

Tratamento microbiológico de resíduo graxo de abatedouros de frangos: modificação para produção de biodiesel

Roger Vasques MARQUES¹, Lucas Lourenço Castiglioni GUIDONI², Gustavo Amaro BITTENCOURT³, Eduarda Hallal DUVAL⁴, Érico Kunde CORRÊA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas (rrogermarques@ibest.com.br)

²Universidade Federal de Pelotas (lucaslcg@gmail.com)

³Universidade Federal de Pelotas (gustavobittencourt32@gmail.com)

⁴Universidade Federal de Pelotas (eduardahd@hotmail.com)

⁵Universidade Federal de Pelotas (ericokundecorrea@yahoo.com.br)

Resumo

A significativa produção brasileira de carne de frango impulsiona o país para o topo da lista de países produtores e exportadores desse produto alimentício, o que enaltece a importância de um gerenciamento adequado dos resíduos gerados principalmente pelo grande volume dos mesmos. Dessa forma, a busca por agregar valor a um resíduo de forma que ele se torne um produto nobre, que gere de renda para a empresa, é um importante incentivo para a manutenção dessa atividade agroindustrial. Assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar micro-organismos como tratamento microbiológico de resíduos graxos de frangos para posterior produção de biodiesel, de forma a tornar estes resíduos líquidos a temperaturas mais amenas possibilitando que reações de transesterificação ocorram em condições brandas de operação.

Palavras-chave: Resíduo Graxo, Tratamento, Biocombustível, Biotécnicas.

Área Temática: Resíduos Sólidos.

Microbiological treatment of chicken fatty slaughterhouse waste: modification for production of biodiesel

Abstract

The significant domestic production of chicken meat boosts our country to the top of the list of countries producing and exporting this kind of product, which elevates the importance of proper waste management generated mainly by the large amount of it. Therefore, the search for adding value to a waste so that it becomes a valuable product revenue generator for the company is an important incentive for the maintenance of this agroindustrial activity. Thus, the aim of this study was to use micro-organisms such as microbiological treatment of chickens fatty waste for subsequent production of biodiesel in order to turn these wastes into liquid at warmer temperatures allowing transesterification reactions occur under mild operational conditions.

Key words: Fatty waste, Treatment, Biofuel, Biotechniques.

Theme Area: Solid waste

1 Introdução

A cadeia produtiva de carne de frango é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro. Com uma produção de 12,645 milhões de toneladas em 2012, e movimentando cerca de 7,7 bilhões de dólares em exportações, o que representa 31% do total, o Brasil é o maior exportador e terceiro maior produtor mundial, atrás apenas de China e Estados Unidos. Além disso, esta cadeia de produção é a que apresenta melhor projeção de crescimento entre todas as carnes, chegando a 4,2% anuais, o que alcançaria a uma produção estimada de 20,332 milhões de toneladas em 2022 (UBABEF, 2013).

Com a produção em larga escala da avicultura nacional são gerados resíduos sólidos tais como pele, penas, vísceras, sangue, ossos e gordura, que são biomassas que possuem proteínas, enzimas e ácidos graxos, os quais podem causar degradação ambiental e possuem um valor agregado em potencial se tratados de forma correta (ZHU *et al.*, 2010; LASEKAN *et al.*, 2013). Atualmente a valorização destes resíduos é feita normalmente por unidades independentes de processamento de resíduos, como graxarias, nos quais a matéria animal sofre uma série de transformações físicas e químicas em processos que envolvem aquecimento, desidratação, separação e moagem de ossos, carnes, gorduras e outros materiais, entrando no processo a matéria-prima e o calor, e tendo como saídas os óleos, gorduras, sólidos ricos em proteínas, efluentes e resíduos de transformação (SALMINEN & RINTALA, 2002).

Por outro lado, a consciência das mudanças climáticas tem servido como um importante fator para o incentivo da produção de biodiesel como substituinte dos combustíveis fósseis, por ter potencial para diminuir a emissão de gases de efeito estufa e estimular diversos setores produtivos agregando valor aos seus subprodutos, porém ainda existem dificuldades a serem contornadas para que esta atividade seja economicamente atrativa perante o uso de combustíveis fósseis, sendo a principal razão delas o alto custo de óleos vegetais como matéria-prima e sua concorrência por áreas férteis para produção de combustível/alimentos, o que pressiona o preço dos alimentos envolvidos, como o caso da soja no Brasil, pois a demanda por energia sempre converge para patamares cada vez mais elevados (TIMILSINA *et al.*, 2011). Os resíduos graxos animais podem ser um substituto viável dos óleos vegetais não apenas por ser uma matéria-prima de baixo custo, mas também por não competir com a produção de alimentos em termos de áreas produtivas, e por valorizar um resíduo que necessita de tratamento adequado (MARULANDA *et al.*, 2010).

No entanto, diferentemente dos óleos vegetais, as gorduras animais apresentam-se no estado sólido a temperatura ambiente até patamares próximos a 70°C, o que prejudica reações químicas com esse substrato pela indisponibilidade de solvente a fim de promover a aproximação e reação das moléculas (ALPTEKIN & CANAKCI, 2011).

Fiegler & Brückner (1997) identificaram em *Staphylococcus xylosus* o gene responsável pela produção da enzima serina acetil transferase (E.C.3.1.1.3), capaz de hidrolisar especificamente ácidos graxos com cadeia carbonada acima de 10 carbonos. Biologicamente, é uma exoenzima capaz de promover a quebra inicial de triacilgliceróis para posterior metabolização celular.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo utilizar biotécnicas em resíduos graxos de frangos com uso de *Staphylococcus xylosus*, reduzindo seu ponto de fusão e promover um material com melhores condições para ser transformado em biodiesel.

2 Materiais e Métodos

2.1. Coleta de amostras

As amostras dos resíduos graxos foram coletadas em um frigorífico abatedouro da

região sul do estado do Rio Grande do Sul, de animais recém abatidos, após o toalete das carcaças, onde o resíduo majoritariamente produzido é da gordura dorsal das aves. Os resíduos foram gentilmente doados pela empresa Frigorífico COSULATI S.A. situada em Morro Redondo-RS (Latitude: 31° 35' 18'' Sul; Longitude: 52° 37' 55'' Oeste).

2.2. Teor de umidade e acidez

Para obtenção do teor de umidade dos resíduos graxos frescos de frangos, foram pesadas 5g de gordura animal em cadinhos previamente tarados e levados para estufa a 105°C. Foi realizada a pesagem das amostras em intervalos de 1h a partir da segunda hora sob secagem até a obtenção de peso constante, conforme metodologia indicada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

O teor de acidez livre foi mensurado utilizando adaptação do método KS M ISO 6618 (Korean Standard Association, 2003) para produtos oriundos do petróleo e lubrificantes por método titulométrico. Foram pesadas 5g de resíduo graxo animal em frasco erlenmeyer e adicionados 50 mL de solução de éter etílico/etanol (2:1 v/v) como solvente. Foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e após 1 h em repouso, a solução foi titulada com KOH 0,1N até o aparecimento e permanência da cor rósea.

O índice de acidez é expresso pela massa de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes na amostra por g de amostra (mg KOH.g^{-1}). O teor de acidez livre foi calculado de acordo com a Eq. 1 a seguir.

$$A = \frac{5,611 \times a \times F}{S} \quad (1)$$

Onde, “A” é o valor da acidez (mg KOH.g^{-1}), “a” é o volume de KOH consumido na titulação (mL), “F” é a normalidade do hidróxido de potássio, e “S” é a massa de amostra (g).

Ambas as análises visaram averiguar a susceptibilidade inicial dos resíduos ao processo de transesterificação. Atingido um limiar de umidade, a agitação realizada no reator promove a saponificação e consequente formação de sabões, reduzindo o rendimento da produção de biodiesel. Já a presença de ácidos livres, indicativos da decomposição natural dos lipídios, dificulta a purificação do éster e glicerol, também causando quedas de rendimento de combustível (CHEN & LUO, 2011). Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

2.3. Culturas microbianas

Cepas estoque de *Staphylococcus xylosus* foram utilizadas no experimento. Pertencente a família das *Micrococcaceae*, o *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria mesófila, gram-positiva, em aerobiose apresenta crescimento ótimo, podendo ainda ser anaeróbio facultativo, porém com desenvolvimento menos significativo. É amplamente empregado pela indústria de alimentos em produtos fermentados. Esta última característica é conferida devido a sua capacidade de produzir compostos corantes, flavorizantes e de redução de nitratos, a partir da hidrólise de proteínas e lipídios, servindo como uma das culturas iniciadoras, juntamente com bactérias ácido-láticas, no processamento de queijos e produtos cárneos fermentados em geral (CICHOSKI et al., 2011; MANSOUR et al., 2009; OLESEN & STAHNKE, 2004).

2.4. Pré-enriquecimento

Para cada operação, foi preparado um tubo com 10 mL de caldo BHI (HIMEDIA – M210) conforme instrução contida no rótulo, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foi transferido assepticamente para esse tubo uma alçada de culturas estoques de

S.xylosus e incubados em estufa a $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por um *Overnight* de forma a retirar as células do estado de latência (MANSOUR et al., 2009).

Após o período de um *Overnight*, 1L de caldo BHI previamente esterilizado foi inoculado com 10 mL do meio pré-enriquecido (1% v/v) e incubado a $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 100rpm em câmara incubadora com agitação orbital (shaker). A fim de manter a concentração inicial de células na fermentação constante, foi construída a curva de crescimento bacteriana. Dessa forma foi averiguado que é necessário um tempo de incubação de 3h para atingir a concentração de 10^8 UFC/mL de meio de cultivo.

Para determinação desse ponto do crescimento onde a concentração celular atinge a ideal, foram transferidos assepticamente 2mL do caldo com as culturas pré-enriquecidas para um erlenmeyer com 200mL de caldo BHI estéril, submetido a fermentação em incubadora shaker a $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 100rpm ao longo de 8h, conforme metodologia descrita por Mauriello et al. (2004).

No tempo inicial, a partir da primeira hora e em intervalos de 1,5h, foram coletadas amostras do mosto e inoculadas em ágar BHI para contagem de colônias, utilizando a técnica do espalhamento em superfície onde 0,1mL da amostra foi assepticamente transferido para as placas e espalhadas pela superfície com auxílio de alça de Drigalski e incubadas a $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por 24h para realização da contagem de colônias e determinação do tempo de enriquecimento necessário para atingir a concentração desejada de colônias no inóculo.

2.5. Fermentação das gorduras de frangos

As amostras de gorduras das aves foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição dos respectivos volumes de caldo BHI, foram levadas a homogeneizador de alimentos tipo “*Stomacher*” por 2 min e transferidas para erlenmeyers estéreis onde o volume total do mosto foi de 200 mL. Os frascos foram dispostos em incubadora shaker para início da fermentação, sob $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 100 rpm. As condições de fermentação obedeceram ao delineamento experimental descrito na Tab. 1 a seguir.

Tabela 1 – Delineamento experimental aplicado na fermentação de gorduras bovinas

Resíduo	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes
	Tempo de fermentação (h)	Concentração de gordura (%)	
Gordura de aves	1,5	2,0	Ponto de fusão (AOCS, 2009)
	3,0	4,0	
	4,5	6,0	
	6,0	8,0	
	7,5	10,0	

3 amostras x 5 tempos x 10 concentrações = 150 experimentos x 3 repetições = 450 resultados

Ao atingir cada tempo analítico, a fermentação foi interrompida e foi coletada assepticamente uma amostra de aproximadamente 1g de cada erlenmeyer, correspondente as cinco diferentes concentrações em teste, submetendo-as a análise de ponto de fusão.

2.6. Ponto de fusão

A análise do ponto de fusão seguiu metodologia descrita pela American Oil Chemists Society (AOCS, 2009) onde aproximadamente 1g de amostra foi transferida para um tubo de ensaio e aquecida lentamente em manta térmica desde 30°C até 80°C . São detectadas três temperaturas diferentes ou não, referentes a três ácidos graxos que compõe o triacilglicerol, diferentes ou não. Dessa forma, foi adotado como ponto de fusão a temperatura de pico, ou

intermediária, restando somente a fração cristalizada de gordura no tubo de ensaio (RODRIGUEZ-RACT et al., 2010).

2.7. Tratamento estatístico

Os dados experimentais foram analisados por Análise de Variância (ANOVA). A Diferença Mínima Significativa (DMS) entre as médias dos resultados foram analisadas por teste de Tukey à nível de 5% de significância (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

3 Resultados e Discussão

3.1. Teor de umidade e acidez

A Tabela 2 apresenta os valores de umidade e acidez livre dos resíduos graxos de frangos antes da fermentação. A umidade da gordura de frango foi inferior ao limite máximo estabelecido pela literatura de 0,06%, portanto, dentro dos parâmetros adequados para sofrerem transesterificação por qualquer via catalítica sem a necessidade de passar por operação de secagem (MA et al., 1998). A acidez livre encontrada (0,102 mg KOH.g⁻¹) também está de acordo com o limiar estabelecido na literatura para gorduras animais propícias a passarem pelo processo de transesterificação segundo Ma et al. (1998) que relatam a necessidade de uma pré-esterificação dos resíduos graxos, a fim de neutralizar os ácidos graxos livres resultantes da decomposição natural dos lipídios para emprego de uma catálise alcalina em gorduras animais com índice de acidez acima de 1 mg KOH.g⁻¹.

Tabela 2 - Propriedades físicas das gorduras animais in natura

Propriedades	Gordura de frango*	Método
Umidade (%)	0,018 ± 0,01	Secagem em estufa (AOAC, 1995)
Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	0,102 ± 0,01	Titulometria (KS M ISO 6618)

*- Média e desvio padrão de três repetições

Ambos os parâmetros são simples e pré-seletivos para produção de biodiesel a partir de gorduras animais, pois indicam seu grau de degradação e se seu estado físico-químico é ou não prejudicial à produção do biocombustível.

3.2. Ponto de fusão

Os resultados encontrados para os pontos de fusão após o tratamento biológico estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Pontos médios de fusão de gordura de frango ao longo da fermentação

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
2	43,50 ^{3,a}	56,50 ^{1,a}	49,00 ^{2,b}	50,00 ^{2,a}	46,75 ^{23,a}
4	43,75 ^{3,a}	53,50 ^{1,a}	49,50 ^{12,ab}	49,25 ^{2,a}	45,75 ^{3,a}
6	44,25 ^{3,a}	53,25 ^{1,a}	51,50 ^{1,ab}	50,00 ^{12,a}	47,25 ^{23,a}
8	46,25 ^{2,a}	56,50 ^{1,a}	55,75 ^{1,a}	49,75 ^{2,a}	46,25 ^{2,a}
10	47,25 ^{1,a}	46,25 ^{1,b}	49,75 ^{1,ab}	49,00 ^{1,a}	47,00 ^{1,a}

* letras iguais nas colunas e números iguais nas linhas não apresentam diferença significativa, letras diferentes nas colunas e números diferentes nas linhas apresentam diferença significativa ($\alpha = 0,05$). Ponto de fusão inicial de 65°C ± 2°C.

Analisando os dados apresentados na Tabela 3, podemos averiguar que houve uma queda do ponto de fusão dos resíduos graxos animais tratados pela fermentação das bactérias no primeiro tempo de fermentação analisado (1,5h), onde uma queda de aproximadamente

20°C pôde ser averiguada sem diferença significativa entre as concentrações de gordura utilizadas ($p < 0,05$). Em relação ao tempo, as gorduras apresentaram uma maior queda no ponto de fusão em 1,5h em todas as concentrações, mantendo sem diferença significativa o mesmo patamar para a concentração de 10%, contudo, as concentrações inferiores apresentaram uma menor queda no ponto de fusão a partir de 3h de processo. A descontinuidade do padrão da temperatura pode ser explicada pela liquefação e diluição da gordura no meio de cultura, visto que a técnica para análise do ponto de fusão foi aplicada a massa sólida contida nos frascos, dessa forma, a gordura foi liquefeita no primeiro momento e a partir daí, a atividade microbiana foi direcionada a metabolização do resíduo agora líquido e consequentemente de mais fácil absorção pelas células. Através da Figura 1 podemos observar a formação dos glóbulos de gorduras em meio ao caldo de cultivo.



Figura 1 – Gordura de frango liquefeita durante o processo fermentativo de resíduo graxo de frango

Considerando que a matéria-prima é um resíduo agroindustrial, é desejada sua máxima utilização possível sem que prejudique o processo. Dessa maneira, como ótimo operacional, podemos observar que em 1,5h de fermentação foi suficiente para causar a queda de aproximadamente 17°C no ponto de fusão nas concentrações de 10% chegando ao entorno de 47°C na temperatura de pico (LIDE, 2007).

4 Conclusão

Concluimos que a fermentação causada por *Staphylococcus xylosus* em gorduras de frangos causam uma queda significativa em seu ponto de fusão devido a quebra na cadeia carbonada dos ácidos graxos, reduzindo os custos energéticos para liquefação da gordura, permitindo que processos químicos para obtenção do biodiesel sejam realizados em temperaturas mais amenas, reduzindo gastos e aumentando o rendimento da atividade.

5 Referências

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. *Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat. Bioresource Technology*. v.102, p.6385-6391, 2011.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). **AOCS Official Method Cj 1-94**. 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. v.2, n.17. Gaithersburg EUA: AOAC, 1995.

CHEN, Y. H.; LUO, Y. M. *Oxidation stability of biodiesel derived from free fatty acids associated with kinetics of antioxidants*. **Fuel Processing Technology**. v.92, p.1387-1393, 2011.

CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, A. P.; DI LUCCIO, M. *Viability of Staphylococcus xylosus during shelf-life of dulce de leche prepared by vacuum evaporation*. **Ciência Rural**. v.41, n.11, p.2026-2031, 2011.

FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations. **Food Outlook: Global Market Analysis – June 2011**. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

FIEGLER, H.; BRÜCKNER, R. *Identification of the serine acetyltransferase gene of Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.148, p.181-187, 1997.

KOREAN STANDARD ASSOCIATION. **Petroleum products and lubricant determination of acid or base number: Colour indicator titration method. KS M ISO 6618**. 2003.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**. v.33, n.3, p.552-565, 2013.

LIDE, D. R. **Handbook of chemistry and physics**. 88º Ed. Boca Raton – Florida: CRC Press. 2007.

MA, F. R.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. *The effects of catalyst, free fatty acids, and water content on transesterification of beef tallow*. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. v.41, p.1261-1264, 1998.

MANSOUR, S.; BAILLY, J.; LANDAUD, S.; MONNET, C.; SARTHOU, A. S.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LEROY, S.; IRLINGER, F.; BONNARME, P. *Investigation of association of Yarrowia lipolytica, Staphylococcus xylosus, and Lactococcus lactis in culture as a first step in microbial interaction analysis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, n.20, p.6422-6430, 2009.

MARULANDA, V. F.; ANITESCU, G.; TAVLARIDES, L. L. *Investigations on supercritical transesterification of chicken fat for biodiesel production from low-cost lipid feedstocks*. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.54, n.1, p.53-60, 2010.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. *Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy*. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 5ª Ed.

OLESEN, P. T.; STAHNKE, L. H. *The influence of environmental parameters on the catabolism of branched-chain amino acids by Staphylococcus xylosus and Staphylococcus carnosus*. **Food Microbiology**. v.21, p.43-50, 2004.

4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Fiema Brasil - Bento Gonçalves – RS, Brasil, 23 e 25 de Abril de 2014

RODRIGUEZ-RACT, J. N.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; SILVA, R. C.; GIONELLI, L. A. *Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de leite e óleo de girassol*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.258-267, 2010.

SALMINEN, E.; RINTALA, J. *Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – A review*. **Bioresource Technology**. v.83, n.1, p.13-26, 2002.

TIMILSINA, G. R.; MEVEL, S.; SHRESTHA, A. *Oil price, biofuels and food supply*. **Energy Policy**. v.39, n.12, p.8098-8105, 2011.

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Avicultura brasileira em 2012: exportações e produção**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/41c30a0f46702351b561675f70fae077.pdf> >. Acesso em: 20 ago. 2013.

ZHU, B.; ZHANG, R.; GIKAS, P.; RAPPORT, J.; JENKIS, B.; LI, X. *Biogas production from municipal solid wastes using an integrated rotary drum and anaerobic-phased solids digester system*. **Bioresource Technology**. v.101, n.16, p.6374-6380, 2010.