (1)$$

Considerando que a quantidade de enzima colocada no meio de reação (E_T) reparte-se em uma fração livre (E) e outra complexa (ES) tem-se:

$$E_T = E + ES \quad (2)$$

Substituindo-se (1) em (2), tem-se:

$$E_T = ES [1 + (k_2 + k_3)/k_1 S] \quad (3)$$

Como a velocidade de formação de produto é dada por:

$$v = k_3 ES \quad (4)$$

Chega-se à equação de Michaelis-Menten:

$$v = V_m S / (K_m + S) \quad (5)$$

onde:

$K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ Este termo é denominado, constante de Michaelis-Menten;

$V_m = k_3 E_T$ Este termo é conhecido como, “velocidade máxima”.

As unidades de K_m e V_m são, em geral, [mol/l] e [mol/min.l] respectivamente.

A representação da equação (5) pode ser vista na Figura 09.

Invertendo-se ambos os membros da equação (5) resulta:

$$1/v = 1/V_m + K_m/V_m S \quad (6)$$

que é a equação de uma reta, representada na Figura 10. Esta representação linear para determinar K_m e V_m , chama-se método de Lineweaver-Burk.

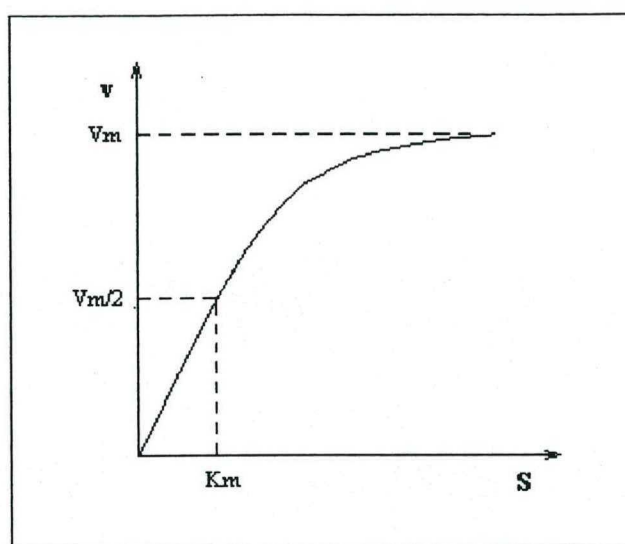


Figura 09 - Representação esquemática da equação de Michaelis-Menten

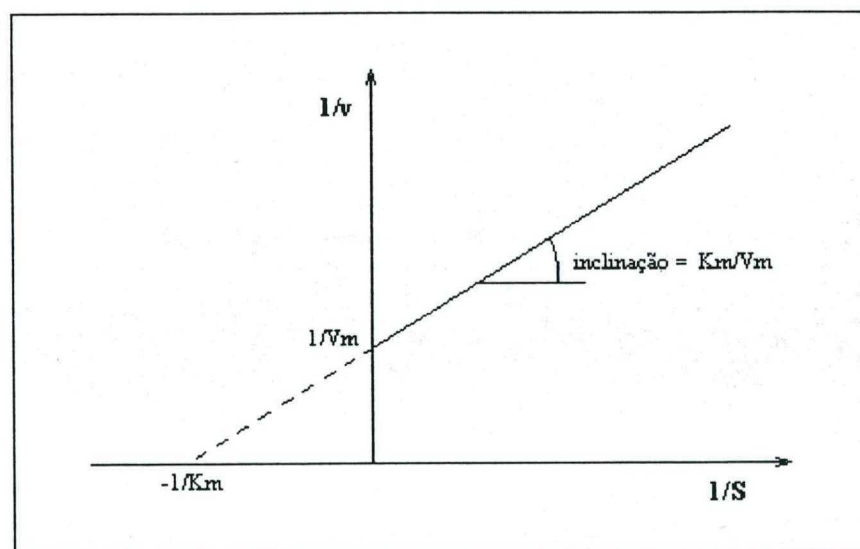


Figura 10 - Determinação de K_m e V_m pelo método de Lineweaver-Burk

Um modelo cinético utilizando como parâmetro a taxa de hidrólise, h , no tempo, foi descrito por Kosugi et al [13]. A equação hiperbólica é dada pela seguinte equação:

$$h = t H / (t_m + t) \quad (7)$$

onde:

$$h = (S_0 - S) / S_0 \quad (8)$$

Estudos dos esquemas da reação enzimática mostram que t_m é uma função de: K_m , V_m , H , e S_0 . Enquanto H é uma função de: S_0 e da constante de equilíbrio, quando a quantidade de enzima é elevada ou estável bastante de modo que a atividade enzimática se mantenha até que a reação alcance o equilíbrio.

Considerando a equação de Michaelis nos seguintes termos:

$$-dS/dt = V_m S / (K_m + S) \quad (9)$$

A equação (9) pode ser remanejada usando a equação (8)

$$dh/dt = V_m (1-h) / [K_m + S_0(1-h)] \quad (10)$$

A equação (10) mostra as estreitas relações que existem entre as constantes de Michaelis e as constantes cinéticas t_m e H .

2.5 Lipase - caracterização e aplicação

A fabricação de ácidos carboxílicos e glicerol é realizada em geral pela hidrólise de óleos à temperatura e pressão elevadas, por exemplo: 250 °C e 55 atm. A hidrólise enzimática mostra-se um processo alternativo muito promissor, pela economia de energia que apresenta pois esta reação ocorre a temperatura e pressão ambientes.

As lipases (Triacilglicerol-acilhidrolases; EC 3.1.1.3), atuam na interface óleo-água catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos (Brockman, H. L., 1984) [2].

Diversas espécies de bactérias, principalmente *Pseudomonas* sp. tem sido anunciadas como produtoras de lipase (Sztajer et al, 1988) [20], e a preocupação com a produção destas lipases gerou diversos trabalhos (Tan e Gill, 1987 [21], Suzuki et al, 1988 [18], Gilbert et al, 1991 [7]).

Várias indústrias utilizam a lipase obtida da *Candida cylindracea* para hidrolisar o óleo de linhaça e na produção de sabões em pó. No entanto uma das principais matérias primas para produzir ácidos carboxílicos é o sebo de boi, cujo ponto de fusão está acima da temperatura em que a lipase da *Candida cylindracea* é estável. Problemas como este levaram vários pesquisadores à buscarem alternativas como o isolamento e o estudo de microorganismos que produzam lipases termoestáveis.

Kosugi et al (1988) [12], isolaram uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, que mostrou-se termo-resistente e capaz de hidrolisar o sebo de boi. Este trabalho também mostrou o efeito da concentração de enzima e de substrato na atividade enzimática.

Lizumi et al (1990) [10] caracterizaram uma lipase termoestável obtida à partir de uma espécie de *Pseudomonas*, denominada por KWI-56, que se mostrou eficiente na hidrólise de óleos e gorduras diversas, inclusive o sebo de boi. Este trabalho também contém um estudo que mostra a sensibilidade apresentada por esta enzima frente a vários sais e reagentes.

Sztajer et al (1988) [20], determinaram várias propriedades de uma lipase termoestável de uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, que foi isolada à partir de amostras de solo contaminado com óleo.

Dring et al (1983) [5], caracterizaram uma lipase termoestável de uma espécie de *Pseudomonas*, denominada AFT 29, que foi isolada à partir de leite refrigerado.

Dünhaupt et al (1992) [6], em um estudo sobre a lipase de uma cepa de *Pseudomonas cepacea*, mostram a influência de ácidos carboxílicos (que podem ser produtos da própria reação enzimática), na hidrólise de óleo de oliva.

Kosugi et al (1990) [11], propõem um processo de hidrólise contínua, utilizando lipase imobilizada como catalisador. Foram comparados os resultados obtidos em um reator de leito fixo e outro de leito fluidizado. Este trabalho também estuda o efeito de solventes orgânicos na hidrólise de vários substratos.

2.6 Tratamento de efluentes gordurosos

Os processos convencionais de tratamento de efluentes utilizam os microorganismos que se desenvolvem naturalmente no sistema.

Nas lagoas de estabilização de tratamento de efluentes gordurosos, mesmo quando o processo é otimizado pelo uso de microorganismos selecionados, é muito comum a formação de uma camada gordurosa, por vezes bastante espessa, devido principalmente a insolubilidade deste material na água e à falta de agitação adequada.

Resultados obtidos com reatores como o UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor), divulgados inicialmente em 1982 (Craveiro et al) [4], impulsionaram as pesquisas voltadas ao tratamento de diversos tipos de efluentes industriais (Hirata et al,1988) [8], incluindo-se aí óleos vegetais (Vitoratto et al, 1983) [22].

A questão do pré-tratamento eficiente é essencial para efluentes ricos em gorduras. Dados obtidos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), mostraram que até o final de 1994 havia no Brasil um total de apenas 6 plantas de tratamento anaeróbio em indústrias de abatedores e que embora eficientes em alguns casos, sempre requerem um longo tempo de residência e um grande volume.

Embora a hidrólise de gorduras por lipases seja um processo bem conhecido, nenhum trabalho, propondo a utilização de lipases como pré-tratamento de efluentes gordurosos, foi encontrado.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram realizados diversos experimentos para estudar a hidrólise enzimática de triglicerídeos de três diferentes procedências: sebo de boi, banha de frango e banha de porco. A banha de frango, por não existir comercialmente, foi elaborada a partir de gordura abdominal de frangos (resíduo de abatedores) cedida pela empresa Macedo-Koerich. O sebo de boi, embora encontrado comercialmente, foi obtido na forma de gordura bovina congelada em um açougue e processada posteriormente em laboratório para a forma de sebo. A banha de porco foi adquirida no comércio local, uma vez que se encontrava em boas condições de conservação. Estas gorduras foram armazenadas sob refrigeração, a 4°C de modo a conservar suas características naturais.

Os ensaios foram realizados em sistema descontínuo, utilizando erlenmeyers de 50 ml. A agitação, o pH inicial e a temperatura são mantidos constantes.

Foram utilizados dois métodos diferentes para determinar o percentual de hidrólise. No primeiro método, quantifica-se os ácidos graxos formados, e no segundo, quantifica-se o glicerol formado.

3.1 Preparo dos reagentes

3.1.1 Preparo das soluções

Todas as soluções de reagentes, utilizadas nos experimentos e métodos analíticos foram preparadas e normalizadas segundo procedimento descrito por Morita e Assumpção (1972) [14].

3.1.2 Preparo dos triglicerídeos

O sebo de boi e a banha de frango, foram preparados em laboratório da seguinte forma:

A gordura foi derretida em um becher (aquecido sobre tela de amianto e bico de Bunsen) e ainda quente foi filtrada em papel de filtro comum para um outro becher. Após resfriamento foi estocada sob refrigeração, a 4 °C, para evitar reações adversas (como desnaturação e ranço) e contaminações indesejáveis.

A banha de porco, foi adquirida do comércio já em condições de uso e estocada nas condições descritas acima.

3.1.3 Preparo da solução de lipase

A solução de lipase foi preparada, diluindo-se cerca de dez vezes a solução concentrada (adquirida comercialmente), em água destilada.

Após a medida da atividade, a solução foi armazenada sob refrigeração a 4 °C para conservar suas propriedades pelo maior período de tempo possível, geralmente em torno de 4 dias.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Índice de saponificação

O índice de saponificação é definido como sendo o n° de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos resultantes da hidrólise de um grama da amostra, e é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos dos glicerídeos presentes. O procedimento para a obtenção deste índice foi realizado conforme descrito em: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz [16].

3.2.2 Acidez

A acidez é definida como sendo o nº de mg de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos livres de uma grama da amostra. O procedimento para a obtenção da acidez foi realizado conforme segue:

Em cada ensaio, foram utilizados dois erlenmeyers, um teste e um branco. Uma vez decorrido o tempo estipulado para o ensaio, o conteúdo do teste, sempre constituído de solução tampão (20 ml), solução de lipase (1 ml) e substrato, era transferido do erlenmeyer de 50 ml para um becher de 100 ml. Foram realizados então dois enxágües, com 10 ml de etanol cada um, para remover assim todo resíduo de amostra contida no erlenmeyer para o becher.

O branco segue a mesma rotina de preparo do teste excetuando-se o fato de que não lhe é acrescida a solução de lipase, evitando assim a ocorrência de hidrólise durante o experimento. A solução de lipase, causa uma pequena variação no pH, de modo que é acrescentada ao branco somente por ocasião da titulação. Há dois motivos básicos para se utilizar um branco a cada ensaio:

- (i) A solução tampão consome parte do titulante que deve portanto ser quantificada e subtraída do valor encontrado no teste;
- (ii) O branco apresenta, após titulado, um coloração rósea que serve como referencial colorimétrico para titular o teste.

Para se obter bons resultados, as titulações devem ser efetuadas num período mínimo de tempo, nunca superior a 10 minutos, pois a coloração rósea vai diminuindo sua intensidade com o passar do tempo.

A acidez é calculada pela seguinte equação:

$$AV = (V_t - V_b) \cdot N \cdot 56,11 / P \quad (11)$$

onde:

- V_t n° de ml da solução de hidróxido de potássio com concentração normal
N, gastos na titulação do teste;
- V_b n° de ml da solução de hidróxido de potássio com concentração normal,
N gastos na titulação do branco;
- N concentração normal da solução alcóolica de KOH (deve sempre estar
próxima à 0,1 N);
- P n° de gramas do substrato.

O valor 56,11 é o peso molecular do KOH.

O etanol utilizado, tem como objetivo solubilizar os ácidos graxos presentes e provocar a inibição total da enzima.

A amostra assim preparada está pronta para ser titulada, com uma bureta de precisão ($\pm 0,02$ ml) contendo solução alcóolica de KOH 0,1 N. A solução alcóolica de KOH foi escolhida como titulante porque os ácidos graxos além de serem solúveis no álcool reagem com o KOH formando sabões solúveis, de modo que a amostra, uma vez titulada, apresenta-se translúcida e não turva, facilitando assim a observação do surgimento da coloração rósea durante a titulação.

Uma solução alcóolica de fenolftaleína é usada como indicador por se mostrar muito eficiente quando se trata de reações de ácido fraco com bases fortes, segundo: Morita e Assumpção [14].

3.2.3 Percentual de hidrólise, $H(\%)$ e taxa de hidrólise, h

O percentual de hidrólise é definido neste trabalho como sendo a percentagem de substrato (triglicerídeos) que foi hidrolisado durante o tempo do ensaio. Este percentual é calculado pela equação abaixo:

$$H(\%) = AV / IS \cdot 100 \quad (12)$$

onde:

AV Acidez;

IS Índice de Saponificação.

É interessante notar aqui que a acidez e o índice de saponificação devem possuir a mesma unidade, ou seja: miligrama de KOH por grama de substrato.

O grau de hidrólise é definido como sendo a razão entre a acidez e o índice de saponificação, ou seja:

$$h = AV / IS \quad (13)$$

É bom lembrar, que a equação (08) define h da seguinte forma:

$$h = (S_0 - S) / S_0 \quad (08)$$

3.2.4 Atividade enzimática

Neste trabalho, definiu-se uma unidade de atividade, U, como sendo a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de triglicerídeos por minuto nas condições de ensaio. Estas condições estão resumidas para cada substrato, na Tabela 01.

Tabela 01 - Condições dos ensaios de atividade enzimática

| <i>Substrato</i> | <i>pH</i> | <i>Temperatura</i> (°C) | <i>S₀</i> (mg/l) | <i>Agitação</i> (r.p.m.) |
|------------------|-----------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Sebo de boi | 7,2 | 50 | 5000 | 200 |
| Banha de porco | 7,2 | 50 | 5000 | 200 |
| Banha de frango | 7,2 | 40 | 5000 | 200 |

Após incubação por um período de 15 minutos, nas condições citadas na Tabela acima, mede-se a acidez conforme item 3.2.2, e calcula-se a taxa de hidrólise item 3.2.3. A partir deste valor determina-se a atividade pela equação apresentada abaixo:

$$\text{Atividade} = h \cdot s_0 / \text{PM} \cdot t_i \quad (14)$$

onde:

- h** taxa de hidrólise;
- s₀** massa de substrato, em gramas;
- PM** Peso molecular médio do substrato;
- t_i** tempo de ensaio em minutos

Para se obter a atividade específica, a quantidade de proteína (mg) contida na solução de lipase foi determinada, utilizando-se um “kit”, baseado no método de bioreto (Proteínas Totais - Labtest Sistemas Diagnósticos Ltda).

3.2.5 *Análise do glicerol*

Utilizando-se um teste enzimático colorimétrico para quantificar triglicerídeos no soro e que tem como princípio medir a concentração do glicerol total (Triglicerides GPO Trinder, Bio-Diagnóstica Indústria Química Clínica Ltda.) foi possível determinar a quantidade de triglicerídeos que foram hidrolisados totalmente, fazendo-se uma pequena alteração no procedimento deste teste, como segue:

A amostra foi submetida a uma filtração com papel filtro comum, de modo que este retinha tanto os triglicerídeos que não reagiram totalmente como os ácidos graxos formados pela reação enzimática. A parte filtrada continha a água, o glicerol e a enzima que embora presente não causava interferência na análise. Esta parte filtrada seguia então o procedimento técnico normal do teste enzimático colorimétrico, que fornecia a concentração de triglicerídeos (mg/l), que foi totalmente hidrolisada.

A razão entre a concentração obtida no teste, C e a concentração inicial, S_0 que é conhecida, nos fornece o percentual de triglicerídeos que foram totalmente hidrolisados, $H_t(\%)$.

$$H_t(\%) = C / S_0 \quad (15)$$

3.3 Ensaio para a determinação das condições adequadas de operação

O objetivo desta etapa do trabalho não é determinar as condições ótimas para a enzima em si, mas sim, as condições mais apropriadas para as quais este trabalho se destina, que é pré-tratar efluentes de abatedores por hidrólise enzimática. Para tanto, primeiro foi escolhida uma enzima, no caso lipase sp 398 gentilmente cedida pela empresa, Novo-Nordisk, adequada as condições em que os efluentes de abatedores normalmente se encontram logo que deixam o processo, ou seja, um pH próximo a 7,0, uma temperatura em torno de 40 °C e uma concentração de triglicérides na faixa de 500 mg/l. Devido a estas condições os experimentos são realizados sempre a um pH 7,2. A concentração de substrato utilizada (triglicérides), é dez vezes maior do que aquela encontrada geralmente nos efluentes, com o objetivo de aumentar assim, a precisão da medida da acidez, uma vez que o método analítico utilizado para determinar esta medida, não é sensível suficiente para detectar quantidades muito pequenas de ácidos graxos.

3.3.1 Agitação

O estudo da agitação foi realizado adicionando-se ao erlenmeyer teste, a seguinte composição: 20 ml de solução tampão de fosfato monobásico 0,1 M (a pH 7,2), 1,0 g de banha de porco, usada como substrato, e 1,0 ml de solução de lipase.

Utilizando-se um banho termostatizado com agitação “shaker” (da Ética - Equipamentos Científicos S.A., mod. 501.) foi possível realizar vários ensaios à diferentes velocidades de agitação, mantendo-se a temperatura sempre constante e igual a 45 °C. Os ensaios foram realizados a 0, 50, 100, 150 e 200 r.p.m.

Infelizmente não foi possível obter dados acima de 200 r.p.m devido a limitações impostas pelo equipamento de laboratório.

Ao final de uma hora o erlenmeyer era retirado do shaker. Calculava-se então o percentual de hidrólise, item 3.2.3, após determinar a acidez da amostra, conforme descrito anteriormente, item 3.2.2.

A Tabela 02 contém um resumo das condições dos ensaios de agitação.

Tabela 02 - Condições dos ensaios de agitação

| substrato | duração (min) | conc. substrato (mg/l) | vol. sol. lipase (ml) | atividade lipase (U/mg) | agitação (r.p.m) | temp. (°C) | pH |
|----------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------|-----|
| banha de porco | 60 | 50000 | 1,0 | 5,72 | 0 | 50 | 7,2 |
| | | | | | 50 | | |
| | | | | | 100 | | |
| | | | | | 150 | | |
| | | | | | 200 | | |

3.3.2 Temperatura

Foram realizados vários ensaios para determinar a temperatura ótima em que atua a lipase a um pH 7,2 para cada um dos três substratos estudados: sebo de boi, banha de frango e banha de porco, segundo a rotina apresentada a seguir:

Adicionou-se ao erlenmeyer teste, 20 ml de solução tampão (pH 7,2) 106 mg de substrato (que é correspondente a uma concentração de 5000 mg/l na solução reagente) e 1,0 ml de solução de lipase

O erlenmeyer foi então vedado com rolha de silicone, para evitar a evaporação dos reagentes, e acoplado a um “shaker”, com frequência de oscilação de 200 r.p.m. na temperatura do experimento, que variou entre 40 e 65°C.

A solução de lipase foi adicionada aos outros componentes somente quando estes atingiram a temperatura desejada. A partir de então deixou-se o erlenmeyer incubado por um período de 15 minutos

Após cada ensaio determinou-se a acidez da amostra, e calculou-se então o percentual de hidrólise, como visto anteriormente, nos itens 3.2.2 e 3.2.3.

A Tabela 03, resume as condições em que foram realizados os ensaios para determinar a temperatura ótima de cada substrato.

Tabela 03 - Condições dos ensaios na determinação da temperatura ótima

| substrato | duração (min) | S ₀ (mg/l) | vol. sol. lipase (ml) | atividade específica (U/mg) | agitação (r.p.m) | temp. (°C) | pH |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----|
| sebo de boi | 15 | 5000 | 1,0 | 2,33 | 200 | 45 50 55 60 | 7,2 |
| banha de frango | 15 | 5000 | 1,0 | 2,07 | 200 | 30 35 40 45 50 | 7,2 |
| banha de porco | 15 | 5000 | 1,0 | 2,77 | 200 | 40 45 50 55 60 | 7,2 |

3.4 Ensaios de hidrólise enzimática

Foram realizados vários ensaios para acompanhar o progresso da hidrólise enzimática com o tempo. As condições em que os experimentos foram realizados, estão na Tabela a seguir:

Tabela 04 - Condições para os ensaios de hidrólise enzimática

| Experim. | substrato | duração (h) | S ₀ (mg/l) | atividade (U/mg) | agitação (r.p.m) | temp. (°C) | pH |
|----------|-----------|------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----|
| I | B.porco | 3 | 5000 | 2,77 | 200 | 50 | 7,2 |
| II | S. boi | 3 | 5000 | 2,33 | 200 | 50 | 7,2 |
| III | B.frango | 3 | 5000 | 2,07 | 200 | 40 | 7,2 |
| IV | B. porco | 5 | 50000 | 5,72 | 200 | 50 | 7,2 |
| V | S. boi | 3 | 5000 | 2,33 | 200 | 50 | 7,2 |

O experimento V, como se pode ver na tabela acima, foi realizado nas mesmas condições do experimento II porém, afim de avaliar a formação de mono e diglicerídeos durante a reação enzimática, analisou-se a quantidade de glicerol formado, e não a quantidade de ácidos graxos, como nos demais experimentos, obtendo-se assim um percentual de hidrólise, H_t , referente somente aos triglicerídeos que foram totalmente hidrolisados.

A acidez, item 3.2.2, é medida em intervalos de tempo cada vez maiores, até chegar-se ao valor correspondente a um percentual de hidrólise igual a 100%. A partir destes dados foram construídas as curvas de percentual de hidrólise versus tempo.

3.5 Determinação das propriedades físicas e químicas dos substratos

3.5.1 Ponto de fusão

O conhecimento do ponto de fusão do substrato nos indica a temperatura mínima em que pode-se encontrar a temperatura ótima para a hidrólise enzimática, pois o triglicerídeo em estado líquido, pode, através de uma agitação vigorosa, ser reduzido a minúsculas gotículas, formando assim uma superfície de contato bastante elevada com a solução aquosa onde se encontra a lipase. Isto explica o fato da atividade enzimática aumentar drasticamente com a agitação. Já no estado sólido a superfície de contato é minimizada e o triglicerídeo tende a se fixar na parede do reator quando sob agitação, dificultando em muito a possibilidade de ocorrer reação enzimática.

O ponto de fusão foi obtido testando as amostras de triglicerídeos em um Aparelho de ponto de fusão (MQAPF - 301; Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda.).

3.5.2 Densidade

A densidade de cada amostra de triglicerídeos foi obtida por um procedimento muito simples, descrito abaixo:

Utilizando-se de uma proveta (com volume aferido) e uma balança de precisão pesou-se a massa de 100 ml de amostra e calculou-se então a densidade pela equação abaixo:

$$d = m / v$$

onde:

- d** densidade específica (g/ml);
- m** massa da amostra (g);
- v** volume da amostra (ml).

Este ensaio foi realizado com as amostras a uma temperatura de 50 °C.

3.5.3 *Peso molecular*

O peso molecular médio, **PM**, de cada amostra de triglicerídeos é obtido a partir do índice de saponificação, item 3.2.1 segundo a equação abaixo:

$$PM = PM_{KOH} \cdot 3 / (IS / 1000)$$

ou seja:

$$PM = 168330 / IS$$

onde:

- PM** Peso molecular médio do triglicerídeo;
PM_{KOH} Peso molecular do KOH;
IS Índice de saponificação de Koettstorfer.

3.6 **Resultados obtidos na determinação das propriedades físicas e químicas dos substratos**

A Tabela 05, mostra algumas das propriedades químicas e físicas determinadas para os triglicerídeos estudados neste trabalho.

Tabela 05 - Propriedades físicas e químicas dos substratos

| <i>Propriedades</i> | <i>Substratos</i> | | |
|---------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| | <i>Sebo de boi</i> | <i>Banha de porco</i> | <i>Banha de frango</i> |
| PM | 895 | 886 | 895 |
| P.F.(° C) | 38 | 26 | 28 |
| d (g/ml) | 0,892 | 0,896 | 0,891 |

O valor do peso molecular médio, do sebo de boi e da banha de porco, encontrados na literatura (Morrison e Boyd) [15], é em torno de 860 e 864, respectivamente, o que demonstra coerência com os valores encontrados neste trabalho.

O peso molecular da banha de frango não pôde ser comparada com dados da literatura, por não se ter encontrado nenhum valor publicado acerca deste triglicerídeo. No entanto pode se afirmar que ele tem uma constituição semelhante à dos outros dois substratos uma vez que o peso molecular é igual ao do sebo de boi.

Como foi visto no item 2.2.1, o ponto de fusão dos triglicerídeos diminui com as insaturações e o comprimento das cadeias carbônicas, visto que o PM é função principalmente do comprimento das cadeias e que este valor é bastante próximo para os três substratos, supõe-se que a banha de frango possua mais insaturações que o sebo de boi, e que a banha de porco, possua mais insaturações que os outros dois substratos.

Alguns dos ácidos formados, possuem um ponto de fusão maior que a temperatura no reator (50 °C), como o mirístico (54 °C), o palmítico (63 °C), e o esteárico (70 °C), o que significa que estes ácidos solidificam-se assim que são formados. Este fato pode acelerar a reação enzimática, pois dificulta a reação reversível.

Vale ainda salientar que estes ácidos saturados, constituem 53,5% dos ácidos formados na hidrólise do sebo de boi e 42,5% dos ácidos formados na hidrólise da banha de porco.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados dos métodos analíticos

4.1.1 Índice de saponificação de Koettstorfer

O índice de saponificação obtido para cada substrato é mostrado na Tabela 06.

Tabela 06 - Índices de saponificação

| <i>Substrato</i> | <i>Índice de saponificação</i> |
|------------------|--------------------------------|
| Sebo de boi | 188 |
| Banha de frango | 188 |
| Banha de porco | 190 |

O índice de saponificação do sebo de boi, encontrado no experimento, é bem próximo àquele citado na literatura, (Kosugi et al, 1988) [12], que é igual à 196.

O índice de saponificação é fundamental no cálculo do percentual de hidrólise e também, no cálculo do peso molecular médio de cada substrato.

4.1.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática obtida em condições experimentais semelhantes, para cada substrato, conforme item 3.2.4, é mostrada na Tabela 07.

Tabela 07 - Atividade enzimática

| <i>Substrato</i> | <i>Atividade específica (U/mg)</i> |
|------------------|------------------------------------|
| Sebo de boi | 2,33 |
| Banha de frango | 2,07 |
| Banha de porco | 2,77 |

Para que os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise enzimática possam ser relacionados ou comparados entre si, é necessário que a atividade da solução de lipase usada seja sempre a mesma.

Na maioria dos trabalhos publicados ainda hoje, (Kosugi et al [12]; Iizumi et al [10]), a atividade de lipases é medida utilizando-se óleo de oliva como substrato, sob condições experimentais padrões, em geral diferentes das condições dos ensaios.

Por ser mais conveniente, neste trabalho, a atividade foi medida nas mesmas condições dos experimentos (temperatura, pH, etc), obtendo-se assim uma atividade característica para cada substrato.

4.2 Ensaios para determinação das condições adequadas

4.2.1 Agitação

A influência da agitação na atividade enzimática, é bastante elevada, como pode ser observado na Figura 11 :

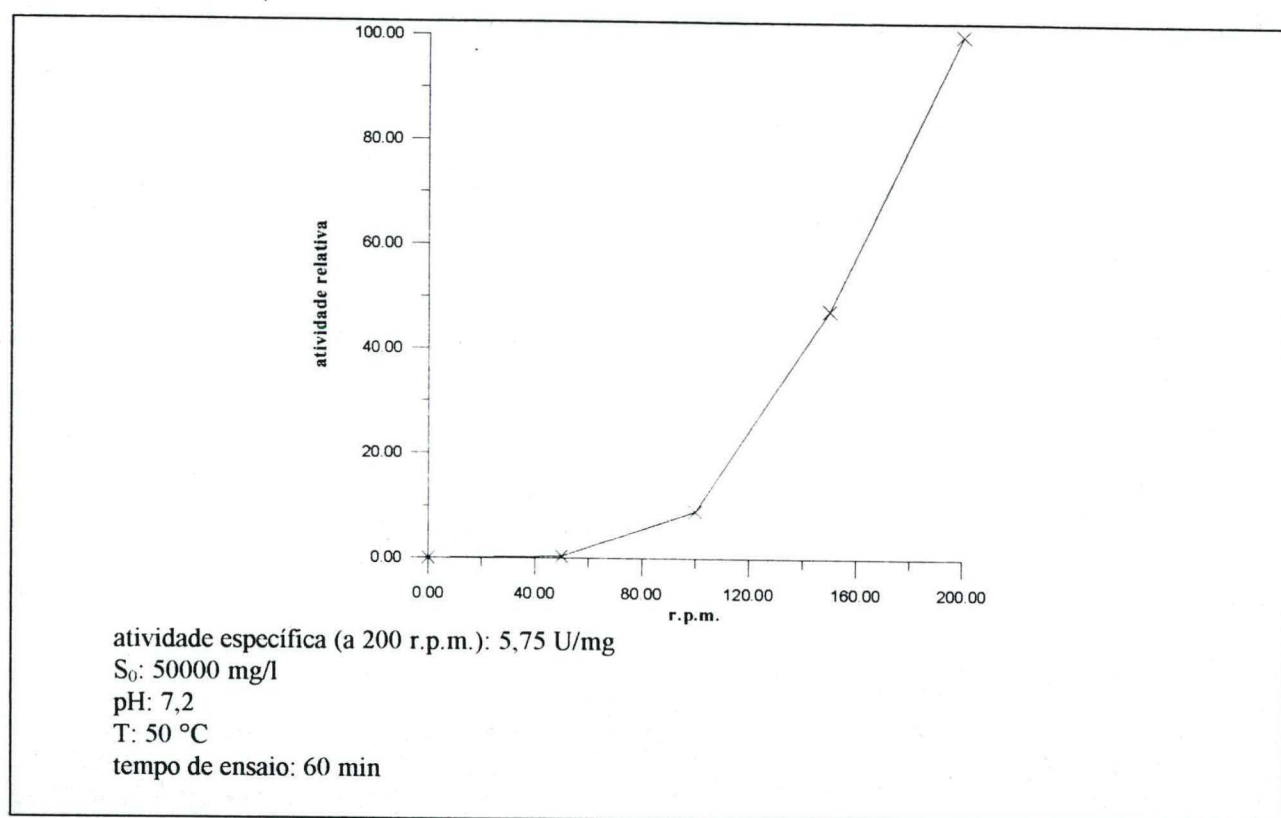


Figura 11 - Influência da agitação na atividade enzimática

É interessante observar que quando não há agitação (0 r.p.m.), também não ocorre hidrólise. Mesmo realizando este experimento em um intervalo de tempo maior, como 5 horas e utilizando uma concentração de substrato de 50000 mg/l, não se detectou a ocorrência de reação, para a agitação nula.

A partir de 100 r.p.m, notou-se claramente que a curva tende a uma parábola, onde a velocidade de consumo do substrato cresce geometricamente com a agitação.

O comportamento apresentado pela curva era esperado, pois, como o triglicerídeo (substrato), é uma substância hidrófoba, suas gotículas, em contato com a água tendem a coalescer (a aglutinar-se uma às outras); disto resulta a formação de duas fases distintas, uma aquosa e outra oleosa. Nesta situação a superfície de contato entre as duas fases é muito pequena e é justamente nesta interface óleo-água que a enzima atua.

Com o aumento da agitação a gordura tende a desaglutinar-se formando minúsculas gotículas, aumentando assim a superfície de contato com a fase aquosa onde encontra-se a enzima. Este fato somado ao aumento da intensidade dos choques entre as moléculas, proporcionado também pela agitação, é o que causa o aumento da atividade enzimática com este parâmetro.

4.2.2 *Temperatura ótima*

As temperaturas ótimas para a lipase nas condições do experimento de cada substrato são mostrada na Tabela 08.

Tabela 08 - Temperatura ótima

| <i>Substrato</i> | <i>Temperatura (°C)</i> |
|------------------|-------------------------|
| Sebo de boi | 50 |
| Banha de porco | 50 |
| Banha de frango | 40 |

Estas temperaturas foram determinadas diretamente das curvas obtidas a partir dos experimentos do item 3.3.2, mostradas nas Figuras 12,13,e 14.

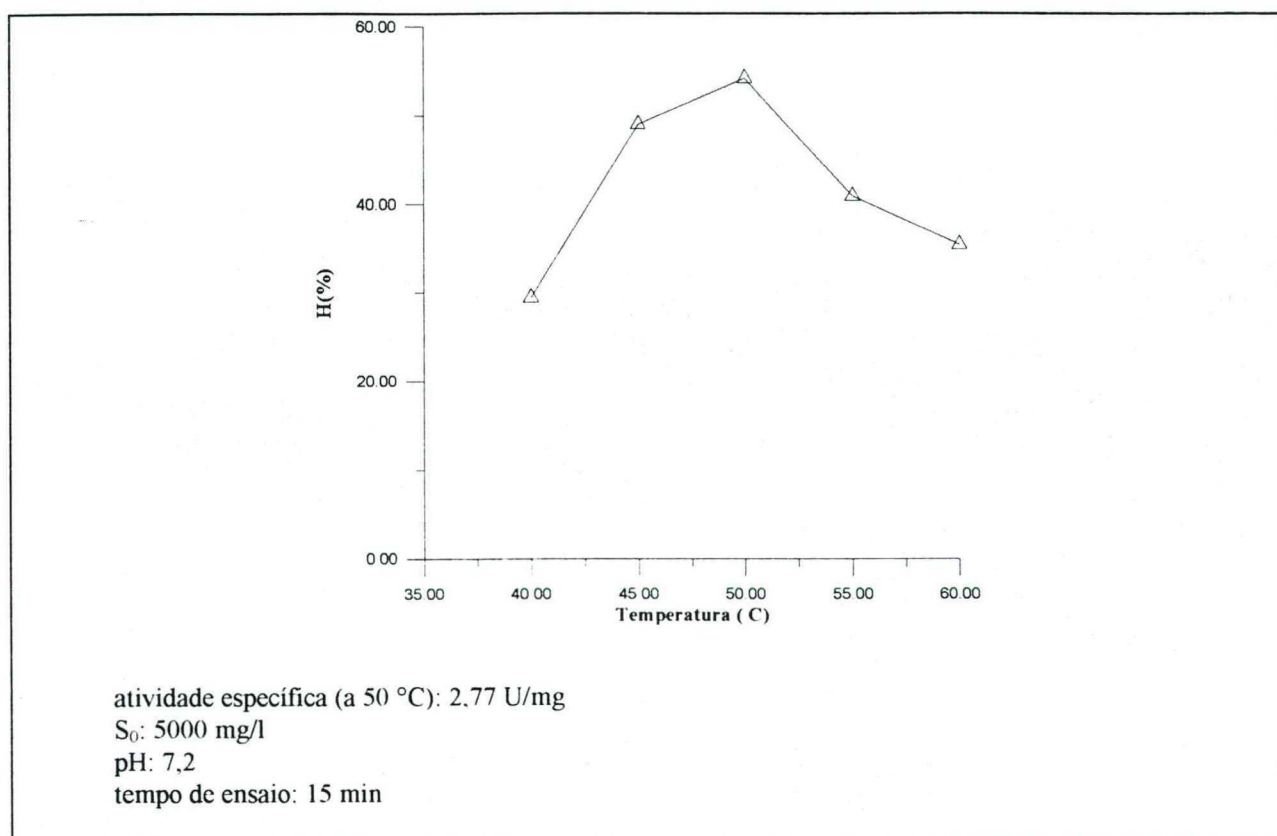


Figura 12 - Temperatura ótima para a banha de porco

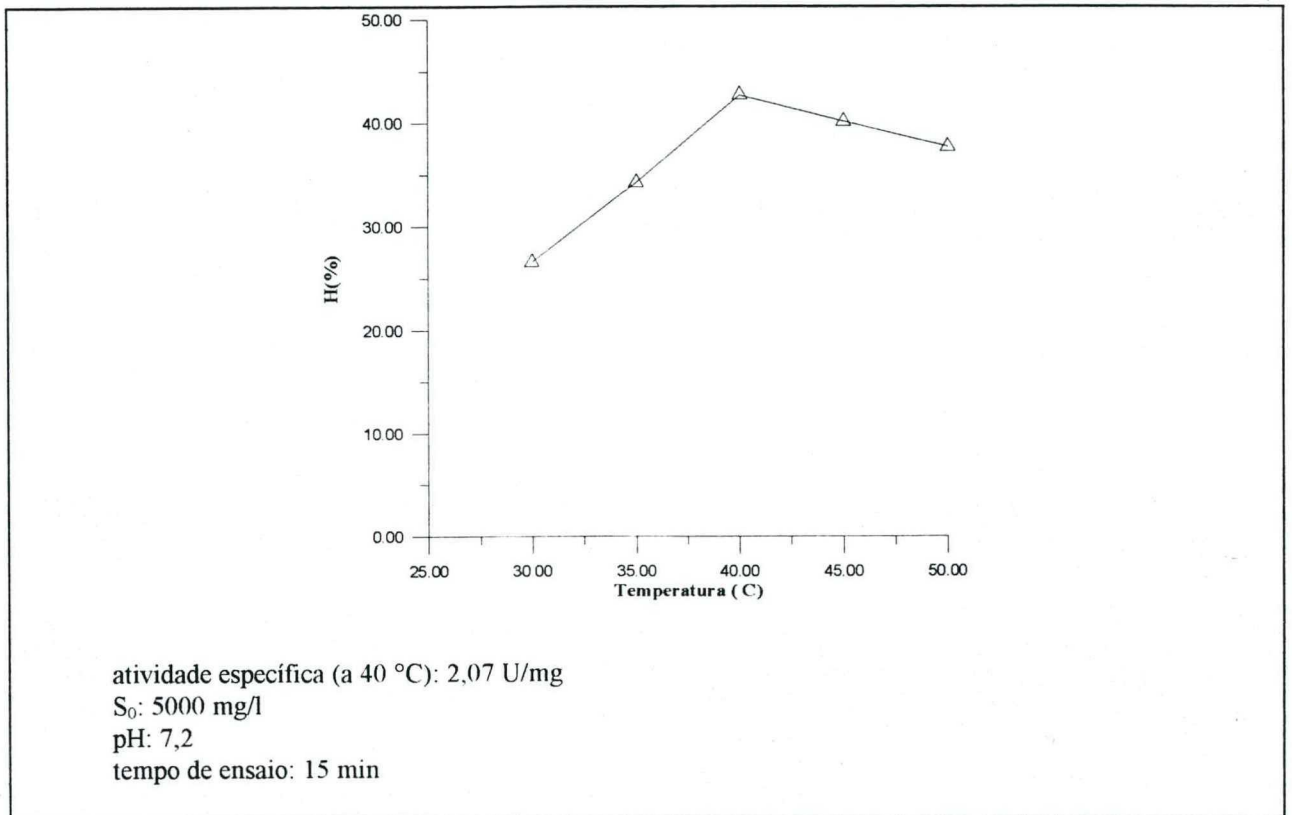


Figura 13 - Temperatura ótima para a banha de frango

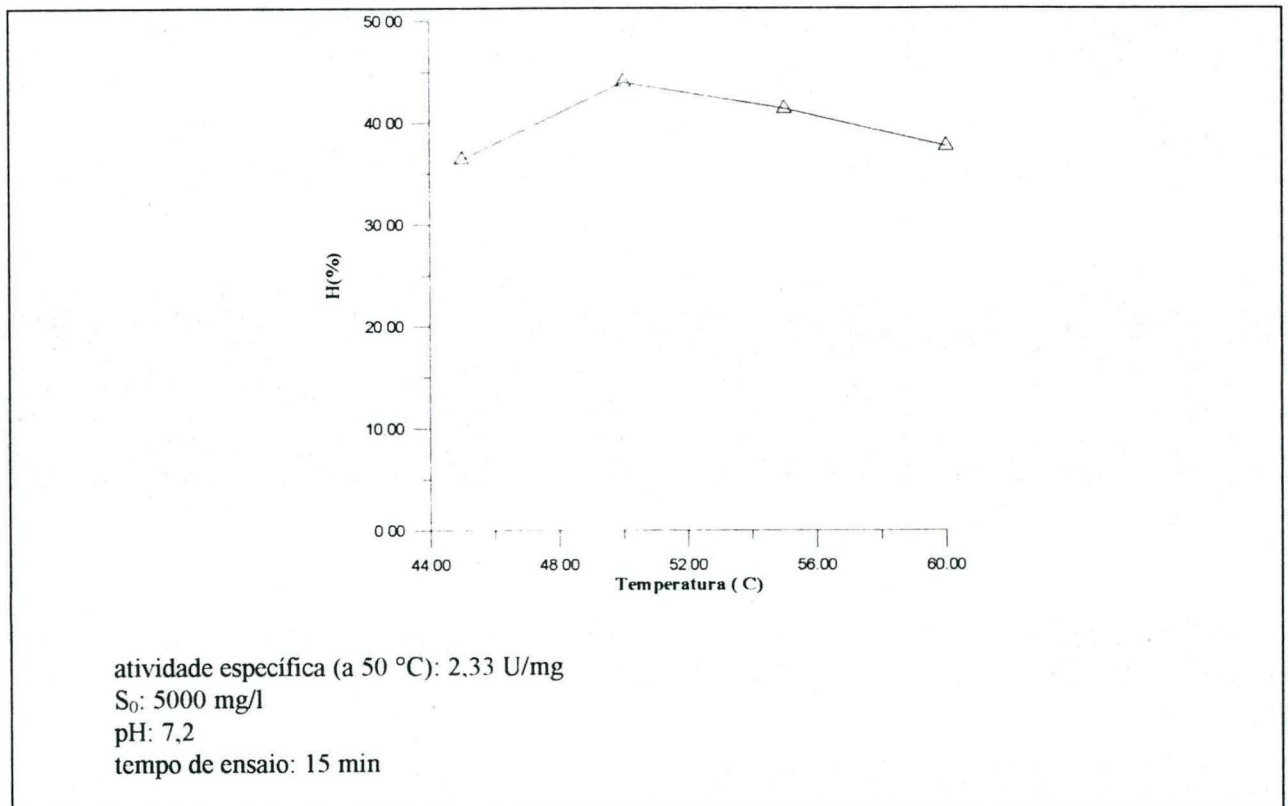


Figura 14 - Temperatura ótima para o sebo de boi

É interessante notar que o sebo de boi e a banha de porco tiveram a mesma temperatura ótima, 50 °C, o que pode ser explicado talvez pelo fato de possuírem uma proporção semelhante de triglicerídeos com cadeias de 18 e 16 carbonos (que representam mais de 90 % de sua constituição), sendo que há um número ligeiramente maior de cadeias insaturadas com 18 carbonos na banha de porco.

A banha de frango, apresenta uma temperatura ótima inferior aos outros dois substratos, provavelmente por apresentar uma proporção diferente de triglicerídeos na sua constituição. A veracidade desta hipótese não pôde ser averiguada, por não se encontrar, na literatura disponível, as proporções de triglicerídeos deste substrato.

4.3 Ensaio de hidrólise enzimática

Os resultados obtidos a partir dos vários experimentos realizados para verificar o percentual de substrato que é hidrolisado no tempo, são descritos a seguir:

No *EXPERIMENTO I*, em que é utilizado banha de porco como substrato, observou-se, conforme resultados apresentados na Figura 15, que a velocidade da reação enzimática é praticamente constante nos 20 minutos iniciais, neste ponto é bom notar que 63 % do substrato já foi hidrolisado.

A curva apresenta uma trajetória hiperbólica, demonstrando assim, um comportamento michaeliano.

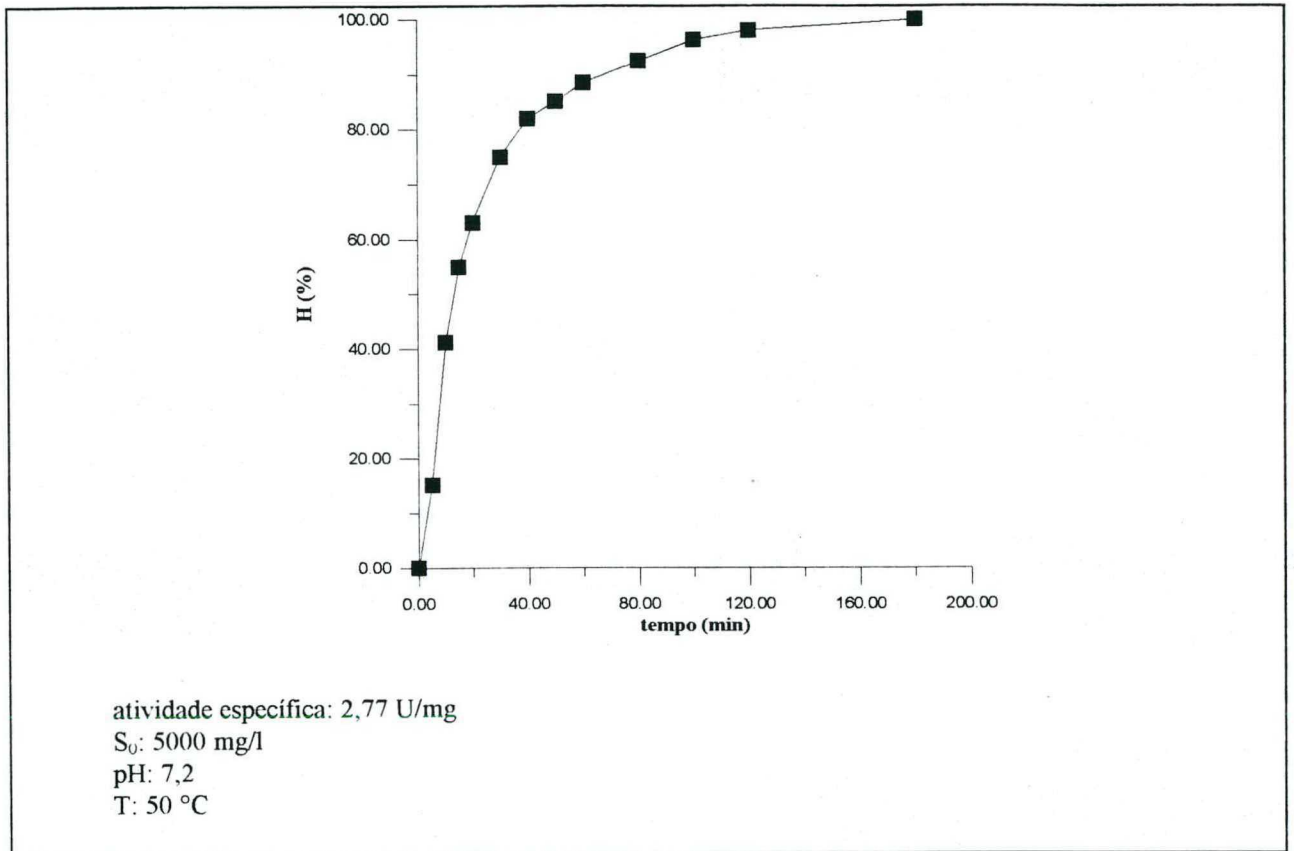


Figura 15 - Hidrólise da banha de porco

Esta curva pode ser simulada pela equação (07) demonstrada no item 2.4.4 e que relembramos aqui:

$$h = (t \cdot H) / (t + t_m) \quad (07)$$

A taxa H , e o tempo t_m , são constantes que podem ser determinadas com muita facilidade, utilizando-se, para tanto, um programa de computador que faça o ajuste da curva experimental calculando o erro dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

Para este experimento, encontrou-se um H igual a: $1,17 (\pm 0,06)$ e um t_m igual a: $18,63 (\pm 2,6)$, definindo assim, a cinética enzimática da hidrólise de banha de porco.

A Figura 16, mostra o resultado obtido na hidrólise do sebo de boi, *EXPERIMENTO II*. O comportamento da curva é o mesmo observado no parágrafo anterior, valendo-lhe portanto os mesmos comentários.

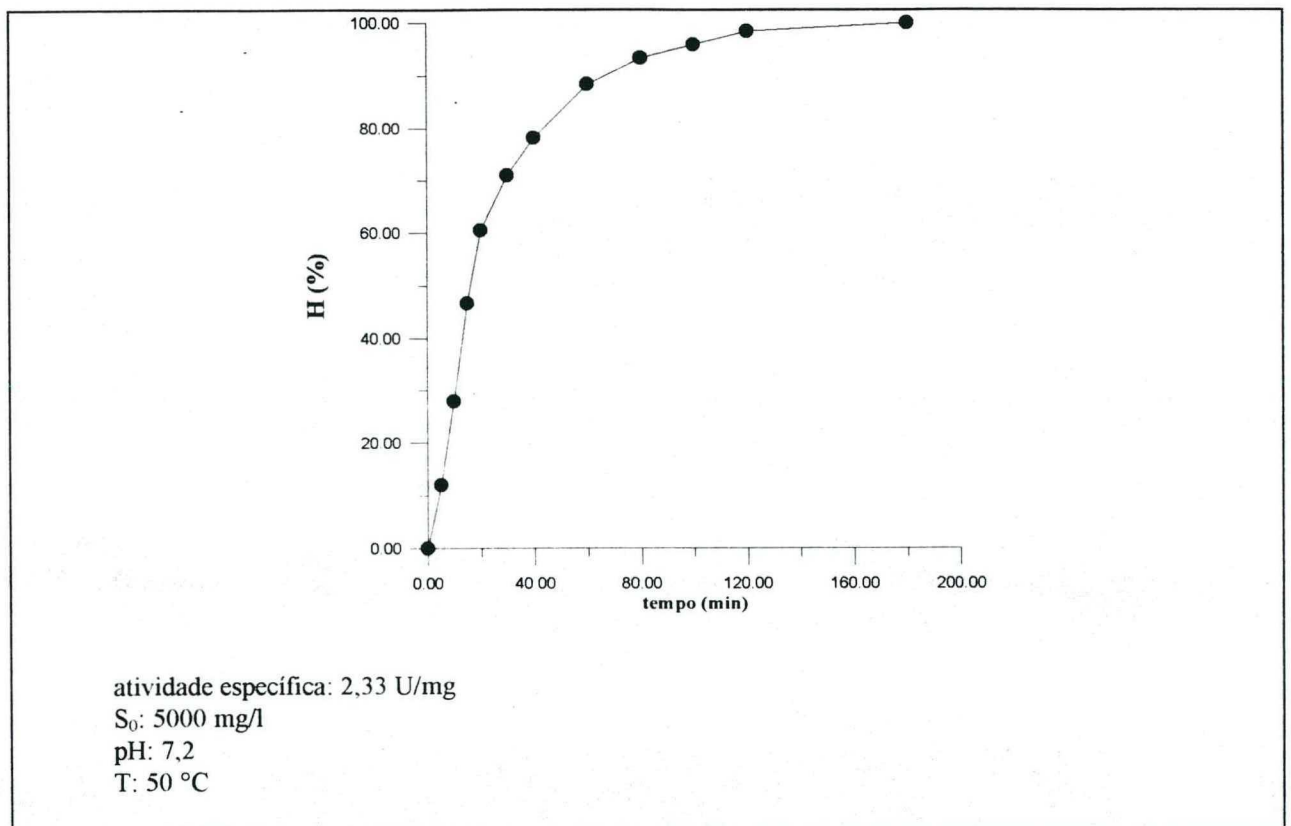


Figura 16 - Hidrólise do sebo de boi

As constantes cinéticas, H e t_m , foram neste caso, iguais a: $1,30 (\pm 0,1)$ e $28,42 (\pm 5,0)$ respectivamente.

As constantes cinéticas, H e t_m encontradas por Kosugi et al (1988) [12], utilizando uma lipase obtida a partir de uma espécie de *Pseudomonas fluorescens*, em experimentos realizados à 50 °C, foram respectivamente, 1,015 e 612.

Para a hidrólise da banha de frango, *EXPERIMENTO III* foi obtido uma curva semelhante às anteriores, como pode ser visto na Figura 17.

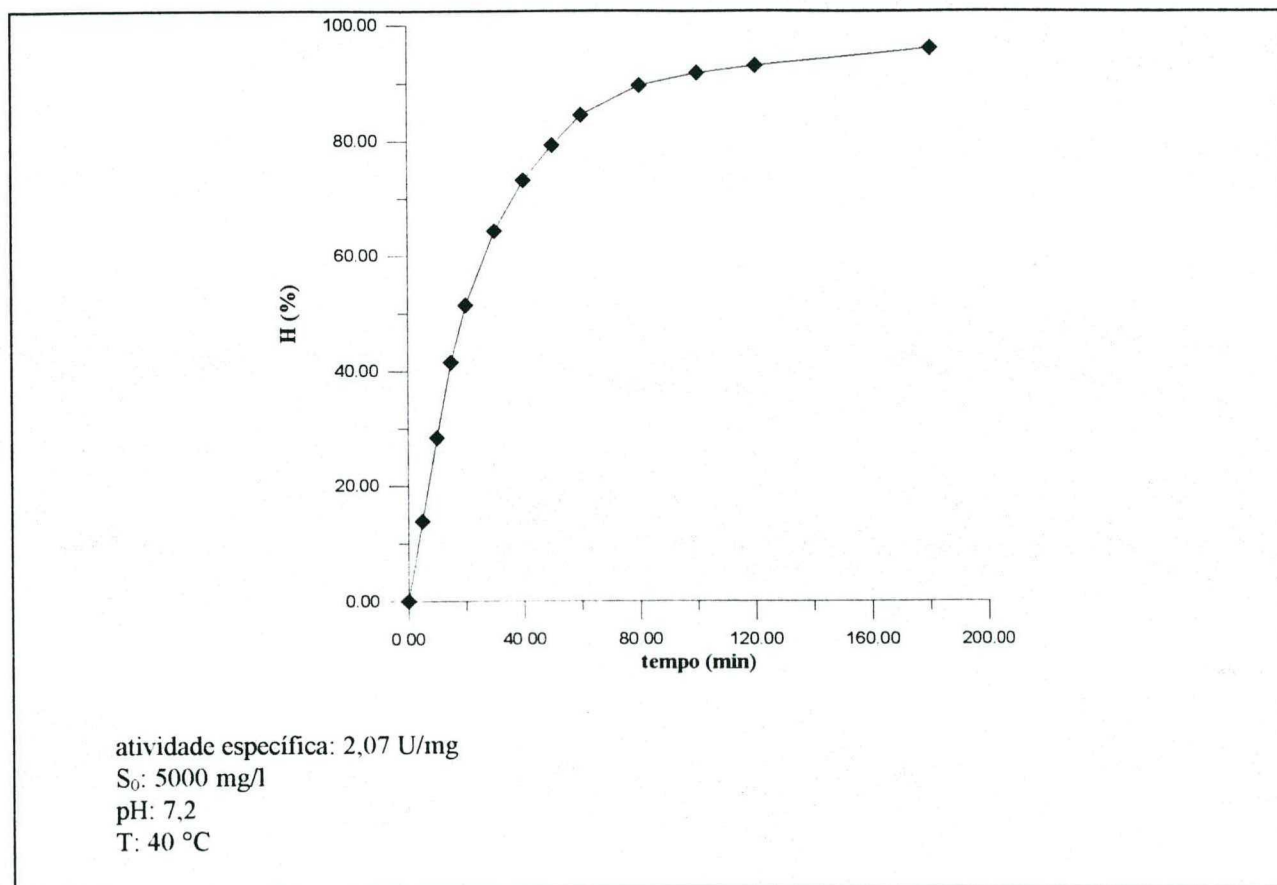


Figura 17 - Hidrólise da banha de frango

As constantes cinéticas, H e t_m encontradas, foram iguais a: 1,36 ($\pm 0,06$) e 35,21 ($\pm 2,9$) respectivamente.

Os resultados do *EXPERIMENTO IV*, realizado com banha de porco, mostrados na figura 18, nos revela claramente, quando comparado com o *EXPERIMENTO I*, a influência da concentração de substrato, na cinética da reação, uma vez que as condições do reator são as mesmas em ambos os experimentos.

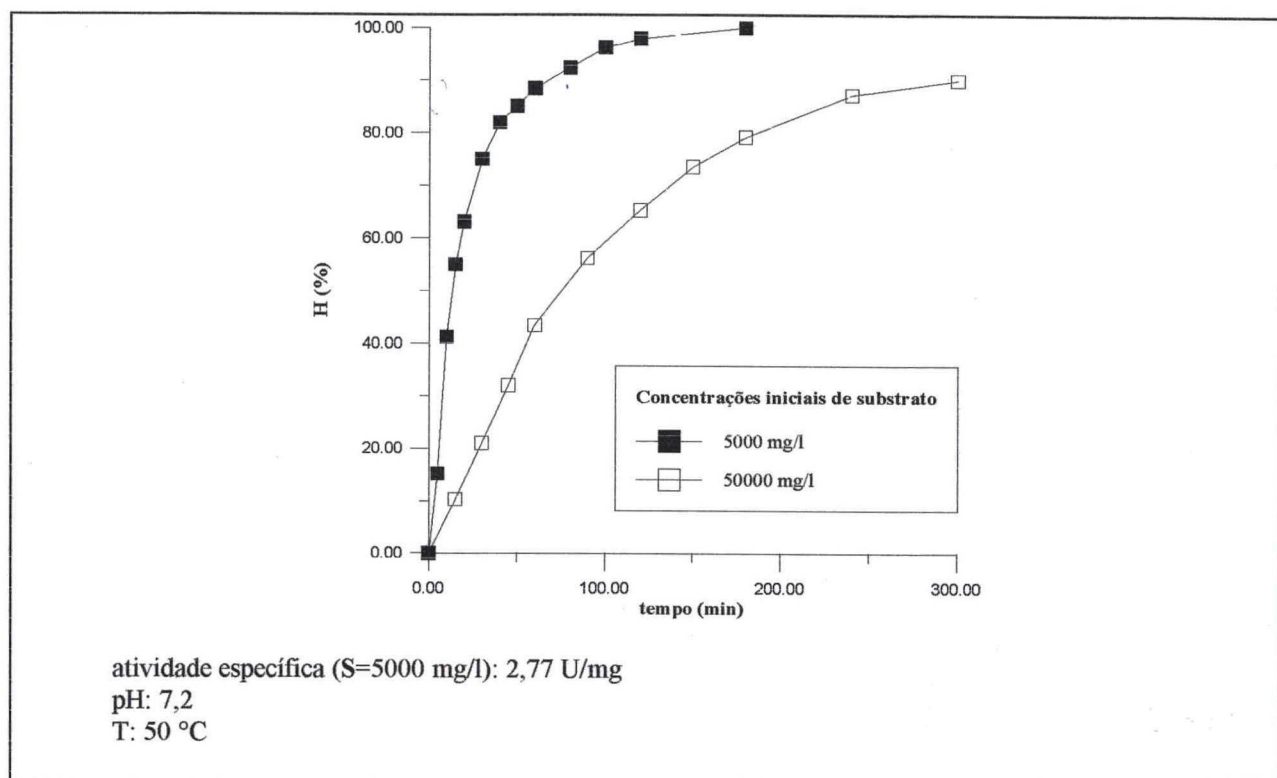


Figura 18 - Influência da concentração de substrato na cinética enzimática

O resultado obtido neste experimento é muito importante, pois nos mostra que para uma concentração dez vezes maior, o tempo requerido para hidrolisar 90% do substrato é 4 vezes maior.

As constantes cinéticas H e t_m , neste caso passam a valer $1,3 (\pm 0,07)$ e $125 (\pm 5,3)$ respectivamente, o que demonstra que a taxa de hidrólise diminui bastante com a concentração inicial de substrato.

Como os efluentes de abatedores possuem uma concentração de triglicerídeos dez vezes menor àquela do *EXPERIMENTO I*, o tempo necessário para hidrolisá-los será com certeza bem menor.

Os resultados do *EXPERIMENTO V*, realizado com sebo de boi, são mostrados na figura 19, juntamente com os resultados do *EXPERIMENTO II*.

Nota-se que as curvas se encontram-se quando $H(\%) = 100\%$, mas há uma diferença de percentual de hidrólise durante a evolução das curvas. Pode-se explicar este fato, pela diferente natureza das análises, pois no *EXPERIMENTO I* o percentual de hidrólise é medido pela quantia de ácidos graxos que se formam, e no *EXPERIMENTO V* este percentual é medido pelo glicerol formado, este último nos dá um valor correspondente somente aos triglicerídeos que são totalmente hidrolisados, liberando portanto o glicerol. Logo a diferença entre ambas as curvas, mostra que monoglicerídeos e diglicerídeos provavelmente são formados durante a reação enzimática.

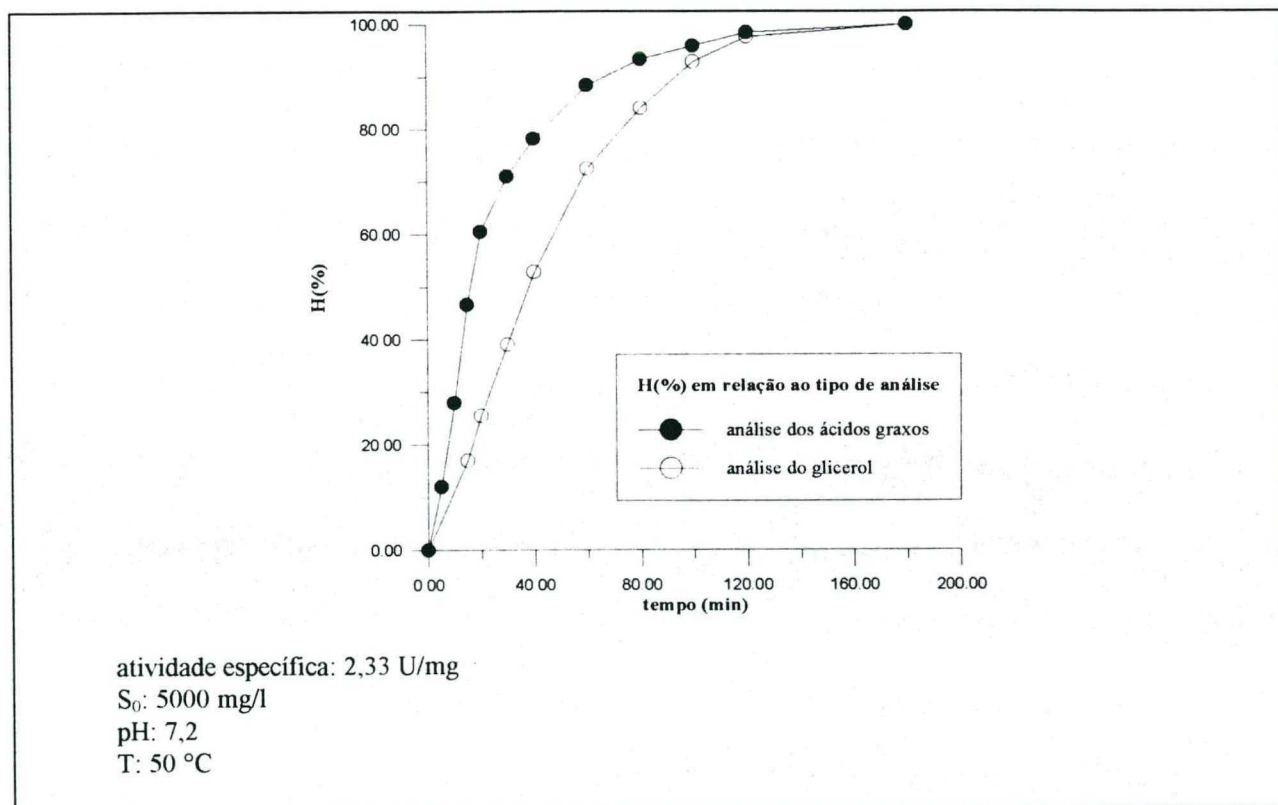


Figura 19 - Formação de mono e diglicerídeos durante a reação enzimática

A Tabela 09, apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios de hidrólise enzimática para cada um dos substratos estudados.

Tabela 09 - Resumo dos resultados obtidos na hidrólise enzimática

| <i>Substratos</i> | Sebo de boi | Banha de porco | Banha de frango |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| Atividade (U/mg) | 2,33 | 2,77 | 2,07 |
| Temp. (° C) | 50 | 50 | 40 |
| pH | 7,2 | 7,2 | 7,2 |
| S₀ (mg/l) | 5000 | 5000 | 5000 |
| H | 1,30 | 1,17 | 1,36 |
| t_m (min) | 28,42 | 18,63 | 35,21 |

5.0 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A lipase, sp 398, mostrou-se muito eficiente na hidrólise dos três substratos estudados neste trabalho. Atingiu-se percentuais de hidrólise acima de 90% para um tempo de reação compatível com os processos industriais (80 minutos).

Nos efluentes industriais, as gorduras encontram-se misturadas à vários outros resíduos orgânicos e inorgânicos que fazem parte dos dejetos industriais. Sugere-se portanto, que a influência destes produtos contaminantes seja devidamente avaliada.

As constantes cinéticas dos três substratos estudados, apresentadas na Tabela 09, são muito semelhantes entre-si e podem servir de base para o cálculo inicial de reatores enzimáticos do tipo batelada.

Uma vez que a maioria dos processos industriais são contínuos, sugere-se o estudo da hidrólise enzimática em reator tubular, de modo a obter os parâmetros cinéticos para sistemas em regime contínuo.

O custo de produção da lipase, é muito elevado devido aos diversos processos de purificação à que é submetida, o que, economicamente, torna inviável o seu uso no tratamento de efluentes de abatedores.

Para viabilizar portanto, este processo, sugere-se o estudo da hidrólise enzimática, utilizando-se o caldo enzimático ainda não concentrado.

ABSTRACT

In the treatment unit of slaughterhouse effluents, the first stage that the microorganisms accomplish to degrade the residual fats, is the production of enzymes which are able to hydrolyze the triglycerides, leading to fatty acids, glycerol and water. As this stage of the process is very slow and there is hardly the presence of specific microorganisms to produce lipase, the conventional systems of treatment usually do not reach good results concerning fat degradation.

In this work we study the enzymatic hydrolysis of triglycerides, using a commercial enzyme: lipase sp 398, gracefully granted by Novo Nordisk business, and three distinct substrates: beef tallow, pork lard and chicken lard.

Several assays were done to get kinetics parameters and to evaluate the optimum operating conditions, such as temperature and agitation, to a pH value and substrate concentration pre-established, that were chosen according to the conditions in which the effluents of slaughterhouses are. The hydrolysis percent, reached its maximum value (100%), in 3 hours.

According to the obtained results we noticed that this process presents a great potential of application in the treatment of oily effluents, making the conventional systems more efficient with the reduction of residence time and the removal of the oily layer in the stabilization lagoon.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Borzani, W. et al. **Biotecnologia**; engenharia bioquímica. São Paulo: Edgar Bücher Ltda, 1975. 5v.
- [2] Brockman, H. L. General features of lipolysis; reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: **Lipases**. Amsterdam: B. Borgström & H. L. Brockman. p. 3 - 46.
- [3] Cornish-Bowden, A. **Fundamentals of enzyme kinetics**. London: Butterworth & Co Ltd, 1979. 229p.
- [4] Craveiro, A. M., Schmidell, W., Villen, R. A., Hirata, Y. S. Anaerobic treatment of stillage at low retention time: energy and treatment efficiencies. In: **International Alcohol Fuel Technology Symposium**, 5, New Zealand, v.3 1982, p. 149 - 154.
- [5] Dring, R., Fox, P. F. Purification and Characterization of Heat-Stable Lipase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 29. **J. Fd. Sci. Technol.**, v. 7, p. 157 - 171, 1983.
- [6] Dünhaupt, A., Lang, S., Wagner, F. *Pseudomonas cepacia* Lipase: Studies on Aggregation, Purification and on the Cleavage of Olive Oil. **Biotech. Letters**, v. 14, n° 10, p. 953 - 958, oct. 1992.
- [7] Gilbert, E. J., Drozd, J. W., Jones, C. W. Physiological Regulation and Optimization of Lipase Activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **J. Gen. Microb.**, v. 137, p. 2215 - 2221, 1991.

- [8] Hirata, Y. S., Craveiro, A. M., Soares, H. M. et al. Aplicação de reatores de fluxo ascendente com leito de lodo (UASB) no tratamento de efluentes líquidos. In: **Simpósio Nacional de Fontes Novas e Renováveis de Energia**, 1, 1986. Anais. ME, Secretaria de Tecnologia - Brasília: MME, SETEC, 1988, p. 28 - 36.
- [9] Hubert, R. Enzimologia e biocatálise. In: Scriban, R. (coordenador). **Biotecnologia** 1ª ed. São Paulo: Manole, 1985.p. 179-207.
- [10] Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from Newly Isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Agric. Biol. Chem.**, v. 5, n° 54, p. 1253 - 1258, 1990.
- [11] Kosugi, Y., Tanaka, H. Tomizuka, N. Continuous hidrolisis of oil by immobilized lipase in a countercurrent reactor. **Biotech. Bioeng.**, v. 36, p. 617 - 622, 1990.
- [12] Kosugi, Y., Suzuki, H., Funada, T. Hydrolysis of Beef Tallow by Lipase from *Pseudomonas* sp. **Biotech. Bioeng.**, v. 31, p.349 - 356, mar. 1988.
- [13] Kosugi, Y., Suzuki, H. New Parameters for Simulating Progress Curves of the Lipase Reaction. **J. Ferment. Technol.**, v. 61, n° 3, p. 287 - 294, 1983.
- [14] Morita, T., Assumpção, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**; padronização - preparação - purificação. 2ª. ed. São Paulo: Edgar Bücher Ltda, 1972. 627p.
- [15] Morrison, R., Boyd, R. **Química Orgânica**, 11ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian,1994.1639p. Tradução de: Organic Chemistry.
- [16] **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1988, 533p.

- [17] Stryer, L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman & Company, 1995. 875p.
- [18] Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T., Shimizu, S. Mass Production of Lipase by Fed-Batch Culture of *Pseudomonas fluorescens*. **Appl. Microb. Biotech.**, v. 27, p. 417 - 422, 1988.]
- [19] Sztajer, H., Borkowski, J., Sobiech, K. Purification and Some Properties of *Pseudomonas fluorescens* Lipase. **Biotech. Appl. Biochem.**, v. 13, p. 65 - 71, 1991.
- [20] Sztajer, H., Maliszewska, I., Wieczorek, J. Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi, and Actinomycetes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, p. 492 - 497, aug. 1988.
- [21] Tan, K. H., Gill, C.O. Utilisation of substrates during batch growth of *Pseudomonas fluorescens* on olive oil, lard and mutton tallow. **Appl. Microb. Biotech.**, v. 26 ,p. 443 - 446, 1987.
- [22] Vitoratto, E., Hirata, Y. S., Craveiro, A. M., Schmidell, W. Estudo da digestibilidade de efluentes da fábrica de óleos vegetais. In: **Encontro estadual de especialistas em digestão anaeróbia**, 1983. Anais. São Paulo, DCET, 1987. p. 199 - 202.

APÊNDICE

Tabela 9 - Dados da influência da agitação na atividade enzimática, representados na Figura 11

| Agitação (r.p.m.) | atividade relativa (%) |
|----------------------|---------------------------|
| 0 | 0 |
| 50 | 0.3 |
| 100 | 9.03 |
| 150 | 47.4 |
| 200 | 100 |

Tabela 10 - Dados da temperatura ótima para a banha de porco, representados na Figura 12

| Temperatura (°C) | H(%) |
|------------------|------|
| 40 | 29.4 |
| 45 | 49 |
| 50 | 54.2 |
| 55 | 40.9 |
| 60 | 35.4 |

Tabela 11 - Dados da temperatura ótima para a banha de frango, representados na Figura 13

| Temperatura (°C) | H(%) |
|------------------|------|
| 30 | 26.6 |
| 35 | 34.3 |
| 40 | 42.7 |
| 45 | 40.2 |
| 50 | 37.7 |

Tabela 12 - Dados da temperatura ótima para o sebo de boi, representados na Figura 14

| Temperatura (°C) | H(%) |
|------------------|------|
| 45 | 36.4 |
| 50 | 44 |
| 55 | 41.4 |
| 60 | 37.7 |

Tabela 13 - Dados da hidrólise da banha de porco, representados na Figura 15

| t (min) | H(%) |
|---------|------|
| 0 | 0 |
| 5 | 15.2 |
| 10 | 41.2 |
| 15 | 55 |
| 20 | 63.1 |
| 30 | 75 |
| 40 | 82 |
| 50 | 85.1 |
| 60 | 88.5 |
| 80 | 92.4 |
| 100 | 96.3 |
| 120 | 98 |
| 180 | 100 |

Tabela 14 - Dados da hidrólise do sebo de boi, representados na Figura 16

| t (min) | H(%) |
|---------|------|
| 0 | 0 |
| 5 | 12 |
| 10 | 28 |
| 15 | 46.7 |
| 20 | 60.5 |
| 30 | 71 |
| 40 | 78.2 |
| 60 | 88.3 |
| 80 | 93.3 |
| 100 | 95.9 |
| 120 | 98.4 |
| 180 | 100 |

Tabela 15 - Dados da hidrólise da banha de frango, representados na Figura 17

| t (min) | H(%) |
|---------|------|
| 0 | 0 |
| 5 | 13.9 |
| 10 | 28.4 |
| 15 | 41.6 |
| 20 | 55.5 |
| 30 | 64.3 |
| 40 | 73.2 |
| 50 | 79.3 |
| 60 | 84.5 |
| 80 | 89.6 |
| 100 | 91.8 |
| 120 | 93.1 |
| 180 | 96.1 |

Tabela 16 - Dados da influência da concentração de substrato na cinética enzimática, representados na Figura 18

| t (min) | H(%) | |
|---------|---------|--------|
| | S=50000 | S=5000 |
| 0 | 0 | 0 |
| 5 | | 15.2 |
| 10 | | 41.2 |
| 15 | 7 | 55 |
| 20 | | 63.1 |
| 30 | 21 | 75 |
| 40 | | 82 |
| 45 | 32 | |
| 50 | | 85.1 |
| 60 | 43.4 | 88.5 |
| 80 | | 92.4 |
| 90 | 56.2 | |
| 100 | | 96.3 |
| 120 | 65.3 | 98 |
| 150 | 73.6 | |
| 180 | 79.2 | 100 |
| 240 | 87.2 | |
| 300 | 90 | |

Tabela 17 - Dados da formação de mono e diglicerídeos durante a reação enzimática, representados na Figura 19

| t (min) | H(%) | |
|---------|--------------------------|---------------------|
| | análise de ácidos graxos | análise do glicerol |
| 0 | 0 | 0 |
| 5 | 12 | |
| 10 | 28 | |
| 15 | 46.7 | 17 |
| 20 | 60.5 | 25.5 |
| 30 | 71 | 39 |
| 40 | 78.2 | 52.9 |
| 60 | 88.3 | 72.4 |
| 80 | 93.3 | 84 |
| 100 | 95.9 | 92.9 |
| 120 | 98.4 | 97.6 |
| 180 | 100 | 100 |