

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAYANE ALBERTON

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
VISANDO À APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE
LATICÍNIOS**

CURITIBA

2009

DAYANE ALBERTON

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
VISANDO À APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE
LATICÍNIOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr. Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA


2009


TERMO DE APROVAÇÃO

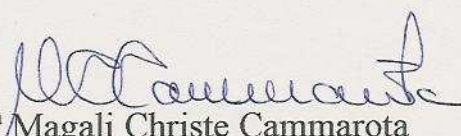
DAYANE ALBERTON


PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO VISANDO À APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS

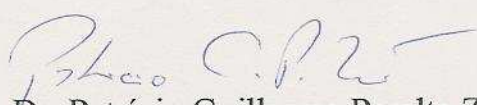
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Profª Drª Nadia Krieger (Orientadora)
Departamento de Química - UFPR


Prof. Dr. Jaime Paba Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR


Profª Drª Magali Christe Cammarota
Departamento de Engenharia Bioquímica - UFRJ


Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Departamento de Engenharia Química - UFSC


Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora
Departamento de Química - UFPR

Curitiba, 15 de dezembro de 2009.

Dedico este trabalho à minha verdadeira “tríade catalítica”: meu pai Arnaldo (*in memoriam*), minha mãe Inês e minha irmã Tati. Sem a ajuda de vocês, eu jamais “catalisaria”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido, adorável, batalhador, vencedor e amado pai Arnaldo Alberton, porque me possibilitou chegar até aqui através do seu esforço. Muito obrigada, é uma honra ser sua filha.

À minha mãe Inês Amâncio que junto ao meu pai, construiu o meu alicerce. Agradeço por ter nascido do seu ventre.

À minha guerreira irmã Tatiane Amâncio Alberton, por ser a Thaty, a irmã mais mãe do mundo. Você, sem dúvida, é espetacular.

À Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger, por sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. David Alexander Mitchell, pela co-orientação deste trabalho.

Ao Professor Jesús Cordova, da Universidade de Guadalajara, México, pela doação dos fungos.

Ao professor Jaime Paba, do Departamento de Bioquímica, pelas avaliações dos relatórios, sugestões de experimentos e por ter aceitado ser membro da banca interna.

À professora Joana Lea Meira Silveira, do Departamento de Bioquímica, pelo aceite do convite para ser membro da banca interna e pelas contribuições pertinentes e relevantes para o melhoramento do manuscrito de tese.

À Adriane Bach Onuki, analista de meio ambiente da Indústria de Laticínios Batávia, por sua gentileza em nos fornecer o efluente.

Ao professor Patrício Peralta Zamora e a amiga doutoranda Geovani Zanella do laboratório de Química Ambiental e de Materiais do Departamento de Química (UFPR), pelo empréstimo do espaço no laboratório, de equipamentos

e materiais e pelas discussões do teste de Zahn-Wellens. A colaboração de vocês foi de grande valia.

À professora Josmaria Lopes de Moraes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela discussão encantadora e segura dos testes de biodegradabilidade e das alternativas experimentais sugeridas para esse trabalho.

Ao professor Luis Pereira Ramos, à doutoranda Ana Paula Pitarelo, ao Claudiney Soares e ao Thiago Alexandre do laboratório de Química de Fitobiomassa do Departamento de Química (UFPR) por ceder o laboratório, equipamentos, materiais e vidrarias. Ana, Claudiney e Thiago, que bom ter conhecido vocês!

Ao meu querido namorado Marcelo Müller dos Santos, pela compreensão, incentivo e paciência. Você é muito importante na minha vida. Sou muito feliz ao seu lado.

A todos os meus queridos amigos que já fizeram parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e aos que persistem: Alessandra, Alexandra, Alysson, Arnaldo, Arquimedes, Bárbara, Bianca, Chrishelen, Cristiane (IC), Cristiane (doutoranda), Doumit (meu amigo *VIP*), Edneia, Érika, Kátia, Rodrigo, Thaís, Vivian e Viviane. Obrigada por vocês compartilharem essa caminhada comigo.

Aos amigos do Departamento de Química (UFPR), pela amizade vivenciada nos momentos bons e ruins: Ana Paula, Elisa, Érica, César, Emanuel e Thiago.

Aos amigos da pensão da Dona Silvia, ou melhor, da “casa dos adolescentes que não deram certo”. O único ponto positivo em morar na pensão foi ter conhecido vocês: Ana Cristina, Ana Lúcia, Arthur, Camila, Cristiane, Jordana, Nardia (argentina ingrata), Robson, Rozecler, Therys, Wyrllen e o nosso segurança Montanha.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que fizeram parte desses quatro anos: Fhernanda, Graciele, Izabel, Juliana, Marco Antônio, Lúcia, Marianna, Viviane. Estimo muito vocês!

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, por estimular, por meio de seus professores e funcionários, o desenvolvimento do espírito científico. Em especial, agradeço à senhora Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências: Bioquímica, pela ajuda e pelo carinho que me deu quando mudei para Curitiba. Eu jamais esquecerei a senhora. Obrigada!

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e taxa de bancada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal, meu muito obrigada!

Se não puder voar, corra. Se não puder correr,
ande. Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente
de qualquer jeito.

Martin Luther King

RESUMO

No presente trabalho, o fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM foi cultivado por fermentação no estado sólido (FES) e o sólido fermentado (SF) produzido foi usado para hidrolisar triacilgliceróis de efluente gerado por indústria de laticínios. Após a triagem de 11 cepas de fungos filamentosos para a produção de lipases, o fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM foi selecionado para os estudos de FES. No processo fermentativo, as condições adotadas para produção de lipases foram as seguintes: mistura de substratos (farelo da semente de girassol e bagaço de cana de açúcar, na proporção 1:3), umidade inicial dos substratos 79%, temperatura de produção 40°C. Nessas condições, a atividade lipolítica máxima, após 18 h de cultivo, de 26 U/gSS (unidades por grama de sólido seco) contra a trioleína e de 51 U/gSS contra tricaprilina. Nos experimentos de hidrólise, após 12 h de incubação com SF a 35°C, a remoção de óleos e graxas (O&G) das amostras de efluente esterilizado foi 30%, enquanto o efluente não esterilizado apresentou 20% de remoção. Após 72 h, a remoção de O&G foi 78% para o efluente esterilizado e 80% para o efluente não esterilizado. Quando o efluente não esterilizado foi incubado a 35°C por 72 h, na ausência de sólido fermentado, uma remoção de 38% de O&G foi alcançada. No efluente esterilizado, as remoções de O&G foram feitas por *R. microsporus*, enquanto que no efluente não esterilizado, O&G foram removidos por microrganismos endógenos do efluente. A biodegradabilidade do efluente foi avaliada através da razão DBO₅/DQO: quando o valor dessa razão é menor que 0,60, a biodegradabilidade do efluente é considerada baixa. Os valores das razões DBO₅/DQO para o efluente esterilizado e não esterilizado, incubados por 12 h e não adicionados de sólido fermentado, foram 0,59 e 0,30, respectivamente, enquanto que no mesmo tempo de incubação, as razões DBO₅/DQO do efluente esterilizado e não esterilizado tratados com sólido fermentado foram 0,64 e 0,45, indicando que o tempo de 12 h de hidrólise aumentou a biodegradabilidade do efluente. No entanto, quando o efluente esterilizado e não esterilizado foram tratados com sólido fermentado por 72 h, as razões DBO₅/DQO caíram para 0,44 e 0,12, respectivamente, mostrando que esse longo período de incubação favoreceu a remoção da matéria orgânica por *R. microsporus* e microrganismos endógenos, respectivamente. Esses resultados são promissores e sugerem que a otimização do sistema envolvendo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM, incluindo a produção do sólido fermentado e sua aplicação no tratamento de efluente contendo alta concentração de gordura, deve ser realizada.

ABSTRACT

In the present work, the filamentous fungus *Rhizopus microsporus* CPQBA 312 -07 DRM was grown in solid-state fermentation (SSF) and the resulting fermented solid (FS) was used to hydrolyze triacylglycerols in a high-fat dairy wastewater. After the screening of 11 strains of filamentous fungi for the lipases production, *Rhizopus microsporus* CPQBA 312 -07 DRM was selected for SSF studies. In the fermentative process, the conditions adopted for the lipases production were the following: mixture of substrates (sunflower seed meal to sugar cane bagasse, in proportion 1:3 (w/w), 79% initial moisture content, 40°C temperature of the production. The maximum lipolytic activity, after 18 h of culture, was 26 U/gDS (units per gram of dry solid) against triolein and 51 U/gDS against tricaprylin. In the pre-hydrolysis experiments, after 12 h of incubation with FS at 35°C, the sterilized effluent samples showed 30% removal of oil and grease (O&G) while the unsterilized effluent showed 20% removal. After 72 h, O&G removal was 78% for the sterilized effluent and 80% for the unsterilized effluent. When the non-sterilized effluent was incubated at 35°C for 72 h in the absence of added fermented solid, 38% removal of O&G was obtained. In the sterilized effluent, the O&G removals were done by *R. microsporus*, while in the non-sterilized effluent, the O&G were removed for endogenous microorganisms. The biodegradability of the effluent was evaluated through BOD₅/COD ratio: when this ratio falls below 0.60 the biodegradability of the effluent is considered low. For the sterilized and non-sterilized effluent without addition of fermented solid, the BOD₅/COD ratios after 12 h were 0.59 and 0.30, respectively, while at the same time the BOD₅/COD ratios of sterilized and non-sterilized effluent treated with fermented solid were 0.64 and 0.45, indicating that a 12 h hydrolysis increased the biodegradability of the effluent. However, when the sterilized and non-sterilized effluent were treated with fermented solid for 72 h, the BOD₅/COD ratios decreased to 0.44 and 0.12, showing that this longer incubation period favored organic matter removal by *R. microsporus* and endogenous microorganisms, respectively. These results are promising and suggest that the optimization of the system involving *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM, including both the production of the fermented solid and its application in the pretreatment of the high-fat effluent should be worked.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	FLUXOGRAMA DE UMA PLANTA DO PROCESSO DE LODOS ATIVADOS.....	26
FIGURA 02 -	COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE UM FLOCO DE LODOS ATIVADOS.....	28
FIGURA 03 -	FLUXOGRAMA DA AÇÃO DOS GRUPOS DE BACTÉRIAS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA MATÉRIA ORGÂNICA.....	33
FIGURA 04 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.....	37
FIGURA 05 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE.....	38
FIGURA 06 -	MODELO TRIDIMENSIONAL DE LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i>	39
FIGURA 07 -	MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES.....	40
FIGURA 08 -	CALHA PARSHALL: PONTO DE COLETA DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS BATÁVIA.....	71
FIGURA 09 -	REATORES UTILIZADOS PARA O TESTE DE BIODEGRADABILIDADE AERÓBIA.....	76
FIGURA 10 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE <i>p</i> -NITROFENILA CATALISADA POR LIPASES.....	78
FIGURA 11 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL CATALISADA POR LIPASES.....	78
FIGURA 12 -	HALOS FLUORESCENTES PRODUZIDOS PELA CEPA 64a V DO GÊNERO <i>Rhizopus</i> EM MEIO SÓLIDO CONTENDO RODAMINA.....	84
FIGURA 13 -	EFEITO DO TIPO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELA LINHAGEM FÚNGICA 43a IV.....	86
FIGURA 14 -	EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE OLIVA NO PRÉ-INÓCULO NA PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LINHAGEM FÚNGICA 43a IV.....	88
FIGURA 15 -	PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELAS DIFERENTES CEPAS DO GÊNERO <i>Rhizopus</i>	89
FIGURA 16 -	PRODUÇÃO DE LIPASE POR CEPA 43a IV EM FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL.....	92
FIGURA 17 -	PRODUÇÃO DE LIPASES EM MISTURAS DE FARELO DE GIRASSOL E BAGAÇO DE CANA PELO FUNGO 43a IV.....	96
FIGURA 18 -	PRODUÇÃO DE LIPASES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE MISTURAS DE FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL E BAGAÇO DE CANA PELO FUNGO 43a IV.....	98
FIGURA 19 -	ASPECTO DOS SUBSTRATOS FERMENTADOS COM A CEPA 43a IV APÓS 18 h DE CULTIVO A 40°C.....	99

FIGURA 20 -	PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO COM FUNGOS DO GÊNERO <i>Rhizopus</i>	100
FIGURA 21 -	ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	102
FIGURA 22 -	EFEITO DA PRESENÇA DE EMULSÃO NA ATIVIDADE DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	104
FIGURA 23 -	PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM, COM DOSAGEM DE ATIVIDADE REALIZADA DIRETAMENTE NO SÓLIDO FERMENTADO, USANDO TRICAPRILINA COMO SUBSTRATO.....	106
FIGURA 24 -	EFEITO DA SECAGEM EM ESTUFA SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	109
FIGURA 25 -	EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i>	111
FIGURA 26 -	(a) ANÁLISE COMPARATIVA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) VARIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA (c) CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SÓLIDO FERMENTADO.....	113
FIGURA 27 -	VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO.....	114
FIGURA 28 -	EFEITO DA AZIDA SÓDICA NA LIBERAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES NO EFLUENTE ESTÉRIL DURANTE TRATAMENTO COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO	115
FIGURA 29 -	(a) ANÁLISE COMPARATIVA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) VARIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA (c) CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	117
FIGURA 30 -	VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	119
FIGURA 31 -	(a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O	

	TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDO FERMENTADO.....	129
FIGURA 32 -	AValiação DO CRESCIMENTO DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDO FERMENTADO.....	130
FIGURA 33 -	(a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA.....	133
FIGURA 34 -	EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO.....	134
FIGURA 35 -	(a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	135
FIGURA 36 -	EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	FONTES DE LIPÍDEOS E SUAS CONCENTRAÇÕES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	20
TABELA 02 -	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LIPASES MICROBIANAS.....	42
TABELA 03 -	ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	50
TABELA 04 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEOS SOBRE A REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) E DE DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) POR TRATAMENTOS BIOLÓGICOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS.....	54
TABELA 05 -	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE DE LÍPÍDEOS DE EFLUENTE TRATADO COM SÓLIDO FERMENTADO SOBRE TRATAMENTOS BIOLÓGICOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS.....	56
TABELA 06 -	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS NOS DOIS LOTES DE EFLUENTE UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	70
TABELA 07 -	TESTE EM MEIO SÓLIDO PARA A SELEÇÃO DE ESTIRPES FÚNGICAS PRODUTORAS DE LIPASES.....	83
TABELA 08 -	PROPORÇÕES DOS SUBSTRATOS FARELO DA SEMENTE DE GIRASSOL (FSG) E BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (BCA) E CONDIÇÕES DE PREPARO DESSES SUBSTRATOS.....	105
TABELA 09 -	NÍVEIS DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO ₅) e DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) NO ESTUDO DO EFLUENTE ESTÉRIL DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS APÓS TRATAMENTO COM SÓLIDO FERMENTADO E COM SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07.....	122
TABELA 10 -	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE ESTÉRIL DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM SÓLIDO FERMENTADO E ESPOROS DE <i>Rhizopus microsporus</i>	124
TABELA 11 -	PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO DISPERSO (DQO _d) DO EFLUENTE ESTÉRIL PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE ZAHN-WELLENS	125
TABELA 12 -	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO SOLÚVEL (DQO _d) OBTIDA DURANTE O TESTE DE ZAHN-WELLENS PARA EFLUENTE ESTÉRIL DE LATICÍNIO TRATADO PREVIAMENTE COM SÓLIDO FERMENTADO E SUSPENSÃO DE <i>Rhizopus microsporus</i>	126
TABELA 13 -	PARÂMETROS DETERMINADOS NO SEGUNDO	

LOTE DE EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM
SÓLIDO FERMENTADO (SF) DE *Rhizopus*
microsporus CPQBA 312-07 DR..... 138

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Batata, Dextrose, Agar
CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná
CIP	<i>Cleaning in place</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio ambiente
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio em cinco dias
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO _d	Demanda Química de Oxigênio dispersa
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FES	Fermentação no Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FSG	Farelo da Semente de Girassol
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
O&G	Óleos e Graxas
pnP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
PVA	Álcool Polivinílico
SE	Suspensão de Esporos
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SF	Sólido Fermentado
SST	Sólidos Suspensos Totais
SVSLM	Sólidos Voláteis em Suspensão no Licor Misto
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL E EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE LIPÍDEOS.....	19
2.2 EFLUENTES GERADOS PELAS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS	20
2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS.....	22
2.3.1 Métodos físico-químicos	22
2.3.2. Tratamento biológico	24
2.3.2.1 Processo aeróbio	25
2.3.2.2 Formação do floco biológico no processo de lodo ativado	26
2.3.2.3 Problemas operacionais no sistema de lodo ativado gerados pela presença de lipídeos.....	29
2.3.2.4 Processo anaeróbio	32
2.4 BIOAUMENTAÇÃO E BIOESTIMULAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	35
2.4.1 Lipases	36
2.4.1.1 Aspectos estruturais e mecanismo catalítico das lipases	37
2.4.1.2 Fontes de lipases e suas características bioquímicas	41
2.4.1.3 Aplicações de lipases	43
2.4.1.4 Produção de lipases por Fermentação no Estado Sólido	46
2.4.1.5 Lipases no tratamento de efluentes	51
3 OBJETIVOS.....	61
3.1 Objetivos Específicos	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO.....	63
4.2 SELEÇÃO DAS CEPAS FÚNGICAS LIPOLÍTICAS.....	63
4.2.1 Seleção de cepas lipolíticas em meio sólido contendo Rodamina B	64
4.2.2 Fermentação Submersa	64
4.2.2.1 Composição do meio de cultivo	64
4.2.2.2 Preparo do inóculo e pré-inóculo	64
4.2.2.3 Condições de cultivo.....	65

4.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	66
4.3.1 Microrganismo	66
4.3.2 Preparo do inóculo.....	66
4.3.3 Seleção e preparo dos substratos	66
4.3.3.1 Determinação da umidade dos substratos.....	68
4.3.4 Condições de cultivo no meio sólido.....	68
4.3.4.1 Extração e secagem do sólido fermentado para determinação da atividade lipolítica	68
4.4. ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS	69
4.4.1 Origem e caracterização do efluente	69
4.4.2 Padronização do efluente	71
4.4.3 Hidrólise enzimática do efluente	72
4.4.3.1 Determinação indireta da biomassa fúngica	73
4.4.4 Estudos de biodegradabilidade do efluente	73
4.4.4.1 Determinação da razão de biodegradabilidade (DBO ₅ /DQO).....	73
4.4.4.2 Teste de biodegradabilidade aeróbia de Zahn Wellens.....	74
4.4.5 Contagem dos microrganismos endógenos do efluente.....	76
4.4.6 Métodos de dosagem da atividade lipolítica	77
4.4.6.1 Método da hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> NPP).....	77
4.4.6.2 Método titulométrico.....	78
4.4.7 Métodos analíticos	79
4.4.7.1 Determinação de proteínas.....	79
4.4.7.2 Determinação de açúcares totais.....	79
4.4.7.3 Determinação do teor de óleos e graxas (O&G).....	79
4.4.7.4 Determinação do teor de ácidos livres.....	80
4.4.7.5 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	81
4.4.7.6 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅).....	82
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 SELEÇÃO DE CEPAS LIPOLÍTICAS.....	83
5.1.1 Seleção em meio sólido.....	83
5.1.2 Seleção por fermentação submersa (FS).....	84
5.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	90
5.2.1 Seleção de substratos	90
5.2.2 Estudo do efeito de diferentes proporções de farelo de girassol e bagaço de cana na produção de lipase	97
5.2.3 Comparação da produção de lipases por diferentes estirpes de fungos filamentosos.....	100
5.2.4 Determinação direta da atividade lipolítica no sólido fermentado por titulometria	101
5.2.5 Efeito de diferentes condições de tratamento dos substratos de FES na produção da atividade lipolítica.....	104
5.2.6 Efeito do processo de secagem do sólido fermentado sobre a atividade lipolítica.....	107
5.2.7 Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	110

5.3 ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS	111
5.4 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Rhizopus microsporus</i>	116
5.5 ESTUDOS DE BIODEGRADABILIDADE REFERENTE AO PRIMEIRO LOTE DE EFLUENTE PREVIAMENTE ESTERILIZADO	120
5.5.1 Determinação da razão de biodegradabilidade (BOD ₅ /COD)	121
5.5.2 Teste de biodegradabilidade aeróbia de Zahn-Wellens.....	123
5.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE E REMOÇÃO DE LIPÍDEOS DO EFLUENTE ESTÉRIL DE LATICÍNIOS ATRAVÉS DO USO DE SÓLIDO FERMENTADO E DOS ESPOROS DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	127
5.6.1 Efeito da variação da concentração de sólido fermentado na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente estéril	128
5.6.2 Efeito da temperatura na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente estéril pelo sólido fermentado	131
5.7 ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E BIODEGRADABILIDADE REFERENTE AO SEGUNDO LOTE DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS ...	137
6 CONCLUSÕES	142
7 TRABALHOS FUTUROS.....	144
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
ANEXO I.....	167
ANEXO II.....	168

1. INTRODUÇÃO

A elevada concentração de lipídeos em efluentes é um grande obstáculo nas estações de tratamento das indústrias, principalmente nas indústrias do setor alimentício. Os lipídeos reduzem a eficiência dos processos biológicos de tratamento, principalmente devido as suas propriedades físico-químicas desfavoráveis (insolubilidade em água, solidificação ou semi-solidificação em temperatura ambiente), que limitam a disponibilidade de matéria orgânica para microrganismos (LEFEBVRE; PAUL; MAURET, 1998).

No processo aeróbio, como lodos ativados, as altas concentrações de lipídeos podem provocar a formação de filmes ao redor de flocos biológicos e conseqüentemente a transferência de oxigênio e nutrientes para os microrganismos do floco é prejudicada. Essa ação negativa dos lipídeos sobre os flocos provoca efeitos indesejáveis, como a proliferação de microrganismos filamentosos que impedem a formação de flocos densos, levando à flotação desses flocos nos tanques de sedimentação (CHIPASA; MEŁDRZYCKA, 2006). No caso da digestão anaeróbia, o acúmulo de ácidos graxos no efluente inibe a ação das bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas (CIRNE *et al.*, 2007; MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001; VIDAL *et al.*, 2000; PERLE; KIMCHIE; SHELEF, 1995).

Para tentar solucionar esses problemas, muitas indústrias têm empregado processos físico-químicos (flotação, coagulação, floculação). Porém, esses métodos geralmente não apresentam um desempenho satisfatório, devido à baixa remoção de matéria orgânica (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; VIDAL *et al.*, 2000).

O tratamento enzimático, utilizando lipases, tem mostrado um grande potencial no tratamento de efluentes com alto teor lipídico. A hidrólise de lipídeos dos efluentes aumenta a eficiência dos processos biológicos, pois facilita a assimilação de ácidos graxos pelo consórcio microbiano (RIGO *et al.*, 2008b; LEAL *et al.*, 2006, 2002; MENDES *et al.*, 2005; CAMMAROTA;

TEIXEIRA; FREIRE, 2001). No entanto, a viabilidade de aplicação do tratamento lipolítico depende dos custos da enzima. Alguns trabalhos têm sido realizados com preparações de lipases comerciais e com lipases comerciais imobilizadas (MENDES *et al.*, 2005; JEGANATHAN; BASSI; NAKHLA, 2007,2006), porém essas enzimas são consideradas de custo elevado para serem empregadas como uma opção viável para o tipo de aplicação proposta.

O processo de fermentação no estado sólido (FES) apresenta potencial para ser uma opção econômica para produção de lipases. O estudo realizado por Castilho *et al.* (2000) mostrou uma redução em 30% dos custos de produção por FES quando comparados com os gastos de produção por fermentação submersa, desde que resíduos agroindustriais sejam usados como substratos. Baseado nessas considerações, o grupo de pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro tem utilizado um sólido fermentado, produzido através da FES de torta de babaçu por *Penicillium restrictum*, para hidrolisar efluentes com teores de óleos e graxas (O&G) acima de 800 mg/L (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007; ROSA; CAMMAROTA; FREIRE, 2006; LEAL *et al.*, 2006; JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001). No entanto, nesses estudos, a etapa de hidrólise tem sido apenas monitorada pela detecção dos níveis de ácidos livres.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi elucidar as mudanças que ocorrem no efluente durante a etapa de hidrólise. O sistema modelo escolhido para este trabalho envolveu o tratamento de efluente de laticínios com um sólido fermentado resultante do cultivo do fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. Durante o tratamento enzimático, diferentes parâmetros foram monitorados, como: níveis de ácidos livres, teor de óleos e graxas (O&G) e atividade de lipases. A biodegradabilidade do efluente pós-hidrolisado foi determinada pela medição da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio em cinco dias (DBO₅).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão abordados aspectos gerais sobre os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios, os tratamentos convencionais de efluentes aplicados na indústria, o impacto negativo dos lipídeos sobre os métodos convencionais de tratamento, o tratamento enzimático como um método coadjuvante no tratamento de efluentes com elevada carga lipídica, conceitos básicos sobre lipases e produção dessas enzimas por fermentação no estado sólido.

2.1 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL E EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE LIPÍDEOS

Com o crescente processo de industrialização no Brasil, o lançamento de efluentes agroindustriais sem tratamento prévio ou inadequado em corpos hídricos receptores (rios, lagos e lagoas) têm se tornado uma das questões ambientais mais preocupantes da atualidade. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), no artigo 34 da resolução nº. 357 de 17 de março de 2005, estabeleceu as seguintes condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos: pH entre 5 a 9; temperatura inferior a 40°C, sendo que a temperatura do corpo hídrico receptor não deverá exceder a 3°C na zona de mistura; concentração de óleo mineral até 20 mg/L e, para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L. A resolução também estabeleceu, através do Artigo 26, que os órgãos ambientais federal, estaduais e municipais, no âmbito de sua competência, deverão, por meio de norma específica ou no licenciamento da atividade ou empreendimento, estabelecer a carga poluidora máxima para o lançamento de substâncias passíveis de estarem presentes ou serem formadas nos processos produtivos. No estado do Paraná, o Instituto Ambiental do Paraná (IAP) é o órgão responsável em executar a função descrita no artigo 26. Para a indústria de laticínios que cedeu o efluente utilizado nesse trabalho, foi estabelecido que para uma vazão

de 7000 m³/dia de efluente, a matéria orgânica biodegradável representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) deverá ser inferior a 70 mg/L ou 490 Kg DBO/dia; e a matéria orgânica total (biodegradável ou não) representada pela Demanda Química de Oxigênio (DQO) deverá ser inferior a 175 mg/L ou 1225 Kg DQO/dia.

O cumprimento dos padrões de lançamento de efluentes determinados pelo CONAMA tem se tornado um dos grandes desafios para todas as indústrias, principalmente para aquelas que geram efluentes com alta carga lipídica e conseqüentemente alta carga de matéria orgânica. Ao se comparar os valores da concentração de lipídeos mostrados na Tabela 1 com os valores estabelecidos pela legislação ambiental, torna-se clara a necessidade de investimentos no tratamento dos efluentes dessas indústrias.

TABELA 1 – FONTES DE LIPÍDEOS E SUAS CONCENTRAÇÕES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Tipos de efluentes	Concentração de lipídeos (mg/L)
Doméstico	40 - 100
Matadouros e avícolas	Acima de 500
Laticínios	4.680
Restaurantes	98
Indústria de extração de Óleo de oliva	16.000
Indústria de Sorvetes	845

Adaptado de Mendes *et al.*, 2005

2.2 EFLUENTES GERADOS PELAS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS

A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia. O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, ocupando o sexto lugar, segundo dados da FAO, com volume aproximado de 25,3 bilhões

de kg/ano e possui aproximadamente 2 mil indústrias de laticínios sob inspeção federal. Essas indústrias estão localizadas na sua maioria na região Sudeste, onde se situa a maior bacia leiteira do país (SEBRAE, 2009).

No setor de laticínios, o consumo de água de limpeza representa mais de 80% da demanda de água, sendo posteriormente tratada em sistema de tratamento de resíduos (BRUM *et al.*, 2009). Os efluentes líquidos das indústrias de laticínios têm origem na lavagem e/ou enxaguamento de latões de leite, tanques, tubulações de leite, mangueiras de soro, bombas, equipamentos, utensílios utilizados diretamente na produção, pisos e paredes. Além disso, citam-se os vazamentos de leite em tubulações e equipamentos correlatos, inclusive pasteurizadores e evaporadores, descargas de misturas de sólidos de leite e água por ocasião do início e interrupção de funcionamento de pasteurizadores, trocadores de calor, separadores e evaporadores. As águas de refrigeração e as águas de caldeiras não são geralmente consideradas como águas residuárias, tendo em vista que o seu uso costuma ser feito em sistema de recirculação. Portanto, a vazão e o volume dos efluentes estão intimamente relacionados ao volume de água consumido pela indústria de laticínio (MACHADO *et al.*, 1999).

Geralmente, o sistema de limpeza que gera as águas de lavagem na indústria de laticínios é o *cleaning in place* (CIP). Esse sistema consiste em 7 etapas, como descrito pelo Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT, 2007): pré-enxague, circulação com hidróxido de sódio, enxágüe, circulação ácida, enxágüe, sanitização e enxágüe final. A lavagem com hidróxido de sódio (0,2 a 2,0%) tem por objetivo remover proteínas e gorduras, enquanto a lavagem ácida remove depósitos inorgânicos chamados de “pedra de leite”; para isso, são usados ácido nítrico (0,5%) e fosfórico (2%), juntos ou isoladamente (THASSITOU; ARVANITOYANNIS, 2001).

Além dos detergentes (hidróxido de sódio, metassilicato de sódio) e desinfetantes (hipoclorito de sódio, clorhexidina, compostos quaternários de amônio), os compostos associados ao leite, como gorduras, proteínas e carboidratos contribuem para a composição do efluente, sendo que 1 kg de

gordura equivale a 3 kg de DQO, 1 kg de lactose equivale a 1,13 kg de DQO e 1 kg de proteína equivale 1,36 kg de DQO (MIGA, 2008). Além disso, dependendo da linha de produção, o efluente pode conter pedaços de frutas, essências, condimentos diversos, subprodutos como o soro (produção de queijo) e o leitelho (produção de manteiga) (VIDAL *et al.*, 2000). Diante de tudo isso, percebe-se que as características físico-químicas do efluente gerado são extremamente variáveis. Como exemplo, Gavala *et al.* (1999) relataram que efluentes de laticínios podem apresentar DQO em torno de 3000 mg/L no processamento do leite e um valor de 50.000 mg/L quando são fabricados subprodutos do leite.

2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS

A escolha do método de tratamento depende basicamente da natureza do efluente. No entanto, os investimentos em capital, os custos operacionais, a área disponível para implantação do tratamento, o controle operacional e a legislação ambiental devem ser também considerados (MENDES *et al.*, 2005; GIORDANO, 2004).

As seções subseqüentes descreverão o funcionamento dos métodos aplicados a cada etapa de tratamento de efluentes com elevada taxa de lipídeos e a interferência dessas moléculas nas eficiências desses métodos.

2.3.1 Métodos físico-químicos

Inicialmente, cabe fazer a ressalva que os métodos físico-químicos são individualmente classificados como operações unitárias físicas e processos unitários químicos. As operações unitárias físicas são aplicadas através de forças físicas e os processos unitários químicos consistem na utilização de reagentes químicos. Geralmente, os processos químicos são aplicados em

conjunção com operações físicas para um tratamento mais adequado do efluente e, conseqüentemente, o termo físico-químico pode ser empregado (METCALF; EDDY, 2003).

As operações físicas abrangem a remoção dos sólidos de dimensões relativamente grandes, sólidos em suspensão, sólidos sedimentáveis e flutuantes, bem como da matéria orgânica e inorgânica em suspensão coloidal. Os tipos de operações físicas aplicadas para remoção de óleos e gorduras são: separação água/óleo (caixa de gordura) e flotação (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

O processo de separação água/óleo que utiliza a caixa de gordura é feito por diferença de densidades. As frações oleosas menos densas são recolhidas na superfície e as borras oleosas, mais densas que a água, são sedimentadas e removidas por limpeza do fundo do tanque. Para melhor desempenho das caixas de gordura, devem ser evitadas temperaturas superiores a 35°C e valores de pH acima de 8,5, pois nessas condições ocorre a saponificação ou emulsificação, que prejudica a eficiência da separação pela formação de gotículas de tamanho pequeno (MENDES *et al.*, 2005; GIORDANO, 2004).

Outra operação unitária usada na estação de tratamento de efluente é a flotação, cujo princípio consiste na separação de partículas sólidas ou gotículas de óleo de uma fase líquida. A separação é alcançada pela introdução de finas bolhas de gás (normalmente ar) na fase líquida. As bolhas se ligam à matéria particulada e a força flutuante das partículas combinada com o gás é grande o suficiente para permitir que a partícula suba até a superfície. Portanto, as partículas que apresentam uma densidade menor do que a do líquido podem assim ascender (JORDÃO; PESSÔA, 1995).

No tratamento de efluentes líquidos, a flotação é usada principalmente para remover matéria suspensa. A principal vantagem da flotação é que partículas muito pequenas ou leves, que flutam lentamente, podem ser removidas completamente e em menor tempo. Uma vez que as partículas flodem na superfície, elas podem ser coletadas por uma operação de retirada

de espuma. O processo de flotação pode ser facilitado com o uso de vários aditivos químicos. Estes compostos, na maior parte, criam uma superfície ou uma estrutura que absorva ou aprisione facilmente bolhas de ar. Compostos químicos inorgânicos tais como sais de alumínio e ferro e sílica ativada, podem ser usados para se ligar à matéria particulada e assim, criar uma estrutura que aprisione bolhas de ar (JORDÃO; PESSÔA, 1995).

Em relação aos processos químicos, são utilizados produtos químicos como agentes de coagulação, neutralizantes de pH, agentes oxidantes e redutores, os quais promovem a remoção dos poluentes ou condicionam os efluentes para processos subseqüentes. Dentre os processos químicos utilizados para tratamento de efluentes com elevada concentração de lipídeos, cita-se a coagulação. O objetivo da coagulação não é apenas remover gordura, mas toda a matéria orgânica coloidal constituída por microrganismos, proteínas e argila, objetivando reduzir a carga orgânica do efluente para os processos biológicos subseqüentes. Essa remoção é feita pela adição de coagulantes químicos, como os sais de ferro ou alumínio (JORDÃO; PESSÔA, 1995).

Uma das desvantagens associadas com muitos processos químicos é o fato de serem processos aditivos. Como resultado, há normalmente um aumento líquido de compostos químicos dissolvidos na água. Este aspecto aditivo se contrasta com as operações físicas unitárias e com os processos biológicos, que podem ser descritos como subtrativos, pois ocorre remoção de material do efluente. Outra desvantagem dos processos químicos unitários são os elevados custos dos agentes químicos (VIDAL *et al.*, 2000).

2.3.2. Tratamento biológico

O tratamento biológico tem por objetivo a remoção da matéria-orgânica (carboidratos, proteínas e lipídeos) do efluente, através da transformação desta em biomassa e gases. Os parâmetros comumente utilizados para medir a remoção da matéria orgânica são a DBO e a DQO. A DBO mede a quantidade

de oxigênio necessária para que os microrganismos degradem a matéria orgânica e a DQO é a medida da quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente toda a matéria orgânica (VON SPERLING, 1996).

Os processos de tratamento biológico são classificados em aeróbio e anaeróbio (VON SPERLING, 1997). O processo anaeróbio apresenta as vantagens de produzir poucos sólidos, cerca de 5 a 10 vezes inferior à que ocorre nos processos aeróbios, consumir pouca energia, requerer menor área de instalação e produzir metano, que pode ser usado como fonte alternativa de energia para fins industriais e domésticos. Por outro lado, o processo anaeróbio apresenta uma bioquímica e microbiologia de digestão complexa, devido às várias etapas necessárias para que ocorra a degradação da matéria orgânica, geração de odores desagradáveis, produção de efluente com aspecto impróprio e lentidão no processo metabólico (CHERNICARO, 1997).

2.3.2.1 Processo aeróbio

O processo aeróbio de tratamento consiste na degradação da matéria orgânica por microrganismos, na presença de oxigênio livre. Dentre os principais tratamentos de natureza aeróbia destaca-se o processo de lodos ativados, que recebe esse nome devido à formação de massa microbiana floculenta conhecida por floco biológico (METCALF; EDDY, 2003). O princípio desse processo consiste no fornecimento de oxigênio aos microrganismos, principalmente bactérias e protozoários, para que degradem a matéria orgânica dissolvida ou em suspensão, transformando-a em CO_2 (VON SPERLING, 1997).

O sistema de lodos ativados geralmente é caracterizado por três etapas (Figura 1) (JÖRDENING, 2005; VON SPERLING, 1997):

- Aeração: realizada no tanque de aeração equipado com aeradores mecânicos ou difusores alimentados por compressores de ar ou

sistemas de oxigênio puro: fornecer oxigênio ao licor (mistura de microrganismos e efluente) na concentração necessária (1,5 – 2,0 mg O₂ dissolvido/L) para manter o metabolismo dos microrganismos aeróbios, bem como manter a homogeneidade do sistema;

- Decantação: um decantador secundário recebe o licor do tanque de aeração e permite que ocorra a decantação natural da biomassa floculenta (lodo) devido à densidade alcançada pelo crescimento desses flocos. Como consequência da separação dos flocos biológicos, o sobrenadante pode ser descartado como efluente tratado no corpo hídrico receptor (rios, lagoas), já com sua carga orgânica reduzida e isento de biomassa;
- Recirculação: bombas de recirculação enviam a biomassa floculenta decantada ao tanque de aeração a fim de manter a concentração de microrganismos dentro de certa proporção em relação à carga orgânica do efluente para que a ação depuradora continue. O crescimento da biomassa é contínuo, ocorrendo a necessidade de um descarte periódico de quantidades definidas de biomassa.

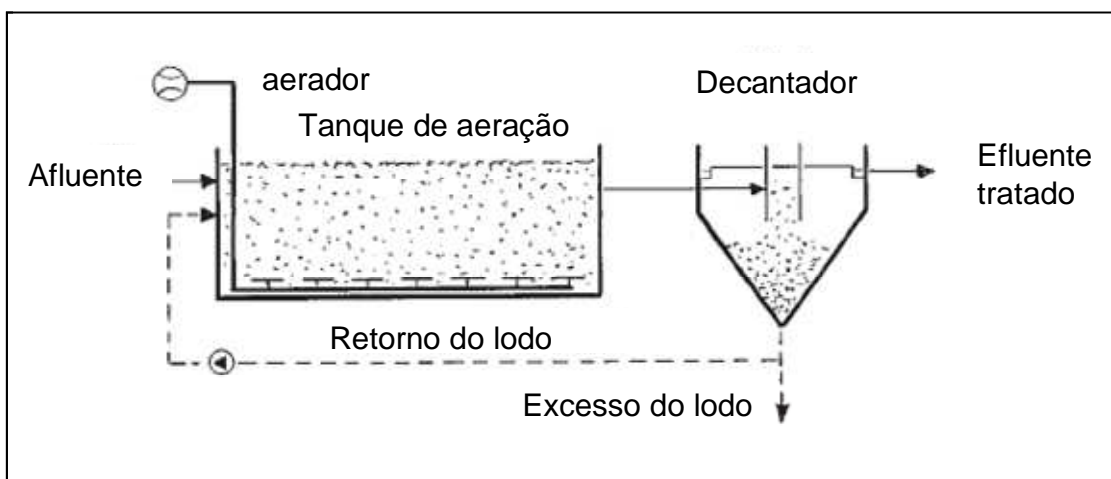


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE UMA PLANTA DO PROCESSO DE LODOS ATIVADOS. Fonte: Jördening (2005).

2.3.2.2 Formação do floco biológico no processo de lodos ativados

A eficiência do processo de lodos ativados depende da formação de flocos biológicos compactos e rapidamente sedimentáveis. Os mecanismos de floculação ainda são pobremente entendidos. No entanto, já se sabe que esses aglomerados são constituídos predominantemente de bactérias e secundariamente por protozoários, que são mantidos agregados devido aos polímeros extracelulares (Figura 2). Além dos polímeros, que podem ser exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos provenientes principalmente do metabolismo e lise de bactérias e protozoários, bem como do próprio efluente, também estão presentes nos flocos (GRADY; DAIGGER; LIM, 1999; VON SPERLING, 1996).

A estrutura do floco é subdividida em dois níveis: a microestrutura e a macroestrutura. A microestrutura, formada por agregados de bactérias formadoras do floco, é a base do floco e resulta em flocos relativamente fracos que podem ser quebrados por uma fraca turbulência. A resistência e o tamanho do floco são dependentes da macroestrutura constituída por bactérias filamentosas. Portanto, a formação do floco ideal (denso e compacto) depende do balanço ente os microrganismos filamentosos e os microrganismos formadores do floco (GRADY; DAIGGER; LIM, 1999; VON SPERLING, 1996).

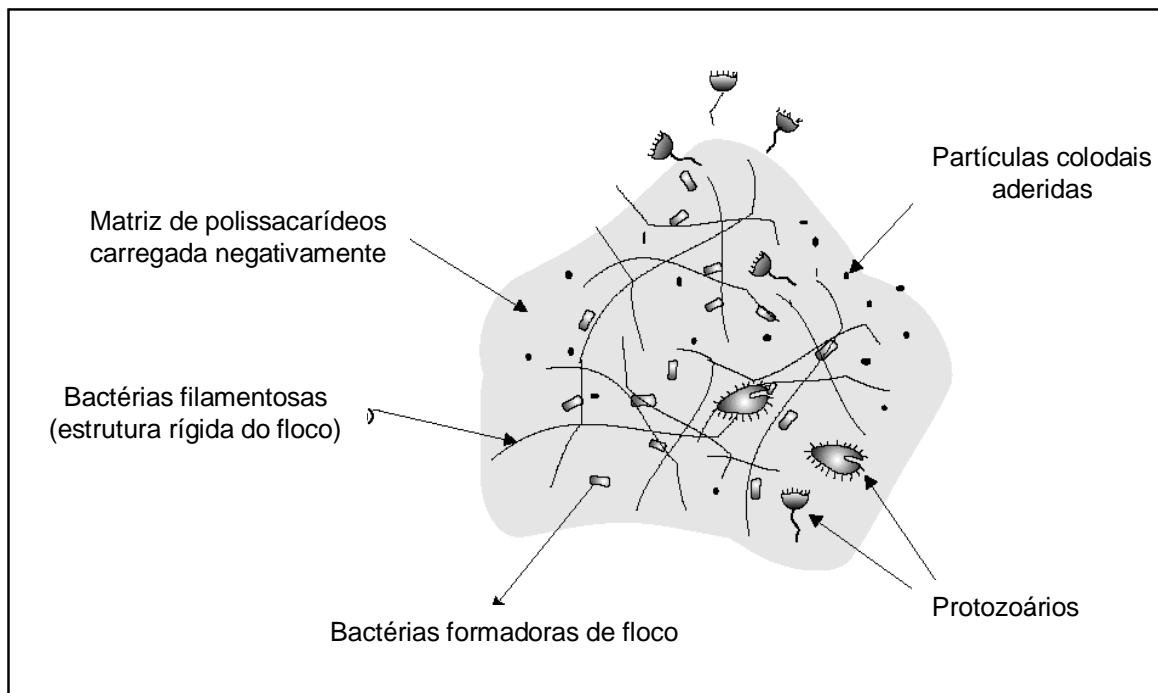


FIGURA 2 – COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE UM FLOCO DE LODOS ATIVADOS. Fonte: Von Sperling (1997)

Dentro da hierarquia da estrutura do floco, as bactérias são consideradas decompositores primários que degradam os substratos orgânicos complexos. A partir desses decompositores, vive uma fauna de consumidores primários, os protozoários, cuja função é clarificar o efluente, reduzindo sua turbidez através da predação de bactérias, da matéria orgânica particulada, de fungos e de outros protozoários. Além dos protozoários, existem os microrganismos conhecidos como micrometazoários (rotíferos, nematóides e anelídeos) que se alimentam de matéria orgânica particulada, bactérias mortas, protozoários e fragmentos de flocos. Os fungos não são muito freqüentes em sistemas de lodos ativados, sendo o aparecimento normalmente favorecido por determinadas condições do meio, como baixos valores de pH, despejo rico em carboidratos e deficiência de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (JENKIS; RICHARD; DAIGGER, 1993).

A manutenção da estrutura do floco biológico depende da força iônica e de cátions divalentes presentes no meio. As bactérias e os polímeros

extracelulares são carregados negativamente e, conseqüentemente, a força iônica deve ser suficientemente grande para permitir a aproximação das células e dos polímeros. O aumento na força iônica é obtido pela presença de cátions divalentes, como cálcio e magnésio (SCHRIVER *et al.*, 2008). Em relação à agregação celular por hidrofobicidade, poucos estudos foram feitos, mas existe o reconhecimento da sua importância no processo de floculação (URBAIN; BLOCK; MANEN, 1993).

2.3.2.3 Condições operacionais desfavoráveis no sistema de lodos ativados gerados pela presença de lipídeos

A remoção dos lipídeos de efluentes agroindustriais tem por finalidade evitar a obstrução dos coletores e a aderência em equipamentos, bem como o acúmulo nas unidades de tratamento, que gera odores e aspectos desagradáveis nos corpos hídricos receptores (JORDÃO; PESSÔA, 1995). Além disso, a remoção destes compostos visa impedir o dano ambiental, pois os lipídeos dos efluentes agroindustriais descartados nos corpos hídricos formam filmes de óleo nas superfícies aquáticas que impedem a difusão de oxigênio do ar neste meio e, conseqüentemente, promovem a extinção da vida aquática aeróbia (MONGKOLTHANARUK; DHARMSTHITI, 2002).

Os processos de tratamentos biológicos clássicos empregados não apresentam desempenho satisfatório em efluentes com alto teor de lipídeos, tanto por não serem específicos para remoção desse tipo de matéria orgânica, como pela própria interferência negativa da gordura, pois os lipídeos possuem baixa biodegradabilidade, devido as suas propriedades físico-químicas, como insolubilidade em água e solidificação ou semi-solidificação à temperatura ambiente (LEFEBVRE; PAUL; MAURET, 1998).

Com o objetivo de resolver a limitação física dos lipídeos frente ao tratamento biológico, Becker *et al.* (1999) estudaram a degradação termofílica (65°C) e aeróbia do óleo de oliva utilizando a cultura pura de *Bacillus*

termoleovorans IHI – 91. Eles observaram uma remoção acima de 90% da concentração inicial de óleo (2 g/L) após 2 h de retenção em reator de operação contínua. Em experimentos subseqüentes, o efluente de indústria de tratamento de lã, contendo de 15 a 20 g/L de lipídeos, foi tratado nas mesmas condições com o mesmo microrganismo. No entanto, a remoção foi de apenas 20 – 25%, com tempo de residência de 10 h. Para os autores, os resultados de remoção de lipídeos com o efluente real foram menores do que com o óleo de oliva devido à presença de interferentes no efluente, como salinidade, compostos tóxicos (metais pesados e pesticidas). Mesmo assim, a eficiência da operação em condições termofílicas (65°C) foi superior à do tratamento realizado em condições mesofílicas (25°C – 30°C), cuja remoção foi em torno de 14,4% com um tempo de retenção de aproximadamente 7,5 dias.

Outro método para aumentar a solubilidade de lipídeos em efluentes é o método da saponificação, estudado por Lefebvre; Paul e Mauret (1998). Nesse trabalho, os lipídeos foram saponificados com sais de potássio e os produtos da reação de saponificação foram diluídos com água até a obtenção das concentrações de lipídeos desejadas (0 – 4 g/L). O efluente foi tratado sob condições aeróbias, usando lodos ativados como inóculo. A degradação de lipídeos, cuja concentração inicial era 3,5 g/L, começou logo que os lipídeos saponificados foram misturados com o lodo e continuou até a concentração de lipídeos atingir o valor de 0,9 g/L depois de 2 a 3 h de tratamento. No entanto, o inconveniente da saponificação é a dependência em relação ao pH do meio, pois ácidos graxos saponificados são relativamente instáveis em valores de pH inferiores a 7,0, o que acarreta em diminuição da sua solubilidade.

Mesmo apresentando uma limitação física, os lipídeos ainda são considerados cargas orgânicas biodegradáveis no tratamento aeróbio. A remoção de lipídeos por lodos ativados pode ser devida, em parte, ao processo metabólico, mas em contrapartida sabe-se que ocorre uma adsorção desse tipo de matéria orgânica no lodo, o que conduz a uma remoção “aparente” de matéria orgânica. Conseqüentemente, a gordura aderida ao lodo pode dificultar o seu processo de sedimentação natural, além de reduzir a transferência de

oxigênio para os microrganismos, gerando queda na atividade microbiológica (CHIPASA; MEĐRZYCKA, 2006).

Além disso, a presença de lipídeos no efluente parece estar associada com dois fenômenos microbiológicos que provocam disfunções no tratamento aeróbio, conhecidos por *bulking* filamentoso ou intumescimento do lodo e *foaming* filamentoso ou espuma biológica. O intumescimento do lodo é caracterizado pela formação de flocos de malha larga ou pontes entre os flocos, devido ao crescimento exacerbado de bactérias filamentosas, gerando assim um lodo volumoso, leve e conseqüentemente com baixa sedimentabilidade (DONKIN, 1997). Há uma grande diversidade de microrganismos que podem originar este fenômeno (EIKELBOON, 1975), mas as causas são parcialmente conhecidas e atribuídas ao baixo teor de oxigênio, à baixa relação alimento/microrganismo (A/M) ou à alta carga orgânica biodegradável. O teor de lipídeos no efluente pode favorecer o intumescimento devido à formação de filme lipídico na interface de aeração do sistema ar/oxigênio, que gera uma diminuição de transferência de oxigênio e substratos para o lodo, ocasionando a proliferação de determinados microrganismos filamentosos (VON SPERLING, 1996; JENKIS; RICHARD; DAIGGER, 1993).

A ocorrência da espuma biológica na superfície do tanque de aeração e decantador deve-se também ao crescimento excessivo de bactérias filamentosas. Essa condição é causada por bactérias do gênero *Nocardia* e pela espécie *Microthrix parvicella*. As causas da ocorrência de espuma biológica também não são totalmente conhecidas, mas parecem envolver a hidrofobicidade associada aos lipídeos da parede celular destes dois microrganismos, que causariam a flutuação dos flocos quando sujeitos a arejamento, bem como o metabolismo acelerado desses microrganismos frente aos compostos lipídicos (TSANG; CHUA, 2008; GRADY; DAIGGER; LIM, 1999; PUJOL *et al.*, 1991).

2.3.2.4 Processo anaeróbio

A digestão anaeróbia é um processo complexo, composto por várias reações seqüenciais, cada uma com sua população bacteriana específica. A conversão da matéria orgânica em metano e compostos inorgânicos como amônia e dióxido de carbono possui quatro etapas (Figura 3) (CAMPOS, 1999; CHERNICHARO, 2007:

(1) hidrólise: o material orgânico complexo é convertido em compostos dissolvidos de menor massa molar pela ação de enzimas extracelulares (lipases, proteases, amilases) produzidas por bactérias fermentativas (*Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, entre outras);

(2) acidogênese: os compostos dissolvidos gerados na hidrólise são absorvidos por bactérias fermentativas acidogênicas e excretados como substâncias orgânicas simples como ácidos graxos voláteis (AGV), alcoóis, ácido láctico e compostos minerais como CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S .

(3) acetogênese: ocorre a conversão dos produtos da acidogênese em compostos que formam os substratos para produção do CH_4 : acetato, H_2 e CO_2 . Nessa etapa atuam as bactérias acetogênicas facultativas e anaeróbias obrigatórias;

(4) metanogênese: substâncias simples são convertidas nos produtos finais mais simples CH_4 e CO_2 . O metano é produzido pelas arqueias acetotróficas ou acetoclásticas a partir da redução de ácido acético, ou pelas arqueias hidrogenotróficas, a partir da redução do dióxido de carbono. As arqueias que produzem metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono crescem mais rapidamente do que aquelas que usam ácido acético, de modo que as metanogênicas acetotróficas geralmente limitam a velocidade de transformação de material orgânico complexo.

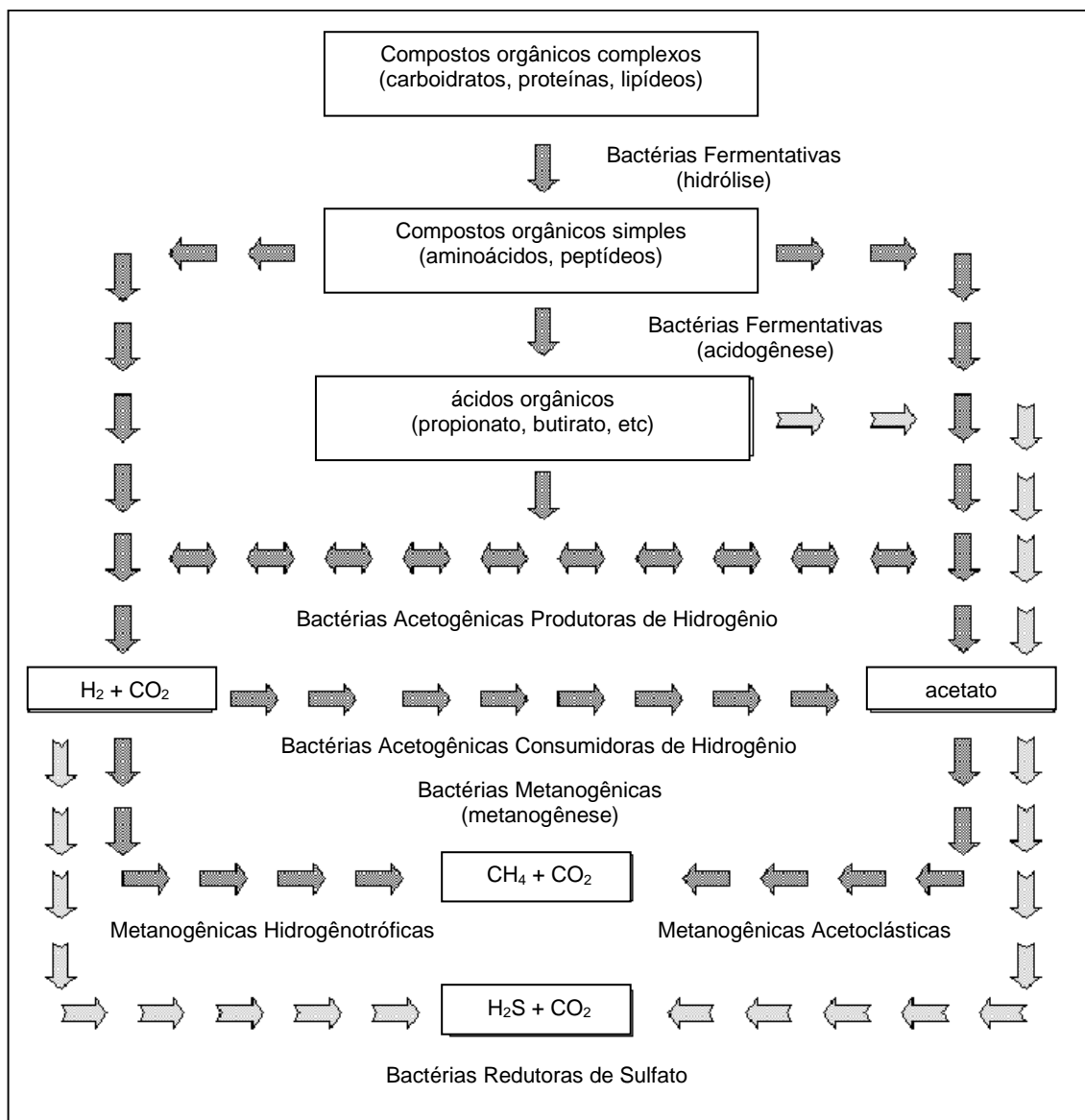


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA AÇÃO DOS GRUPOS DE BACTÉRIAS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA MATÉRIA ORGÂNICA Fonte: Chernicaró (1997)

Existem dois tipos de limitações associadas com a degradação anaeróbia de lipídeos: limitações físicas e metabólicas. As primeiras relacionam-se com o acúmulo de lipídeos e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) nos agregados de biomassa, tornando-os leves, flutuantes e sujeitos ao arraste para fora do digestor anaeróbio. Para Hwu *et al.* (1998), a adsorção de AGCL no lodo seria um pré-requisito para sua biodegradação. Entretanto, a

adsorção excessiva pode provocar principalmente a flotação do lodo e isso seria a principal causa da deterioração do sistema anaeróbio.

Os problemas metabólicos baseiam-se na inibição da atividade metanogênica pelos AGCL. A degradação desses ácidos é feita pela via da β -oxidação por bactérias acetogênicas, produzindo acetato e hidrogênio, os quais são convertidos em metano e CO_2 . No entanto, as reações de β -oxidação só são termodinamicamente favoráveis se a pressão parcial de hidrogênio for mantida em níveis baixos, inferiores a 10^{-4} atm, o que é conseguido por associação com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetotróficas. Além disso, os ácidos graxos saturados de cadeia longa (C12 – C14) e os ácidos graxos insaturados são reportados como inibidores de vários microrganismos, principalmente as arqueias metanogênicas que removem o hidrogênio (DEMIREL; YENIGUN; ONAY, 2005; MENDES *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2000). Esses ácidos parecem ser tóxicos para esses microrganismos através de alterações na parede celular (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; ALVES *et al.*, 2001).

Petry e Lettinga (1997) mostraram a baixa digestibilidade anaeróbia dos lipídeos através do tratamento de uma emulsão de gordura de leite em reator EGSB (*expanded granular sludge bed*). Os resultados mostraram que 70% dos lipídeos foram adsorvidos no lodo após 24 h de tratamento, e depois de 26 dias 22% de DQO, representados pela gordura do leite, foram convertidos em metano. Em outro trabalho realizado com efluente de laticínios contendo 250 mg/L de lipídeos e tratado em reator anaeróbio, verificou-se que a queda na produção de metano (25% em relação ao efluente sem lipídeos), bem como na concentração de ATP, de 2,5 vezes comparado com o efluente sem adição de lipídeos, foi devida aos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) resultantes da lipólise da gordura (PERLE; CHIMKIE; SHELEF, 1995).

2.4 BIOAUMENTAÇÃO E BIOESTIMULAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Na busca por aumentar a biodegradabilidade dos lipídeos de efluentes, estudos relacionados ao uso direto de microrganismos degradadores e removedores de gordura, bem como o emprego de enzimas com função catalítica de hidrólise de lipídeos, vêm sendo amplamente realizados. A suplementação com microrganismos ou com preparados enzimáticos aos sistemas biológicos de tratamento recebe o nome de bioaumentação e biestimulação, respectivamente (CHIPASA; MĘDRZYCKA, 2006; IWAMOTO; NASU, 2001).

A aplicação do método de bioaumentação com microrganismos no tratamento de efluente com alta carga lipídica é altamente defendido por Chipasa e Mędrzycka (2006). Os autores justificam que o uso de microrganismos favorece a hidrólise e o consumo da gordura, tendo como produtos apenas CO₂ e água, enquanto que o uso de preparados enzimáticos seria uma solução parcial do problema, pois apenas teria a função de hidrolisar a gordura. Outra vantagem dos microrganismos seria a elevada tolerância em relação às variações nas condições ambientais, o que não seria conseguido com preparados enzimáticos.

Ao contrário de Chipasa e Mędrzycka (2006), Karam e Nicell (1997) defendem a utilização direta de enzimas no tratamento de efluentes agroindustriais como uma possível alternativa aos métodos físico-químicos e como coadjuvantes aos sistemas biológicos convencionais. Para os autores, as vantagens oferecidas pelo uso dos catalisadores biológicos no tratamento de efluentes seriam as seguintes: simplicidade e facilidade no controle do processo, não há geração de biomassa e conseqüentemente não há o requerimento de aclimatação; não há efeitos de choque de carga de poluentes, pois enzimas podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes, operam em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade e podem atuar em poluentes específicos.

Devido a essas vantagens, os processos enzimáticos correspondem a uma das mais interessantes tecnologias para o tratamento de efluentes e dentro desse contexto a ação das lipases sobre lipídeos do efluente tem sido estudada (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007; ROSA; CAMMAROTA; FREIRE, 2006; CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001). No entanto, a principal desvantagem desse processo é o custo de produção da enzima. Uma alternativa econômica de produção de lipases seria o emprego do processo fermentativo no estado sólido (FES), no qual resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato para cultivo de microrganismos e produção de enzimas lipolíticas.

2.4.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis produzindo diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, glicerol e ácidos graxos. No entanto, em ambientes aquo-restritos essa enzima catalisa diversas reações como esterificação, transesterificação, interesterificação (alcoólises, acidólises), aminólise e lactonização (Figura 4). A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico (JAEGER; EGGERT, 2002; PANDEY *et al.*, 2004; 1999).

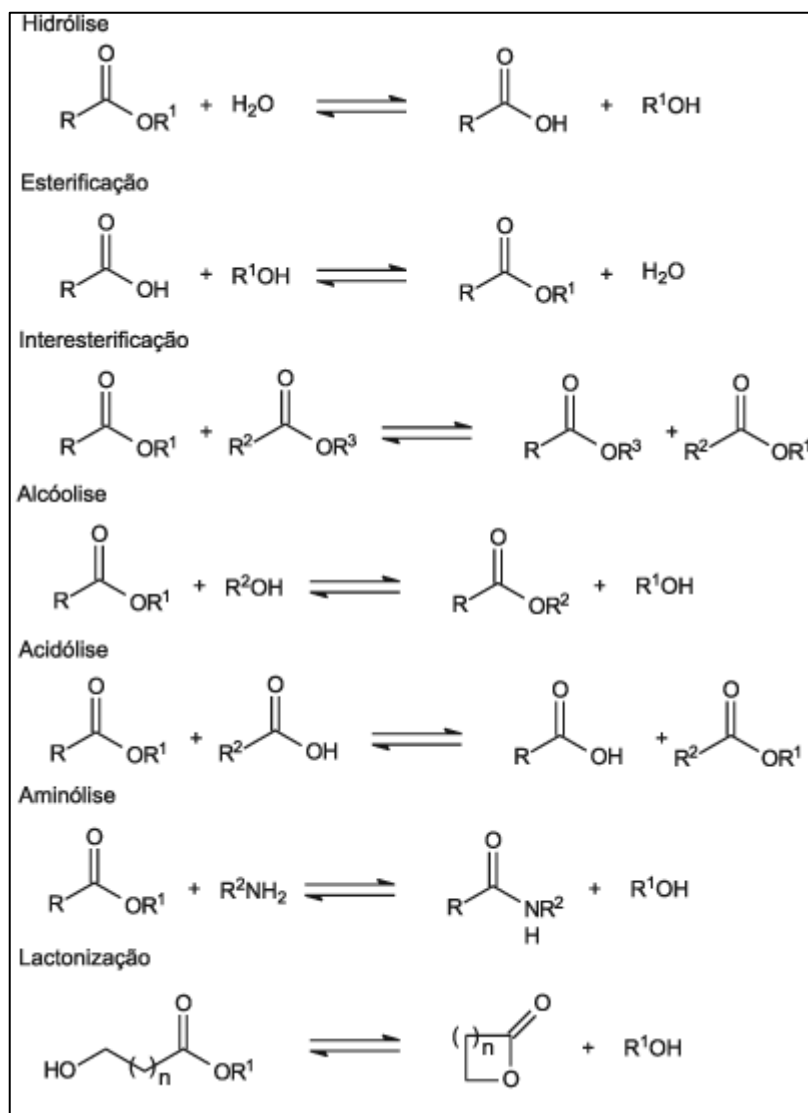


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES. Adaptado de Paques e Macedo (2006)

2.4.1.1 Aspectos estruturais e mecanismo catalítico das lipases

A estrutura tridimensional das lipases de eucariotos e procariotos segue o padrão α/β hidrolase. A região central dessa estrutura é composta por uma folha β pregueada formada por mais de oito segmentos β ($\beta 1 - \beta 8$) conectados por seis α -hélices (BORNSCHEUER, 2002; JAEGER, DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER e REETZ, 1998).

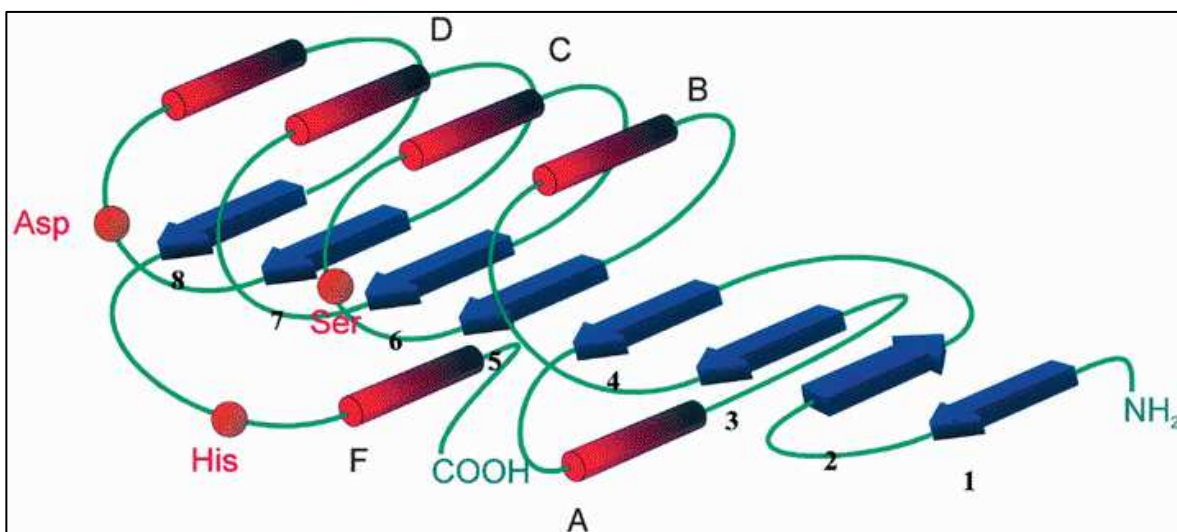


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE

As folhas β são representadas pelas setas azuis (1 – 8) e as α -hélices pelos bastões vermelhos (A – F). Os resíduos que formam a tríade catalítica estão representados pelas esferas vermelhas. Fonte: BORNSCHEUER (2002).

O sítio catalítico das lipases, localizado no sentido C-terminal da estrutura β , é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato) (BRADY *et al.*, 1990). Em muitas estruturas de lipases, essa tríade está protegida por uma cadeia peptídica hidrofóbica denominada *lid* ou tampa, na qual o resíduo de aminoácido histidina da tríade está inserido (JAEGER; REETZ, 1998) (Figuras 5 e 6). A função da tampa hidrofóbica seria permitir o acesso do substrato ao sítio catalítico através do fenômeno de ativação interfacial. A interação entre a tampa hidrofóbica e uma interface de lipídeos e água provoca uma alteração conformacional na estrutura da enzima, que por sua vez promove a abertura da tampa, e conseqüentemente à exposição do sítio ativo (ALLOULOU *et al.*, 2006; VERGER, 1997; DODSON, LAWSON; WINKLER, 1992). Porém, a presença da *lid* e a ativação interfacial não são características para a atividade catalítica de todas as lipases. A cutinase de *Fusarium solani*, bem como a fosfolipase de pâncreas de porco, não possuem tampa e não precisam da interface para exercer sua atividade catalítica (LONGHI; CAMBILLAU, 1999; SCHRAG;

CYGLER, 1997; HJORTH *et al.*, 1993). As lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B possuem tampa, porém não sofrem ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998).

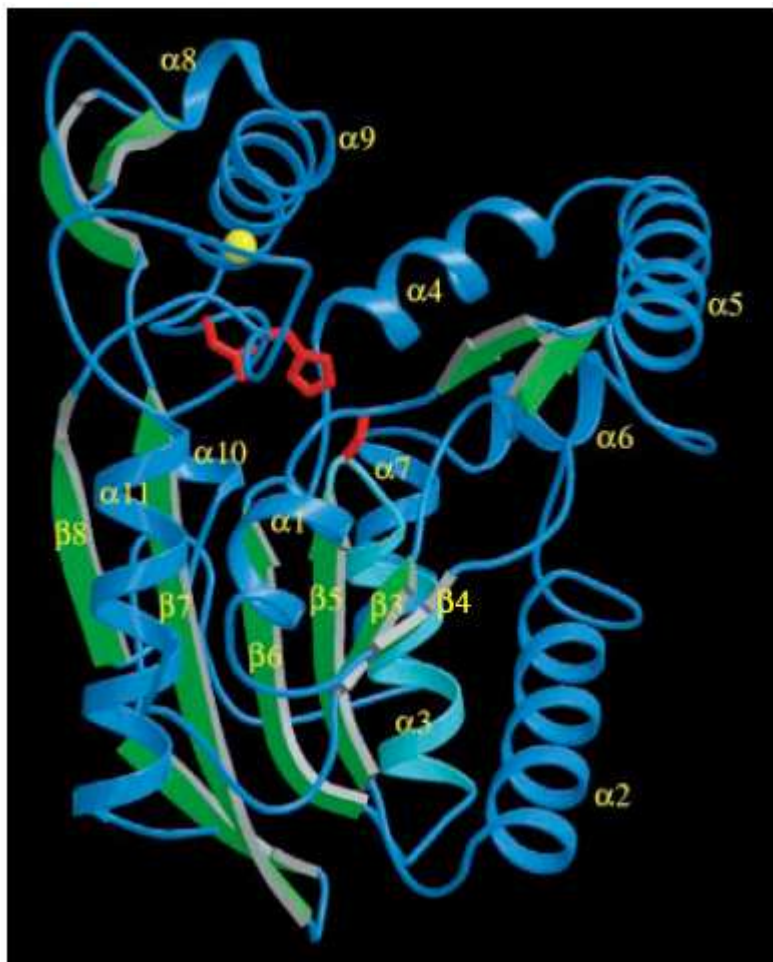


FIGURA 6 – MODELO TRIDIMENSIONAL DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia*

As folhas β são representadas pelas setas verdes e as α -hélices pelas hélices azuis. As cadeias laterais dos resíduos que formam a tríade catalítica são mostradas em vermelho. Fonte: SCHRAG; CYGLER (1997).

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta, com cadeia com menos de dez átomos de carbono são reconhecidas como esterases - carboxil

éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (BORNSCHEUER, 2002; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; VERGER *et al.*, 1997).

O mecanismo catalítico de reações de hidrólise ou síntese de ésteres catalisadas pelas lipases é baseado no mecanismo proposto para proteases, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo destas enzimas (presença da tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu). Os mecanismos envolvidos na catálise de serina hidrolases que foram inicialmente propostos por Brady *et al.* (1990) estão ilustrados na Figura 7.

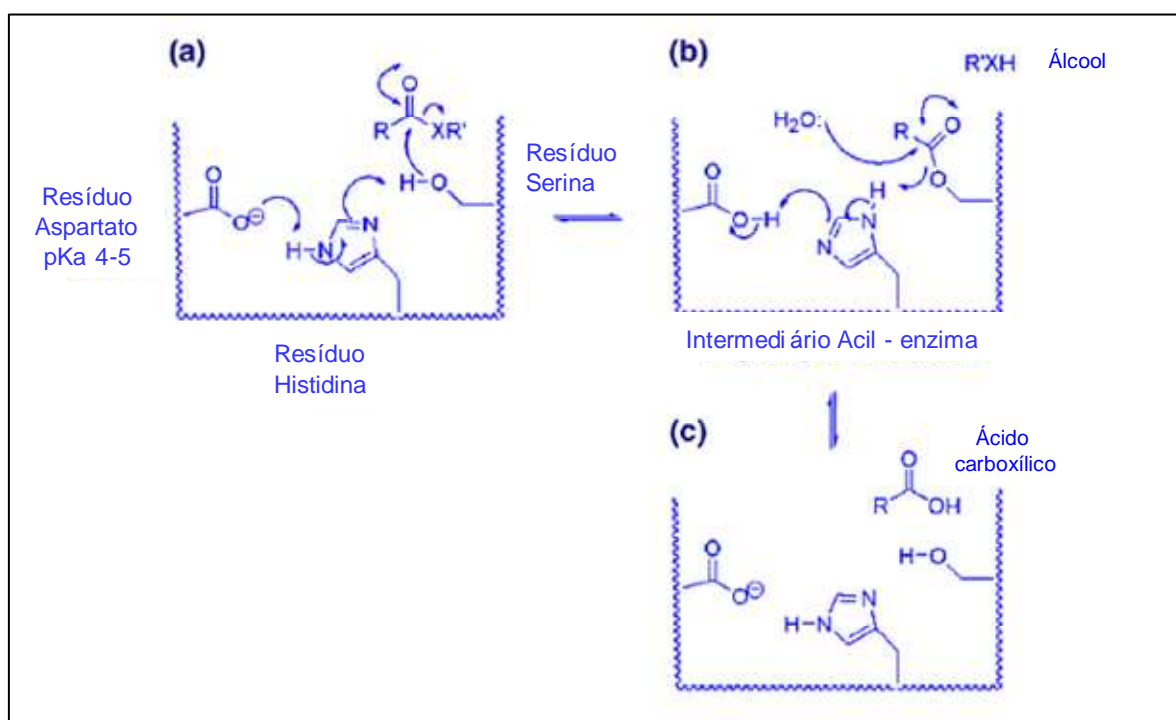


FIGURA 7 – MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES. Adaptado de REIS *et al.* (2009).

(a) O esquema representa a reação entre a hidroxila da serina e a carbonila eletrofílica do éster. As flechas curvas indicam o deslocamento do par eletrônico. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados (Serina, Aspartato e Histidina). Na estrutura do substrato, R representa uma cadeia carbônica genérica, X um elemento genérico, que no caso de ésteres, é oxigênio e R' uma segunda cadeia carbônica genérica. (b) O esquema mostra a formação do intermediário enzima-acila que é hidrolisado na presença de água e regenera o sítio ativo com liberação do álcool como produto final como mostrado em (c).

A primeira etapa consiste da desprotonação da serina, mecanismo no qual os resíduos histidina e aspartato são requeridos (Figura 7a).

Conseqüentemente, a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina aumenta e ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico do substrato, formando um intermediário enzima acilado, o qual é estabilizado pelos resíduos catalíticos de histidina e aspartato, com a liberação de álcool do lipídeo (Figura 7b). A presença de uma fenda oxiânion contribui para a estabilização da distribuição de cargas e para redução do estado de energia fundamental do intermediário tetraédrico. Na última etapa, denominada por deacilação (Figura 7c), um nucleófilo (água ou monoglicerídeo) ataca a enzima acilada, provocando a liberação do produto (ácido graxo), e a conseqüente regeneração do sítio catalítico da enzima.

2.4.1.2 Fontes de lipases e suas características bioquímicas

As lipases estão comumente presentes em vegetais, como a mamona (*Ricinus communis*), canola (*Brassica napus*) e mamão (*Carica papaya*), em animais (pâncreas de porco) e em microrganismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; PANDEY *et al.*, 1999). Os microrganismos são considerados excelentes produtores de enzimas em relação às plantas e animais, pois possuem alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação de cultivo (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER *et al.*, 1994). Dentre os microrganismos produtores de lipases, destacam-se os seguintes gêneros (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001): bactérias - *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*; fungos - *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Beauveria*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium*; leveduras - *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Toulospora* e *Trichosporon*.

As características bioquímicas das lipases microbianas dependem da fonte de obtenção da enzima (Tabela 2).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LIPASES MICROBIANAS

Microrganismo	pH*	pH estabilidade	Temperatura (°C)*	Temperatura estabilidade (°C)	Ref.
	8,5	-	30	-	Essamri; Deyris e Comeau (1998)
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,5	4,5 - 7,5	35	45	Hiol <i>et al.</i> (2000)
	8	5 - 8	37	-	Salah <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	7,5	-	40	50	Diaz <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus chinensis</i>	8,0 - 8,5	5,5 - 7,0	40	30 - 50	Sun; Xu e Wang (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	7	4,0 - 10	37	4 - 50	Kamini; Mala e Puvana-krishnan (1998)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	8,0	6,0 - 9,0	60	37 - 50	Lima <i>et al.</i> (2004)
<i>Penicillium cyclopium</i>	7	4,5 - 7,0	40	25 - 40	Chahinian <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus sp</i>	8,7	-	-	70 - 85	Janssen; Monk e Morgan (1994)
	9,5	-	60	75	Wang <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	9 - 10	5 - 11	60 - 65	30 - 60	Kim <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	7,5	-	70 - 75	60 - 70	Lee <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus sp RS-12</i>	8	-	50 - 55	65 - 75	Sidhu <i>et al.</i> (1998)
Gênero <i>Pseudomonas</i>	5,5 - 9,5	2 - 12	22 - 80	35 - 70	Gilbert (1993)

(*) Melhores valores de pH e temperatura para ação de lipases de diferentes microrganismos

(-) não especificado no trabalho

Conforme mostrado na Tabela 2, existem lipases ativas em valores de pH na faixa de 2 a 12 e em temperaturas variando desde 4 até 85°C. A termoestabilidade de lipases é relacionada com sua estrutura (ZHU *et al.*, 2001) e pode atingir valores acima de 70°C. Uma das mais notáveis enzimas termoestáveis foi isolada por Wang *et al.* (1995) de uma cepa de *Bacillus sp.* Esta enzima possuía máxima atividade a 60°C e retinha 100% da sua atividade original após incubação de 30 min a 75°C e meia-vida de 8 h na mesma temperatura. Outro *Bacillus sp* termófilo estudado por Janssen; Monk e Morgan (1994), apresentou lipases com meia-vida de 60 min a 70°C e de 12 min a 85°C.

As lipases dos fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus*, cuja espécie *R. microsporus* foi utilizada neste trabalho, são mais ativas na faixa de pH entre 7,5 a 8,5 e nas temperaturas de 30°C a 40°C. Os seus pontos isoelétricos (pI) variam de 7,1 a 8,6, são estáveis em temperaturas de 50°C e em valores de pH entre 4,5 e 8,0 (Tabela 2). Quanto a especificidade, as enzimas desses fungos são altamente 1,3-específicas na hidrólise e esterificação de glicerídeos (SUN; XU; WANG, 2009; DIAZ *et al.*, 2006; UL-HAQ; IDRESS; RAJOKA, 2002; HIOL *et al.*, 2000; ESSAMRI; DEYRIS; COMEAU, 1998).

2.4.1.3 Aplicações de lipases

As inúmeras aplicações industriais das lipases microbianas são decorrentes da versatilidade inerente às propriedades desta enzima. As lipases podem catalisar uma gama de reações, não precisam de cofatores, atuam em amplas faixas de pH e temperatura, possuem estabilidade em solventes orgânicos, e alta enantioselectividade (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006, HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). A seguir serão destacadas algumas aplicações industriais de lipases e outras potenciais aplicações descritas na literatura.

Devido à habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases são utilizadas como aditivos nas formulações de detergentes. Para isso, as enzimas são selecionadas a fim de satisfazer as seguintes exigências: ter baixa especificidade em relação ao substrato, isto é, uma habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições, habilidade de suportar as condições de lavagem relativamente severas (pH 10-11, 30 – 60°C) e habilidade de resistir a surfactantes e a enzimas como proteases, que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a lipolase (Novozyme, Dinamarca), originada do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae*, lumafast (Genencor, USA) e lipomax (Gist-Brocades, Holanda), lipases oriundas de *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas alcaligenes* (JAEGER, REETZ, 1998).

As lipases permitem a modificação e substituição de um ou mais ácidos graxos, obtendo-se produtos com alto valor agregado, os chamados lipídeos estruturados (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Como exemplo dessa aplicação, cita-se a modificação da gordura de alimentos para bebês por lipases. O principal triacilglicerídeo do leite materno é insaturado nas posições *sn*-1, 3 e saturado na posição *sn*-2, sendo o ácido palmítico o maior representante dessa posição. A ligação do ácido palmítico nessa posição é de extrema importância no processo de absorção do leite. Durante a digestão, as lipases pancreáticas hidrolisam especificamente ácidos graxos nas posições *sn*-1, 3, produzindo monoacilglicerol com ácido palmítico na posição *sn*-2. Este composto é absorvido mais rapidamente quando comparado com o ácido palmítico livre, pois este se liga ao cálcio, gerando compostos pouco solúveis que provocam a constipação intestinal em bebês. A gordura da maioria dos alimentos comercializados para crianças vem de fontes vegetais, que tem ácido graxo insaturado na posição *sn*-2 do triacilglicerídeo. Modificações de triacilglicerídeos por lipases aumentam a proporção de ácido palmítico na posição *sn*-2, melhorando a capacidade de absorção em bebês (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Na indústria de laticínios, as lipases são largamente utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores. No processo de fabricação de queijos, a gordura do leite é hidrolisada e libera ácidos graxos que contribuem diretamente no aroma e agem como precursoras para metil cetonas, alcoóis secundários e ésteres alifáticos e aromáticos. A adição de lipase exógena acelera o processo de maturação. Entretanto, a adição de lipases livres ao processo pode conduzir à lipólise excessiva, resultando em problemas na textura e no sabor. Para solucionar esse problema, as enzimas são encapsuladas para que ocorra uma liberação controlada para o substrato. O uso de uma mistura de enzimas encapsuladas contendo a lipase palatase M (Novozymes, Dinamarca) e protease resulta em um queijo com sabor e aroma típicos e agradáveis, e sem gosto amargo, após 90 dias de maturação (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

No campo farmacêutico, uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. O ibuprofeno [ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propiônico] é um exemplo interessante de medicamento, pois na sua mistura racêmica, a forma *S* do ibuprofeno é 160 vezes mais ativa que a forma *R* na síntese de prostaglandina *in vitro*. Uma forma simples de obter a forma (*S*)-ativa presente na mistura racêmica do fármaco é realizar a reação de esterificação utilizando lipase que apresente enantiosseletividade para a forma (*R*)-ibuprofeno. Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (*R*)-éster, discriminando o (*S*)-ibuprofeno da mistura racêmica. Posteriormente, o ácido discriminado, (*S*)-ibuprofeno, pode ser separado do meio de reação reagindo-o com uma base forte em meio aquoso (CARVALHO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 1995; MUSTRANTA, 1992).

2.4.1.4 Produção de lipases por Fermentação no Estado Sólido

As lipases podem ser produzidas por fermentação submersa (FS) e fermentação no estado sólido (FES). A principal diferença entre estas duas técnicas de cultivo está na quantidade de água livre presente no meio de cultura. Na FS, a quantidade de sólidos não ultrapassa 50 g/L, enquanto na FES o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% do peso total. Portanto, a FES é definida pela ausência ou quase ausência de água livre nos espaços entre as partículas sólidas (MITCHELL *et al.*, 2006; 2004, MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a).

A baixa disponibilidade de água na FES é mais adequada para o crescimento de fungos filamentosos do que para bactérias e leveduras. A forma de crescimento e a fisiologia dos fungos favorecem a sua adaptação no ambiente aquo-restrito, pois, devido à formação e extensão apical de hifas, os fungos podem explorar uma maior área para sua sobrevivência. Além disso, o crescimento das hifas confere ao fungo a habilidade em penetrar, via sistema mecânico e enzimático, nos substratos sólidos e, conseqüentemente, absorver nutrientes (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a, RAIMBAULT, 1998).

Como na FS, a eficiência da FES depende dos parâmetros pH, temperatura, aeração e do tipo de substrato. No entanto, dentre os parâmetros supracitados, a umidade é um fator crítico na viabilidade do processo, pois o aumento ou diminuição do conteúdo de água no meio sólido pode afetar o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção de metabólitos. Altos níveis de umidade resultam em baixa porosidade, que, por sua vez, restringe a difusão de gases entre as partículas do sólido. Além disso, o elevado conteúdo de água pode lixiviar nutrientes solúveis das partículas do substrato. Por outro lado, os baixos níveis de umidade podem favorecer a produção de metabólitos inibitórios que limitam o crescimento do microrganismo e diminuem o acesso aos nutrientes pelo fungo (SINGHANIA *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2006).

Outro fator chave e característico da FES é o substrato. Os substratos utilizados na FES podem servir como suporte e como fonte de nutrientes (rejeitos industriais) ou apenas suportes inertes (por exemplo, espuma de poliuretano) suplementados com meio rico em nutrientes (YANG *et al.*, 2005). A seleção dos substratos para o processo de FES depende da sua composição química e a manutenção desse substrato com a mesma composição durante o trabalho desenvolvido, pois a produção do metabólito de interesse não pode ser prejudicada pela perda da homogeneidade do substrato (MITCHELL *et al.*, 2006).

Além da composição e da manutenção das características químicas, uma das mais importantes propriedades físicas do substrato para a eficiência do processo de FES é o tamanho de suas partículas. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido e, conseqüentemente, impede a difusão de gases no meio. Contrariamente, partículas grandes favorecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo. Portanto, o tamanho ideal da partícula deve representar um compromisso entre a acessibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (MITCHELL *et al.*, 2006; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a, PANDEY *et al.*, 1999).

Cabe ressaltar que a importância do substrato não se restringe às suas propriedades físicas e químicas para a FES. Em uma visão mais ampla, a origem do substrato torna-o interessante devido à viabilidade econômica do processo. Nesse tipo de fermentação, resíduos agroindustriais são utilizados como substrato (COUTO; SANROMÁN, 2006; CASTILHO *et al.*, 2000). Considerando que o Brasil é um país economicamente agrícola, o aproveitamento desses rejeitos torna-se de grande interesse, pois são matérias-primas abundantes, de baixo custo e quando não reaproveitadas tornam-se uma fonte de poluição ambiental (ROSA, 2004). Além da origem do substrato, a FES, quando comparada com a FS, apresenta outras vantagens como economia de espaço necessário para fermentação, não requerimento de maquinaria complexa, bem como simplicidade do meio de fermentação e

menor demanda de energia (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003, MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a; MAHADIK *et al.*, 2002).

Castilho *et al.* (2000) realizaram uma análise econômica comparativa dos processos de FS e FES para produção de lipases por *Penicillium restrictum*. Essa análise mostrou que, para uma planta produzindo 100m³ de concentrado de enzima por ano, o processo FS requer um investimento de capital 78% mais alto do que o processo FES, com um custo final do produto 68% maior do que o preço de mercado da enzima. O preço do produto produzido por FES seria 47% menor do que o preço de mercado para uma lipase similar. Esses resultados evidenciam que a FES na produção de enzimas, nesse caso, lipases, é altamente atrativo do ponto de vista econômico.

Apesar das vantagens inerentes a FES, essa tecnologia é ainda pouco utilizada para produção de lipases em grande escala. Tal fato deve-se à carência de estudos sistemáticos em escala de bancada, como, por exemplo, a definição de microrganismos produtores, de substratos adequados e das condições de cultura (HÖLKER; LENZ, 2005). Além disso, a produção em larga escala é dificultada pelos problemas relacionados com a transferência de calor e de massa em biorreatores (DURAND, 2002). Durante a FES, uma grande quantidade de calor é gerada, que é diretamente proporcional à atividade metabólica do microrganismo e devido à baixa condutividade térmica do material sólido, a remoção do calor torna-se lenta. O acúmulo de calor pode afetar o crescimento do microrganismo, a germinação de esporos, a formação do composto de interesse, bem como, pode causar a desnaturação do produto formado (PANDEY, 2003). Convencionalmente, a dissipação do calor em processos de cultivo sólido é ajustada pela aeração. Se a temperatura do sistema é alta, aumenta-se a taxa de aeração para promover o resfriamento do substrato (RHAGAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003). Devido a esses problemas, o escalonamento do processo é um desafio ainda a ser superado. Contudo, vários dos trabalhos gerados nos últimos anos, pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocálise (UFPR) supervisionado pela Professora Nadia Krieger e Laboratório de Fermentação no Estado Sólido

supervisionado pelo Professor David Alexander Mitchell (UFPR), têm apresentado avanços na solução dos problemas de aplicação da FES em escala industrial relacionados à transferência de massa e de energia no interior do leito do biorreator (MITCHELL *et al.*, 2006; 2004, MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a, MITCHELL *et al.*, 2002b, 2002c; VICCINI; MITCHELL; KRIEGER, 2003; VICCINI *et al.*, 2001; HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2002; HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2001, 2000; VON MEIEN e MITCHELL, 2002).

A maioria dos estudos sobre a produção de lipase por bactérias, fungos e leveduras tem sido realizada em FS. A FES tem se tornado um grande atrativo para produção dessa enzima, como de outros produtos de alto valor agregado, devido à utilização de resíduos agroindustriais, bem como à maior produtividade volumétrica obtida (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a). Conforme apresentado na Tabela 3, vários tipos de rejeitos agroindustriais vêm sendo testados na produção de lipases.

Os substratos apresentados na Tabela 3, quando empregados isoladamente, são geralmente suplementados com outra fonte de nutriente ou podem ser utilizados em misturas com substratos de diferentes origens, que podem aumentar a viabilidade econômica do processo. Por exemplo, no trabalho realizado por Mahadik *et al.* (2002), o fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em farelo de trigo umedecido com uma solução contendo NaNO_3 0,05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, KCl 0,05%, KH_2PO_4 0,2%, extrato de levedura 0,1%, peptona 0,5% e óleo de oliva 1% e o valor da atividade lipolítica alcançada foi de 630 U/gSS. Por outro lado, Kamini, Mala e Puvanakrishnan (1999) produziram lipase por meio do cultivo de *Aspergillus niger* apenas em torta de óleo de gergelim e o valor da atividade lipolítica com esse substrato caiu para 363,6 U/gSS. Mala *et al.* (2007) associaram o farelo de trigo e o resíduo agroindustrial torta do óleo de gergelim na proporção 3:1, umedecidos com água, e 3:1 e obtiveram a atividade de 384 U/gSS. Outro exemplo é o cultivo de *Penicillium restrictum* na torta de babaçú (Tabela 3). Azeredo *et al.* (2007) e Gombert *et al.* (1999) empregaram torta de babaçú suplementada com óleo de oliva na proporção de 1% e 2% e alcançaram os valores de 17 U/gSS e 30 U/gSS de atividade lipolítica, respectivamente, enquanto Rosa, Cammarota

e Freire (2006) suplementaram o substrato com melaço 0,75% (m/m), conseguindo uma atividade lipolítica de 32 U/gSS e conseqüentemente aumentaram a viabilidade econômica da produção de lipases, pois substituíram o óleo de oliva por melaço.

TABELA 3 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Microrganismo	Substrato	Tempo de cultivo (h)	Temperatura e umidade (°C/%)	Atividade lipolítica (U/gSS)	Métodos de determinação da atividade	Referência
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e óleo de oliva	12	40/75	1500	Titulométrico Substrato tricaprilina	Diaz <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	120	30/-	630	Espectro fotométrico Substrato pnPP	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
	Farelo de trigo e torta do óleo de gergelim	72	30/62	384	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Mala <i>et al.</i> (2007)
	Torta de óleo de gergelim	72	30/-	364	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Kamini; Mala e Puvanakrishnan (1998)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de milho	72	29/55	108	Espectro fotométrico Substrato pnPP	Fernandes (2007)
<i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e torta de óleo de oliva	24	-	80 e 20	Espectro fotométrico Lowry e Tinsley modificado	Cordova <i>et al.</i> (1998)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Torta de amêndoa	72	30/-	48	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Ul-Haq; Idress e Rajoka (2002)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Farelo de soja	48	27,5/55	40	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Kempka <i>et al.</i> (2008)

U/gSS = unidades de enzima por grama de substrato seco; (-) não especificado no trabalho

TABELA 3 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
(*Continuação*)

<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu	20	35/70	32	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Rosa <i>et al.</i> (2006)
		24	30/70	30	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Gombert <i>et al.</i> (1999)
		24	30/70	17	Titulométrico Substrato óleo de oliva	Azeredo <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Farinha e farelo de trigo	72	30/70	24	Espectro fotométrico Substrato <i>p</i> -nitrofenolato (pnPP)	Sun; Xu e Wang (2009)

U/gSS = unidades de enzima por grama de substrato seco; (-) não especificado no trabalho

Portanto, esses resultados mostram que as características físicas e químicas do substrato determinam a potencialidade na produção do composto de interesse e a associação de diferentes fontes de substratos pode contribuir para a eficiência e viabilidade econômica do processo.

2.4.1.5 Lipases no tratamento de efluentes

Muitos estudos estão sendo realizados para a utilização de lipases no tratamento de efluentes como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais. Resíduos industriais ricos em óleos e materiais graxos provenientes de restaurantes, laticínios e indústrias processadoras de carnes podem ser tratados através do uso de lipases de diferentes origens. Essa seção apresentará os trabalhos de aplicação de lipases comerciais ou obtidas por FES em diferentes tipos de efluentes.

Em relação aos trabalhos realizados com lipases comerciais, a hidrólise enzimática da gordura do efluente mostra-se efetivamente positiva sobre os tratamentos biológicos. Masse; Kennedy e Chou (2001) estudaram o efeito da ação da lipase pancreática PL 250 (Genencor International, Rochester, NY) na

redução do tamanho de partículas de gorduras suína e bovina adicionadas em efluente de abatedouro. Após incubação de 4 h, observou-se uma redução de 60% no tamanho das partículas, com aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia longa, indicando a liquefação do material lipídico. Em trabalho subsequente, Masse; Masse; Kennedy (2003) avaliaram o impacto das partículas de gordura pré-hidrolisadas enzimaticamente no processo da digestão anaeróbia. As partículas de gordura de efluente de abatedouro foram pré-hidrolisadas com 250 mg/L de lipase pancreática PL 250 e submetidas ao tratamento em reator anaeróbio operado a 25°C. Aproximadamente 35% da gordura foi hidrolisada durante o tratamento enzimático, o que resultou na redução do tempo de digestão anaeróbia em 5% em relação ao controle (efluente sem enzima) e em 80% de remoção de gordura e ácidos graxos de cadeia longa pelos microrganismos anaeróbios.

A biodegradabilidade anaeróbia de efluente de laticínios, contendo 4,68 g/L de lipídeos, previamente hidrolisados com lipase pancreática (empresa Nuclear, São Paulo) na concentração de 5 mg/mL, cuja atividade específica era de 3992 U/mg de proteína, foi avaliada por Mendes; Pereira e Castro (2006). O teor de ácidos graxos liberados foi de 54,3 mM contra 2,70 mM do efluente não hidrolisado. Após 15 dias de tratamento anaeróbio, foi observada uma elevada remoção de DQO (80,9%) e alta produção de metano (437 mL), enquanto no efluente bruto a remoção de DQO foi de 45% com produção de 209 mL de metano. Esses resultados mostraram a eficiência da hidrólise enzimática.

Como mostrado acima, a ação coadjuvante das lipases para facilitar a assimilação de lipídeos pelos microrganismos do tratamento biológico é apresentada como uma alternativa para tratamentos de efluente com alto teor de lipídeos. No entanto, a aplicação de enzimas comerciais, provenientes da fermentação submersa (FS), não seria economicamente viável para implantação do processo. Com isso, trabalhos têm sido desenvolvidos para a produção de lipases por fermentação no estado sólido com posterior aplicação no tratamento de efluentes.

A maioria desses trabalhos estuda a ação direta do material fermentado contendo lipases na hidrólise da gordura de efluentes. Os parâmetros abordados na hidrólise são a ação da enzima frente às concentrações de óleos e graxas (O&G) do efluente, o efeito da aplicação de diferentes concentrações de sólido fermentado no efluente, o efeito de diferentes valores de temperatura na hidrólise. Esses parâmetros serão apresentados a seguir.

Independente do tipo de tratamento (aeróbio ou anaeróbio), as limitações geradas pelos lipídeos no sistema biológico são decorrentes da concentração desta matéria orgânica no efluente. Por isso, muitos autores avaliaram qual a concentração de O&G que gera problemas no funcionamento do tratamento biológico. Conforme mostrado na Tabela 4, valores de O&G acima de 800 mg/L no efluente, reduzem a remoção de O&G e DQO pelos microrganismos aeróbios (JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002) e anaeróbios (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007; LEAL *et al.*, 2002; CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001).

Devido ao efeito negativo das altas concentrações de O&G no efluente, alguns autores (CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001; VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007) avaliaram a ação de diferentes concentrações do sólido fermentado na hidrólise desses efluentes. Cammarota, Teixeira e Freire (2001) testaram as concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0% (m/v) de sólido fermentado na hidrólise de 12 h de efluente de laticínios (868 mg/L de O&G). O teor de ácidos livres detectado para cada concentração foi: 11, 22, e 26 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente. Esses mesmos valores de concentração de sólido fermentado foram testados por Valladão, Freire e Cammarota (2007) para hidrolisar efluente de abatedouro de aves (1200 mg/L de O&G) por 22 h e os teores de ácidos livres foram 3,2, 4,2 e 7,3 $\mu\text{mol/mL}$. Esses resultados mostram que a lipase é capaz de hidrolisar gordura de efluente, mas que o aumento da concentração de sólido fermentado não é linear com a concentração de ácidos livres obtida. A explicação proposta pelos autores está relacionada ao consumo desses ácidos livres pelos microrganismos endógenos do efluente. Cabe a ressalva de que o termo “ácidos livres” é empregado ao invés de ácidos

graxos, pois o método de detecção da acidez do efluente é o titulométrico, que não é específico para ácidos graxos.

TABELA 4 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEOS SOBRE A REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) E DE DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) POR TRATAMENTOS BIOLÓGICOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS

Tipo de tratamento biológico	Teor inicial de O&G (mg/L)	Remoção de DQO no tratamento biológico (%)	Remoção de O&G no tratamento biológico (%)	Referência
Anaeróbio Regime contínuo	203	91	82	Cammarota; Teixeira e Freire (2001)
	404	91	95	
	708	86	84	
	868	81	45	
Anaeróbio Regime batelada a cada 4 dias	180	55	-	Leal <i>et al.</i> (2002)
	450	70	-	
	900	37	-	
	1200	19	-	
Anaeróbio Regime batelada a cada 6 ou 7 dias	150	79	-	Valladão; Freire e Cammarota (2007)
	300	62	-	
	750	46	-	
	1200	21	-	
Aeróbio Regime batelada diária	400	93	-	Jung; Cammarota e Freire (2002)
	600	92	-	
	800	0	-	

(-) não realizado

O efeito da temperatura na hidrólise enzimática no efluente também tem sido avaliado. Leal *et al.* (2006) testaram as temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C na hidrólise de efluente semi-sintético de laticínios (1000 mg/L de O&G). Nas primeiras 12 h de hidrólise, a maior concentração de ácidos livres foi

obtida na temperatura de 35°C. A partir desse tempo, o maior teor de ácidos livres foi detectado na temperatura de 45°C. No entanto, a temperatura de 35°C foi selecionada devido à viabilidade econômica do processo.

Na tentativa de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática do efluente, Rigo *et al.* (2008a) estudaram o efeito da concentração de sólido fermentado, agitação, temperatura e pH por delineamento fatorial 2^{4-1} . O teor de ácidos livres obtido para o efluente tratado com as lipases do sólido fermentado foi 92,8 $\mu\text{mol/mL}$ nas condições de pH 6, 45°C, 100 rpm e concentração de enzima de 5% (m/v), cuja atividade era de 43 U/gSS.

Todos os trabalhos descritos na literatura que empregam diretamente o sólido fermentado contendo lipases para hidrolisar efluentes avaliam a eficiência do tratamento não pelo teor de ácidos livres, mas pelo efeito nos tratamentos biológicos subsequentes. Como apresentado acima, são poucos os trabalhos que estudam diferentes condições para aumentar a liberação de ácidos livres, a maioria estabelece condições fixas de concentração de sólido fermentado, temperatura e tempo de hidrólise. Se for detectada uma maior concentração de ácidos livres no efluente pré-hidrolisado em relação ao controle (efluente bruto), a eficiência é validada nos tratamentos biológicos aeróbios ou anaeróbios, através da remoção de DQO, O&G, produção de metano, acúmulo de gordura no lodo, entre outras.

A Tabela 5 mostra os principais trabalhos que avaliaram o efeito da hidrólise da gordura de diversos tipos de efluentes em tratamentos biológicos aeróbios ou anaeróbios. A hidrólise foi realizada com a adição direta do sólido fermentado de *Penicillium restrictum*.

TABELA 5 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE DE LÍPÍDEOS DE EFLUENTE TRATADO COM SÓLIDO FERMENTADO SOBRE TRATAMENTOS BIOLÓGICOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS

Tipo de tratamento	Condição do efluente	O&G inicial (mg/L)	Remoção de DQO (%)	Remoção de O&G (%)	Produção de metano	Referência
Anaeróbio Regime contínuo	Efluente bruto (controle)	868	81	45	5,3 L.dia ⁻¹	Cammarota; Teixeira e Freire (2001)
	Efluente pré-hidrolisado	718	92	89	nd	
Aeróbio Regime batelada diária	Efluente bruto (controle)	800	82	85	-	Jung; Cammarota e Freire (2002)
	Efluente pré-hidrolisado	-	0	95	-	
Anaeróbio Regime contínuo	Efluente bruto (controle)	1000	82	30	66,8%	Leal <i>et al.</i> (2006)
	Efluente pré-hidrolisado	-	90	85	67,4%	
Aeróbio Regime batelada	Efluente bruto (controle)	800	80	86,5	-	Rosa <i>et al.</i> (2006)
	Efluente pré-hidrolisado	-	92	92,5	-	
Anaeróbio Regime batelada	Efluente bruto (controle)	1200	53	-	37 mL.dia ⁻¹	Valladão; Freire e Cammarota (2007)
	Efluente pré-hidrolisado	-	85	-	175 mL.dia ⁻¹	
Anaeróbio Regime contínuo	Efluente bruto (controle)	1200	52	-	-	Rigo <i>et al.</i> (2008b)
	Efluente pré-hidrolisado	-	65	-	-	

(nd) = não determinado e (-) = não especificado no trabalho

Em todos os trabalhos citados na Tabela 5, pôde-se observar o efeito positivo do efluente pré-hidrolisado no tratamento biológico, pois em todos os casos ocorreu um aumento na remoção da matéria orgânica, bem como uma redução de problemas operacionais representados pelo aumento da remoção de DQO e O&G. Nos tratamentos anaeróbios, alguns trabalhos também utilizaram a produção de metano para avaliar a eficiência da hidrólise. O efluente pré-hidrolisado aumentou a produção desse gás em aproximadamente cinco vezes quando comparado com o efluente bruto, mostrando o potencial da hidrólise (VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007). No entanto, o mesmo não aconteceu no trabalho de Leal *et al.* (2006). Apesar da remoção de 85% de O&G do efluente pré-hidrolisado contra 30% do efluente bruto, a produção de metano foi praticamente igual para ambos efluentes.

Outros parâmetros, que indicam a influência da hidrólise sobre a eficiência operacional do tratamento biológico, foram determinados em alguns trabalhos. A turbidez e a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente pré-hidrolisado e tratado anaerobicamente diminuíram aproximadamente em 75% e 90%, respectivamente, quando comparadas com o controle (CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001). Jung, Cammarota e Freire (2002) avaliaram a sedimentabilidade da biomassa aeróbia pelo índice volumétrico do lodo (mL de lodo sedimentado após 30 min por grama de peso seco do lodo) e constataram que para o efluente controle, o índice foi 569 mL/g e para o efluente pré-hidrolisado, o valor foi 117 mL/g, indicando uma sedimentabilidade adequada do lodo. Além disso, a determinação da concentração de O&G no lodo mostrou a presença de 20 mg/g de O&G no lodo tratado com efluente controle e apenas 4 mg/g de O&G para o efluente pré-hidrolisado. Rosa *et al.* (2006) avaliaram a concentração de biomassa no reator aeróbio através dos valores de sólidos voláteis em suspensão no licor misto (SVSLM). Os resultados foram 2023 mg/L para o efluente controle e 3357 mg/L para o efluente pré-hidrolisado. Valores elevados de SVSLM indicam que a biomassa cresce de maneira favorável, pois tem capacidade de metabolizar os nutrientes de forma adequada. Portanto, o efluente pré-hidrolisado é benéfico para o desenvolvimento do lodo.

A ação lipolítica também foi avaliada diretamente no tratamento aeróbio de efluente de laticínios semi-sintético. Damasceno, Freire e Cammarota (2008) investigaram a eficiência da ação do sólido fermentado por *P. restrictum* durante choques de carga de efluente de laticínios semi-sintético, com 1200 mg/L de O&G, sobre o tratamento por lodos ativados. Esses choques foram feitos a cada 2 semanas, semanalmente e a cada 2 h, 8 h e 16 h. Observou-se que, nos diferentes tempos de carga de efluente, o reator que recebeu o efluente juntamente com sólido fermentado apresentou uma remoção de DQO praticamente constante, com uma média de eficiência em torno de 90%. Por outro lado, o reator tratado apenas com efluente sem sólido fermentado apresentou maior variabilidade na remoção de DQO, sendo que a média da eficiência foi em torno de 83%. A determinação de O&G no lodo em todos os regimes de choque de carga revelou que, para o lodo tratado com efluente sem sólido fermentado, o teor de O&G foi de 1,5 a 5 vezes maior do que em relação ao lodo que recebeu o efluente juntamente com sólido fermentado.

A eficiência no emprego de lipases presentes no sólido fermentado de *P. restrictum* em relação a lipase comercial (Lipolase 100T, Novozymes) para hidrolisar lipídeos do efluente gerado por uma indústria de carnes suínas foi avaliada por Rigo *et al.* (2008a). Para isso, as melhores condições de ação de ambas as enzimas foram determinadas por planejamento fatorial 2^{4-1} . O teor de ácidos livres obtido para o efluente tratado com as lipases do sólido fermentado foi de 92,8 $\mu\text{mol/mL}$ e para a Lipolase 100T, o valor foi 39,5 $\mu\text{mol/mL}$ nas mesmas condições de reação [pH 6, 45°C, 100 rpm e concentração de enzima de 5% (m/v) com atividade de 43 U/gSS]. Os resultados mostraram que a enzima presente no sólido fermentado foi mais eficiente do que a enzima comercial. Provavelmente, o efluente foi um meio adverso para ação da Lipolase 100T tanto em relação ao efeito inibitório de compostos presentes no efluente, quanto em relação à baixa resistência de desnaturação da enzima. Essas mesmas enzimas foram utilizadas para hidrolisar a gordura de um efluente gerado em indústria de carne suína e bovina. Na hidrólise, foram utilizadas as concentrações de 0,1% e 5,0% (m/v) para ambas as enzimas e as reações foram feitas nas melhores condições para cada enzima. Depois de hidrolisado, o efluente passou por tratamento anaeróbio. Para ambas as

enzimas, a concentração de 0,1% aumentou a biodegradabilidade do efluente. Provavelmente, a maior concentração de enzima levou a uma maior produção de ácidos graxos, que inibiram os microrganismos presentes no lodo. Em relação às fontes das enzimas empregadas, observou-se maior eficiência do tratamento do efluente com do sólido fermentado, onde a remoção de DQO foi 22% maior quando comparada com o controle (efluente sem tratamento), enquanto que para a Lipolase 100T não houve diferença significativa da remoção de DQO do efluente (RIGO *et al.*, 2008b).

Como exposto acima, o uso de lipases no tratamento de efluentes com alta carga lipídica oferece duas vantagens em sua aplicação. Uma vantagem seria a facilitação da assimilação da matéria lipídica pelos microrganismos dos tratamentos biológicos subsequentes, comprovada pelo aumento na remoção de O&G e DQO do efluente. A outra vantagem seria em relação à obtenção da enzima por processo economicamente viável como a fermentação no estado sólido.

Apesar das vantagens apresentadas pela hidrólise enzimática da gordura do efluente e diminuição de custos para obtenção de lipases a serem empregadas nesse processo, o item 2.4 da página 35 desta revisão apontou que muitos trabalhos testam microrganismos em efluentes com alta carga lipídica. Os estudos que serão apresentados a seguir mostram que a remoção de gordura também é eficiente com a aplicação de microrganismos. Independente das vantagens e desvantagens do uso da molécula ou do microrganismo, tem-se claro que as pesquisas relacionadas a essas duas propostas são desafiadoras. Os tratamentos enzimáticos têm por finalidade aumentar a biodegradabilidade do efluente, enquanto os tratamentos com microrganismos objetivam o desenvolvimento de inoculantes com a capacidade de remover gordura do efluente. Portanto, pode-se considerar que ambos os métodos são associáveis e não excludentes (VEIGA, 2003).

Wakelin e Forster (1997) estudaram o efeito da ação de microrganismos na remoção de gordura de efluente de restaurante tipo “fast-food”. O teste foi feito com culturas puras de bactérias: *Acinetobacter* sp, *Rhodococcus rubra*,

Nocardia amarae e *Microthrix parvicella*, as quais foram comparadas com o lodo ativado e uma mistura de cultura isolada da caixa de gordura do restaurante designada por MC1. Os resultados mostraram que o lodo ativado removeu acima de 90% da gordura inicial (8 g/L) e dentre as culturas puras testadas, *Acinetobacter* sp foi a mais efetiva na remoção da gordura (60–65%). A mistura MC1 removeu 73% da gordura. Portanto, a melhor opção no estudo para remoção de gordura foi o lodo ativado. Para os autores, esse resultado foi positivo, pois não seria adequado o uso de culturas puras para tratar efluente, devido aos elevados custos de produção e as dificuldades em manter a integridade da cultura no reator aberto.

El-Bestawy, El-Mastry e El-Adl (2005) relataram a ação de bactérias do gênero *Pseudomonas* na remoção de DQO de um efluente de indústria de extração de óleo vegetal e verificaram que o tratamento de efluente com células de *Pseudomonas diminuta* removeram 68% de DQO em 72 h. Quando essa espécie foi testada juntamente com *Pseudomonas* sp e essas duas com *Pseudomonas pseudoacaligenes*, a remoção de DQO foi para 93% e 89%, respectivamente.

No estudo da bioaugmentação, realizado por Loperena *et al.* (2009), foi testada a capacidade de microrganismos, isolados de diferentes pontos da estação de tratamento de uma indústria de laticínios para remover DQO (3000 mg/L) e gordura (1 g/L) de um efluente sintético composto por leite diluído e sais, comparados com um inóculo comercial para bioaugmentação. O consórcio composto por *Bacillus pumillus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* foi capaz de remover 57% de DQO, valor próximo da remoção de DQO obtida pelo inóculo comercial (63%). Em relação à remoção de gordura, o consórcio foi mais eficiente, removendo 75% contra 38% do inóculo comercial no tempo de 24 h.

Na tentativa de construir um sistema de tratamento de efluentes eficiente para remoção de lipídeos, Matsumiya *et al.* (2007) isolaram do solo a bactéria *Burkholderia* sp e testaram a ação desse microrganismo em efluente sintético composto de 10 g/L de óleo de salada de restaurantes, 0,6 g de peptona, 0,4 g de extrato de carne, 0,1 g de uréia, 0,1 g de Na₂HPO₄, 0,03 g de NaCl, 0,014 g

de CaCl_2 , 0,014 g KCl e 0,01 g de MgSO_4 por litro. Após 24 h de cultivo, a 30°C e agitação de 550 rpm, a concentração de óleo detectada foi de 1,8 g/L. Portanto, *Burkholderia* sp foi capaz de remover 82% do óleo de salada de efluente sintético.

Em países do Mediterrâneo, onde se concentram 95% da produção de oliveiras, a geração de efluentes de indústrias de óleo de oliva tem-se tornado um grande problema ambiental. Devido a isso, Scioli e Vollaro (1997) e Lanciotti *et al.* (2005) estudaram a ação de *Yarrowia lipolytica* na remoção de DQO desses efluentes. No primeiro trabalho, os autores adicionaram ao efluente, sulfato de amônio (0,6%) e extrato de levedura (0,1%) e pasteurizaram por 30 min a 65°C. Após 24 h do cultivo de *Y. lipolytica* no efluente a 30°C e 500 rpm, foi obtida uma remoção de 80% da DQO inicial, cujo valor era 146 g/L e a produção de lipases foi detectada a partir de 6 h de tratamento. No segundo trabalho, foi testado inicialmente o crescimento de 62 estirpes de *Y. lipolytica* em efluente de indústria de extração do óleo de oliva, onde somente 20 cepas apresentaram um alto crescimento no meio e foram testadas quanto à eficiência na remoção de DQO. Após 72 h de cultivo a 25°C, os valores de remoção de DQO obtidos variaram de 1,5 a 41,2% em relação à DQO inicial (105 mg/L), sendo que 9 cepas apresentaram uma remoção acima de 20%. Das 62 estirpes testadas para atividade lipolítica, em 5 não foi detectada atividade, enquanto para o restante, os valores ficaram na faixa de 31 a 1770 U/L.

3 OBJETIVOS

Considerando a revisão bibliográfica, verifica-se que efluentes com elevada carga lipídica podem ser submetidos a um tratamento enzimático, utilizando especificamente as lipases, com o intuito de melhorar o desempenho do tratamento biológico de interesse. Além disso, para viabilizar economicamente esse tipo de tratamento, as lipases podem ser produzidas por FES, onde rejeitos industriais podem ser testados como substratos e isso

confere uma dupla abordagem ambiental ao presente estudo. No entanto, a literatura restrita em relação ao estudo da aplicação direta de sólido fermentado contendo lipases na hidrólise dos lipídeos do efluente e a carência de informações na etapa de hidrólise do efluente motivam a busca por pesquisas nessa área.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a eficiência de lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação em estado sólido (FES) na hidrólise e remoção de lipídeos de efluente de indústria de laticínios.

3.1 Objetivos Específicos

Selecionar fungos filamentosos produtores de lipase por meio do teste em placa com Rodamina B e fermentação submersa;

Estudar a produção de lipases por fermentação no estado sólido, variando as características do substrato;

Estudar o efeito da hidrólise e remoção de lipídeos do efluente de laticínios incubado com sólido fermentado por diferentes períodos de tempo;

Estudar o efeito da hidrólise e remoção de lipídeos do efluente de laticínios incubado com suspensão de esporos do fungo selecionado por diferentes períodos de tempo;

Estudar o efeito de diferentes valores de concentração de sólido fermentado e diferentes valores de temperatura na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente;

Avaliar o efeito da hidrólise enzimática e remoção de lipídeos na razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO);

Avaliar o efeito da hidrólise enzimática e remoção de lipídeos na biodegradabilidade aeróbia do efluente;

Avaliar o efeito da hidrólise enzimática e remoção de lipídeos no efluente estéril e não estéril.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO

Os prováveis produtores de lipase, vinte e oito isolados de fungos, foram cedidos pelo Professor Jesús Cordova (Universidade de Guadalajara, México). Essas estirpes foram inicialmente inoculadas em placas de Petri contendo o meio BDA (batata, dextrose, ágar) e incubadas a 30°C durante 7 dias. Após esse período de incubação, somente onze cepas fúngicas cresceram. Esses isolados foram estocados em tubos inclinados recobertos com óleo mineral estéril.

4.2 SELEÇÃO DAS CEPAS FÚNGICAS LIPOLÍTICAS

Para selecionar o melhor produtor de lipase, as onze cepas fúngicas foram submetidas ao ensaio qualitativo em meio sólido, utilizando Rodamina B (KOUKER; JAEGER, 1987; SHELLEY; DEETH; MACRAE, 1987) e aquelas que apresentaram intensa fluorescência foram cultivadas por fermentação submersa (meio e condições descritos em 4.2.2.1 e 4.2.2.3) para quantificar a produção da enzima.

4.2.1 Seleção de cepas lipolíticas em meio sólido contendo Rodamina B

O corante Rodamina B foi utilizado para evidenciar a produção de lipases em meio de cultura sólido. Para isso, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, pH 6,5 (ELIBOL; ÖZER, 2000)], ágar 15 g/L, corante Rodamina B 0,001% (m/v), óleo de oliva 1% (v/v) e Tween 80 0,01% (v/v). Para inoculação, os esporos dos fungos crescidos em meio de BDA foram raspados e inoculados centralmente nas placas de Petri contendo o meio sólido com o corante. Essas placas foram incubadas a 30°C por 4 dias. A produção de lipase foi evidenciada pelo aparecimento de fluorescência alaranjada quando as placas foram submetidas à irradiação com luz UV a 365 nm (KOUKER; JAEGER, 1987; SHELLEY; DEETH; MACRAE, 1987).

4.2.2 Fermentação Submersa

4.2.2.1 Composição do meio de cultivo

O meio de cultivo para fermentação submersa foi composto por glucose 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L e óleo de oliva 1% (v/v) com pH corrigido para 6,5 (ELIBOL; ÖZER, 2000).

4.2.2.2 Preparo do inóculo e pré-inóculo

Para obtenção do inóculo, as cepas fúngicas foram primeiramente cultivadas em placas de Petri contendo BDA e incubadas por 7 dias, a 30°C. Após esse período de incubação, os esporos foram raspados, suspensos em

água destilada estéril contendo Tween 80 (0,01% v/v) e submetidos à agitação até a obtenção de uma solução homogênea. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Todos os cultivos foram inoculados de modo a obter uma concentração final de 5×10^5 esporos/mL.

Para o preparo do pré-cultivo foi utilizado o mesmo meio citado em 4.2.2.1, sem e com adição de óleo de oliva 1% (v/v). A concentração final de esporos no pré-cultivo foi de 5×10^5 esporos /mL. Os frascos foram incubados por 48 h, a 40°C, em agitador orbital a 180 rpm. A temperatura de 40 °C foi utilizada com base nas informações transmitidas pelo Professor Jesús Cordova da Universidade de Guadalajara, México.

4.2.2.3 Condições de cultivo

Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio previamente esterilizado em autoclave por 15 min, a 120°C e 1 atm. A inoculação desses meios de cultivo foi feita a partir da suspensão de esporos ou de um volume do pré-inóculo de 10% (v/v), contendo ou não óleo de oliva 1% (v/v). Em seguida, os frascos foram incubados em agitador orbital a 40°C, 180 rpm. A cada 12 h, foi coletada uma alíquota de 2,0 mL, que foi filtrada em papel de filtro qualitativo. O filtrado obtido foi submetido à determinação da atividade lipásica pelo método do pNPP (item 4.4.6.1).

4.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

4.3.1 Microrganismo

Os ensaios preliminares descritos acima levaram à seleção de um microrganismo – a cepa 43a IV – para continuação dos estudos. Esta cepa foi enviada para caracterização no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP) e foi identificada como *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (ANEXO I).

4.3.2 Preparo do inóculo

O processo de obtenção do inóculo para FES foi idêntico ao descrito para FS. Os esporos de *R. microsporus* foram primeiramente inoculados em placas de Petri contendo BDA e incubadas por 7 dias, a 30°C. Após esse período de incubação, os esporos foram raspados, suspensos em água destilada estéril contendo Tween 80 (0,01% v/v) e submetidos à agitação mecânica até a obtenção de uma solução homogênea. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A concentração final de esporos no meio de cultivo foi de $3,0 \times 10^7$ esporos por grama de substrato seco (gSS).

4.3.3 Seleção e preparo dos substratos

Foram estudados dois substratos, o farelo de semente de girassol e o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço da cana, fornecido pela Indústria Melhoramentos (Jussara, PR), foi peneirado para obtenção de partículas entre 1,7 mm e 1 mm, lavado três vezes com água destilada e seco a 80°C por 24 h

(DIAZ *et al.*, 2006). Para obtenção do farelo de girassol, sementes da planta, adquiridas no comércio local, foram trituradas em moinho elétrico, peneiradas e a granulometria adotada foi de 1,4 a 0,85 mm. A composição centesimal dos substratos foi realizada pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR).

Inicialmente, os dois substratos foram testados isoladamente, sendo que 10 g do farelo da semente de girassol foram umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 e para 10 g de bagaço de cana foram testadas as seguintes soluções umedecedoras: meio de cultura da FS e óleo de oliva 5% (v/v); meio de cultura e sebo de origem animal 5% (v/v); meio de cultura e gordura do efluente 5% (m/v), e efluente de laticínio. Para o emprego do sebo e da gordura do efluente, esses foram homogeneizados a quente com o meio de cultura e rapidamente vertidos sobre o substrato. Após o preparo, os substratos foram autoclavados a 121°C, 1 atm por 15 min.

O próximo passo foi testar a mistura do farelo de girassol e bagaço de cana em diferentes proporções. As proporções selecionadas foram: 7,5 g de farelo e 2,5 g de bagaço (3:1), 5 g de farelo e 5 g de bagaço (1:1), 2,5 g de girassol e 7,5 g de bagaço (1:3) e 1 g de girassol com 9 g de bagaço (1:9). Após a mistura, os substratos foram umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 e autoclavados.

Além da mistura, foi avaliada a necessidade do tratamento do bagaço e obtenção do farelo da semente de girassol, como descrito anteriormente. O bagaço foi testado sem ser tamisado, lavado e seco e a semente de girassol foi passada uma vez por moinho elétrico, apenas para ser quebrada. Para testar as condições de tratamento dos substratos, esses foram misturados, umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 e autoclavados.

4.3.3.1 Determinação da umidade dos substratos

A umidade inicial dos substratos, previamente embebidos em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 e autoclavados, foi determinada em balança de infravermelho (Gehaka), utilizando-se 1 g de amostra.

4.3.4 Condições de cultivo no meio sólido

Os ensaios de FES foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g do substrato em base seca. Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com a suspensão de esporos, mantendo-se uma concentração final no meio sólido de $3,0 \times 10^7$ esporos/gSS. Após inoculação, os meios foram incubados em estufa a 40°C.

A produção de lipase foi determinada no extrato aquoso obtido da extração do material sólido pelo método espectrofotométrico (pNPP) e diretamente no sólido fermentado seco pelo método titulométrico, utilizando um titulador automático do tipo pH Stat (itens 4.4.6.1 e 4.4.6.2). A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido seco (U/gSS).

4.3.4.1 Extração e secagem do sólido fermentado para determinação da atividade lipolítica

Para extração da enzima do sólido fermentado foi utilizado o processo típico de extração, conhecido por lixiviação (leaching) (IKASSARI; MITCHELL, 1996). Após o cultivo, em cada frasco contendo 10 g dos substratos, 100 mL de solução extratora (NaCl 2% m/v) foram adicionados. Em seguida, os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação de 200 rpm por 1 h. Após esse período,

o material homogeneizado foi filtrado em tecido de algodão e prensado manualmente para obtenção do extrato bruto, que foi centrifugado a 12.520xg por 10 min para remoção dos sólidos finos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática pelo método do pNPP, como descrito em 4.4.6.1.

Nos testes de secagem do sólido fermentado, dois métodos foram comparados: liofilização por 24 h a -40°C em liofilizador Jouan LP3 e secagem em estufa a 55 °C. Para a liofilização, o sólido fermentado foi transferido para balões de fundo redondo, resfriado em congelador (-18°C) por 24 h e submetido à liofilização por mais 24 h. Depois de liofilizado, o sólido foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram armazenados em potes plásticos, à temperatura ambiente. No processo de secagem em estufa, o sólido, após fermentação, foi transferido para bandejas de alumínio e em determinados intervalos de tempos, amostras eram retiradas para determinação da umidade e determinação da atividade enzimática pelo método titulométrico.

4.4. ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS

4.4.1 Origem e caracterização do efluente

O efluente utilizado nesse estudo foi cedido pela indústria de laticínios Batávia S.A, localizada em Carambeí, PR. Os principais produtos desta empresa são: creme de leite, manteiga, iogurtes, sobremesas, queijo *petit suisse*, leites aromatizados, queijos, leites, sucos e doce de leite. Conforme informações da empresa, a volume diário de efluente é de 2500 m³. A geração de efluentes depende da linha de produção, do processo de lavagem dos equipamentos e instalações, que é realizado com ácido nítrico e hidróxido de sódio, e do esgoto sanitário. O tratamento de efluente da indústria segue o seguinte fluxograma: (1) tanque de equalização, (2) calha Parshall, (3) caixa de

gordura, (4) lagoa anaeróbia, (5) lodos ativados e despejo do efluente tratado no rio.

As coletas do efluente foram realizadas duas vezes. O primeiro lote de efluente coletado (100 L) foi acondicionado em frascos plásticos de 10 L, que foram armazenados a -18°C. Além do efluente, foi coletada a gordura flutuante do efluente na lagoa de equalização. Essa gordura foi submetida à determinação de O&G, acondicionada em sacos plásticos e armazenada a -18°C. Esse lote foi designado para o estudo da hidrólise enzimática e biodegradabilidade em efluente previamente esterilizado. O segundo lote de efluente coletado (50 L) foi utilizado nos estudos da hidrólise enzimática e biodegradabilidade em efluente não esterilizado e esterilizado previamente. O uso desse efluente ocorreu logo após a sua coleta, pois o objetivo era avaliar o efeito dos microrganismos endógenos desse efluente na hidrólise estudada.

TABELA 6 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS NOS DOIS LOTES DE EFLUENTE UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Parâmetros	Primeiro lote* de efluente	Segundo lote** de efluente
pH	13	2,60
Acidez (mg/CaCO ₃ /L)	20,91	288,36
Alcalinidade Total (mg/ CaCO ₃ /L)	233	<1,00
O&G (mg/L)	640	428
DBO ₅ (mg/L)	3.255	2.431
DQO (mg/L)	3.680	2.789
Fósforo Total (mg P/L)	1,76	11,20
Nitrogênio Kjeldahl (mg NH ₃ -N/L)	17,64	67,91
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	0,30	0,90
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	752	179
Sólidos Suspensos Voláteis (mg/L)	735	157
Sólidos Totais (mg/L)	3.160	4.138

*Coleta realizada em setembro de 2007

**Coleta realizada em março de 2008

Para ambos os lotes de efluente, a coleta foi realizada na calha Parshall (Figura 8), que recebe o efluente homogeneizado da lagoa de equalização da estação de tratamento de efluentes (ETE). As amostras de efluente foram caracterizadas segundo as normas recomendadas pelos métodos oficiais do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).



FIGURA 8 - CALHA PARSHALL: PONTO DE COLETA DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS BATÁVIA

4.4.2 Padronização do efluente

Para obter a concentração desejada de O&G no efluente, foi adicionada ao efluente a sua própria gordura coletada da lagoa de equalização. Cabe ressaltar que o termo “gordura” não implica apenas em material de origem lipídica, pois outros componentes orgânicos e inorgânicos estão associados ao que pode ser denominado de material sólido. Por isso, para saber a real concentração de O&G no material sólido, foi realizada a determinação de O&G

e o valor obtido foi de 868,53 mg de O&G por g de material sólido. A partir dessa informação, foi adicionada a massa de gordura no efluente para obtenção de valores de O&G acima de 1000 mg/L. Após a adição da massa de gordura, o efluente foi submetido à homogeneização com agitador mecânico a 5000 rpm durante 4 h, seguido de correção do valor de pH para 7,0. A correção do pH foi feita com adição de solução de NaOH 1 M e solução de HCl 0,5 M. Alíquotas de 70 mL foram vertidas em frascos Erlenmeyers 250 mL e, se esterilizadas, eram autoclavadas a 120°C, 1 atm por 15 min. Após o preparo, a determinação de O&G era feita para verificar o real valor de gordura incorporado no efluente.

4.4.3 Hidrólise enzimática do efluente

A hidrólise enzimática foi realizada com um lote de efluente previamente esterilizado por autoclavação e um segundo lote de efluente não esterilizado. Para ambas as condições do efluente, 0,3% (m/v) do sólido fermentado, contendo 33 U/gSS (unidades lipolíticas por grama de sólido seco medidas contra tricaprilina), foi adicionado ao efluente. Os frascos foram incubados a 35°C, 150 rpm em agitador orbital. A cada intervalo de tempo, o conteúdo de três frascos foi filtrado em malha de nylon. No filtrado obtido foram determinadas a concentração de O&G, a concentração de ácidos livres e atividade lipolítica residual pelo método titulométrico. O conteúdo retido na malha de nylon foi utilizado para determinação indireta do peso seco da biomassa fúngica (item 4.4.3.1). Os controles empregados nesse experimento foram o sólido fermentado previamente autoclavado por 30 min. e o efluente sem sólido fermentado.

4.4.3.1 Determinação indireta da biomassa fúngica

A avaliação do crescimento do fungo durante o tratamento do efluente com sólido fermentado foi feita por uma determinação indireta do peso seco do micélio. O conteúdo retido na malha de nylon (fungo e substrato) foi transferido para papéis de filtro qualitativos previamente pesados e secos a 55°C em estufa até obtenção de peso constante. Concomitantemente, o mesmo procedimento foi feito para o sólido fermentado previamente autoclavado. O cálculo da diferença de peso entre o sólido fermentado e sólido fermentado autoclavado forneceu o valor aproximado da biomassa fúngica produzida durante o tratamento do efluente.

4.4.4 Estudos de biodegradabilidade do efluente

A determinação da biodegradabilidade aeróbia do efluente tratado e não tratado enzimaticamente foi fundamentada na determinação da razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO) e na metodologia de Zahn-Wellens, descrita em Organization for Economic Co-operation and Development, (OECD 302B, 1996).

4.4.4.1 Determinação da razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO)

A razão de biodegradabilidade estima a biodegradabilidade do efluente através da relação da matéria orgânica prontamente biodegradável e matéria orgânica total, representada por DBO_5/DQO . Portanto, razões menores do que 0,6 estimam baixa biodegradabilidade do efluente, ou seja, a matéria orgânica do efluente seria pobremente metabolizada por microrganismos dos tratamentos biológicos convencionais (aeróbio e anaeróbio) (JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DĘBOWSKI, 2008; DANALEWICH *et al.* 1998).

4.4.4.2 Teste de biodegradabilidade aeróbia de Zahn-Wellens

O propósito do teste de biodegradabilidade aeróbia inerente de Zahn-Wellens é a avaliação da biodegradabilidade inerente de substâncias orgânicas não voláteis e solúveis em água quando expostas a concentrações relativamente altas de microrganismos não aclimatados. No caso do presente trabalho, o emprego desse teste teve como objetivo comparar a biodegradabilidade do efluente não tratado e do efluente tratado com sólido fermentado e suspensão de esporos por meio da determinação da Demanda Química dispersa (DQO_d).

As amostras de efluente submetidas a esse teste foram as seguintes:

- Amostra 1: Efluente bruto ou não tratado;
- Amostra 2: Efluente tratado por 12 h com sólido fermentado;
- Amostra 3: Efluente tratado por 72 h com sólido fermentado;
- Amostra 4: Efluente tratado por 72 h com esporos.

Para a execução do teste, as seguintes etapas foram realizadas:

Etapa 1: amostra de lodo ativado (consórcio de microrganismos) foram coletadas na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE-Belém), no Município de Curitiba. A coleta foi realizada no tanque de aeração e o lodo foi colocado em frasco plástico de 20 L, sendo imediatamente transportado até o laboratório e submetido ao processo de aeração com aeradores de aquário. Antes de ser empregado em qualquer processo, o lodo permaneceu sob aeração por aproximadamente 24 h.

Etapa 2: os reatores aeróbios foram montados com frascos plásticos com capacidade de 1 L (Figura 9). Cada reator recebeu aeração proporcionada por placas de pedras porosas conectadas por mangueiras de silicone à bomba de ar comprimido (bomba para aquário) a fim de manter o oxigênio dissolvido em torno de 2 mg.L^{-1} . As pedras porosas foram posicionadas na parte inferior de cada reator, de forma a proporcionar aeração e turbulência em todo o conteúdo do reator.

Etapa 3: cada reator recebeu 3 g/L de sólidos suspensos totais que correspondem à biomassa de lodo ativado previamente aerada. Em seguida, juntou-se ao lodo ativado 2,5 mL de uma solução nutriente contendo NH_4Cl 38 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,4 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,5 g/L e $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 21,7 g/L. O volume de cada amostra de efluente foi adicionado para que o valor de DQO final no reator fosse igual a 1000 mg/L, com base nas seguintes equações:

$$V_T = V_L + V_A \quad (1)$$

$$A/M = (V_A \cdot C_A)/(V_L \cdot C_L) \quad (2)$$

Onde:

V_T : volume total (mL); V_L : volume de lodo (mL); V_A : volume de amostra (mL);

C_A : DQO da amostra (mg/L);

C_L : Sólidos Suspensos Totais do lodo (SST) (mg/L);

A/M: Relação alimento/microrganismos ($\text{Kg}_{\text{DQO}}/\text{Kg}_{\text{SST}}$)

O teste foi conduzido durante 14 dias. Diariamente, foi feita coleta do conteúdo dos reatores para determinação dos valores de DQO_d e, a cada dois dias, foi determinado o teor de SST. Para a coleta da amostra para determinação da DQO_d, a aeração foi previamente interrompida por 15 min para a decantação do lodo e o sobrenadante foi coletado. Para determinação de SST, a aeração não foi interrompida, para propiciar a coleta tanto do líquido quanto do lodo.

A viabilidade do teste foi assegurada por dois tipos de controle: solução de glucose 2 g/L e solução de dietilenoglicol 0,56 g/L. O controle à base de glucose foi usado para comprovar a atividade do lodo ativado não aclimatado nos primeiros dias de teste (4 a 6 dias). A solução de dietilenoglicol controla a viabilidade dos microrganismos do lodo no período de 8 a 12 dias de teste. De

acordo com a metodologia de Zahn-Wellens, para o teste de biodegradabilidade ser considerado válido, a concentração de dietilenoglicol, determinada em DQO, deve sofrer redução acima de 90% após 10 dias de incubação.



FIGURA 9 - REATORES UTILIZADOS PARA O TESTE DE BIODEGRADABILIDADE AERÓBIA

A aeração e a turbulência são proporcionadas por difusores de pedra porosa ligados a bombas de aquário, de forma a manter o oxigênio dissolvido (OD) entre 2 e 6 mg/L. Esta foto mostra os reatores em funcionamento.

4.4.5 Contagem dos microrganismos endógenos do efluente

As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) foram feitas após o preparo do efluente (com adição de gordura) e após 12 h e 72 h de incubação do efluente sem o sólido fermentado e com sólido fermentado.

Para as contagens, amostras do efluente foram diluídas de forma seriada na ordem de 1/10, até a diluição 10^{-6} , com solução salina 0,9% estéril. De cada diluição, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo o meio de cultivo ágar nutriente (peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L, NaCl 1

g/L, ágar 15 g/L) e espalhada por toda placa (técnica de *spread plate*). As placas foram incubadas a 30°C e após 24 h foi realizada a contagem das colônias de microrganismos cultiváveis neste meio.

4.4.6 Métodos de dosagem da atividade lipolítica

4.4.6.1 Método da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP)

Este método espectrofotométrico foi utilizado para determinar a atividade lipolítica do extrato bruto da fermentação submersa e do extrato aquoso obtido do sólido fermentado. O método foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), e modificado conforme Krieger (1995). Nesse método, 1 mL de solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila em 1 mL de isopropanol) foi adicionado lentamente a 9 mL de solução B [tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e polivinil álcool (PVA) 0,25%] e mantida sob constante e intensa agitação em vórtex. Em uma cubeta, foram adicionados 0,9 mL dessa mistura (substrato) e 0,1 mL da solução enzimática (pura ou diluída). A reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela enzima foi seguida por 1 min, a 410 nm, na temperatura de 40°C. Uma mistura de reação sem enzima foi usada para cada amostra para calibrar o espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μ mol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por min (Figura 10).

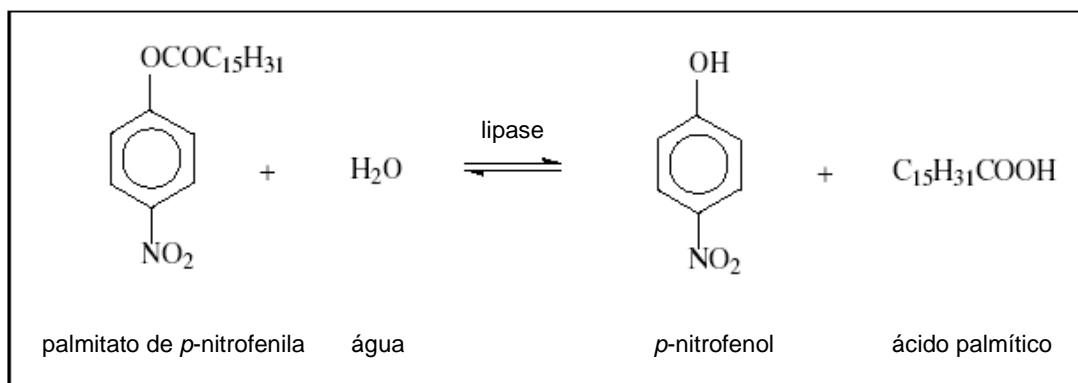


FIGURA 10 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE *p*-NITROFENILA CATALISADA POR LIPASES

Para o cálculo da atividade volumétrica, o coeficiente de extinção molar para o *p*-nitrofenol de $1,4144 \times 10^4$ L/(mol.cm) foi determinado a fim de relacionar a concentração do produto da reação de hidrólise com a absorvância obtida na leitura (ANEXO II).

4.4.6.2 Método titulométrico

Esse método foi utilizado para determinar diretamente a atividade lipolítica no sólido fermentado e no efluente durante o tratamento enzimático. A determinação da atividade de lipases por titulometria é baseada no método proposto por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (Figura 11).

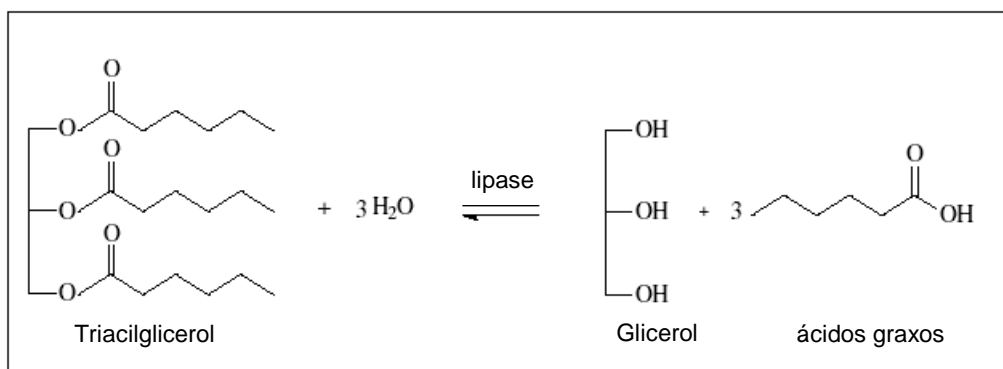


FIGURA 11 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL CATALISADA POR LIPASES

Para esse método, emulsões dos substratos tributirina (54 mM); tricaprilina (63 mM) e trioleína (62 mM) foram preparadas e os ácidos graxos livres foram titulados usando 0,05 M NaOH em titulador automático pH-Stat (Metrohm 718 Stat Titrino), mantendo-se pH 7,0. Cada substrato foi pré-emulsificado com goma arábica (3% m/v), CaCl₂ (2mM), Tris-HCl 0,25 Mm, pH 7,0 e NaCl 150 mM (TISS *et al.*, 2001). Para cada ensaio, 20 mL da emulsão e 250 mg do sólido fermentado ou 1 mL do efluente foram adicionados em um vaso termoestabilizado (37°C), e a reação de hidrólise foi acompanhada durante 10 min, mantendo-se o pH 7,0 constante por adição de NaOH. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo por min, nas condições do ensaio.

4.4.7 Métodos analíticos

4.4.7.1 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada no efluente pelo método de Bradford (1976).

4.4.7.2 Determinação de açúcares totais

A concentração de açúcares totais no efluente foi determinada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

4.4.7.3 Determinação do teor de óleos e graxas (O&G)

A determinação do teor de O&G, antes e depois do tratamento

enzimático, foi feita através da extração em Soxhlet, utilizando hexano como solvente (APHA, 2005). As amostras de efluente foram acidificadas com uma solução de HCl 1:1 e filtradas em disco de papel de filtro (MN 640W) previamente coberto com uma camada de auxiliar de filtração, obtida pela filtração de uma suspensão aquosa de Celite 1% e Caolim 0,5% (m/v) (Synth). Após a filtração de 40 ml de efluente, o papel de filtro contendo a gordura retida foi inserido em um cartucho de extração, que foi seco a 105°C por 30 min. A extração foi realizada no Determinador de gordura (equipamento TECNAL). A análise foi realizada utilizando-se copos de vidro de 250 mL limpos, previamente tarados após secagem (105°C) e resfriamento em dessecador, obtendo-se o P₁. Em cada copo, foram colocados 150 mL de hexano, sendo estes conectados ao extrator do equipamento já contendo o cartucho com a amostra, que foi 95% submerso no solvente. A extração foi realizada durante 1 h a 100°C. Após esse período, o hexano foi recuperado no próprio equipamento a 130°C e o volume residual de solvente foi evaporado. Os copos foram resfriados em dessecador e pesados (P₂). O teor de O&G foi determinado pela equação:

$$\text{O\&G} = \frac{(M_2 - M_1) \times 10^6}{V_a} \quad (3)$$

Onde:

O&G = teor de óleos e graxas (mg/L)

M₁ = massa (g) do copo

M₂ = massa (g) do copo com resíduo gorduroso

V_a = volume da amostra filtrada (mL)

4.4.7.4 Determinação do teor de ácidos livres

O termo “ácidos livres” foi empregado ao invés de ácidos graxos livres

devido à possibilidade de liberação de outros ácidos orgânicos durante o processo de tratamento. Para determinar o teor de ácidos livres, em alíquotas de 5,0 mL do efluente tratado e bruto foram adicionados 15 mL de etanol. Em seguida, essas alíquotas foram tituladas com solução de NaOH 0,005 mol/L com fenoftaleína (AOCS, 2004). O teor final de ácidos livres foi obtido através da equação:

$$Al = \frac{V(\text{NaOH}) \times M(\text{NaOH}) \times 1000}{V_a} \quad (4)$$

Onde:

Al = teor de ácidos livres (mmol/L)

V(NaOH) = volume de solução de NaOH usado na titulação (mL)

M(NaOH) = molaridade da solução de NaOH (mol/L)

V_a = volume de amostra (mL)

4.4.7.5 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio é a medida da quantidade de oxigênio equivalente ao conteúdo de matéria orgânica e outras de uma amostra que é suscetível à oxidação por um forte oxidante químico (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Na determinação da razão DBO₅/DQO, a DQO utilizada foi a total. As análises de DQO total foram realizadas pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR (CEPPA), que empregou o método do refluxo aberto (método 5220 B, APHA, 2005).

No teste de biodegradabilidade de Zahn-Wellens, foram realizadas análises de DQO dispersa (DQO_d). Na determinação da DQO_d, as amostras de efluente foram previamente centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min e o

sobrenadante foi utilizado nas análises. As determinações de DQO_d foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR, empregando-se o método do refluxo fechado (método 5220 D, APHA, 2005).

O princípio de ambos os métodos consiste na oxidação da matéria orgânica pelo dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido (H_2SO_4) contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra, sendo que a medida do consumo de oxigênio ocorrido durante a oxidação química da matéria orgânica é proporcional ao dicromato consumido. No método do refluxo aberto, a amostra é submetida a refluxo com quantidade conhecida de dicromato de potássio e o excesso desse oxidante é titulado com sulfato ferroso amoniacal. No método do refluxo fechado, o consumo de dicromato é medido por espectrofotometria (SBRT, 2006).

4.4.7.6 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio em cinco dias (DBO_5)

A DBO_5 corresponde à quantidade de oxigênio consumida pelos microrganismos de esgoto ou águas poluídas na oxidação biológica da matéria orgânica, quando mantida a uma dada temperatura ($20^\circ C$) por um intervalo de tempo convencionado (5 dias) (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

A análise da demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5) foi realizada pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR (CEPPA). A DBO_5 foi determinada pelo método 5210 B segundo procedimento padrão (APHA, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE CEPAS LIPOLÍTICAS

5.1.1 Seleção em meio sólido

Os resultados obtidos no teste em meio sólido para seleção de cepas produtoras de lipase estão apresentados na Tabela 7. A avaliação da produção de lipases foi feita visualmente, pela intensidade dos halos fluorescentes formados na placa contendo Rodamina, quando irradiada por luz ultravioleta.

TABELA 7 - TESTE EM MEIO SÓLIDO PARA A SELEÇÃO DE ESTIRPES FÚNGICAS PRODUTORAS DE LIPASES

Cepas fúngicas	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
5B	-	+/-	+/-	+/-	+/-
9C	-	-	-	-	-
10a II	-	-	-	-	-
10B	-	-	+/-	+/-	+/-
22a IV	+/-	+	+	+	+
23a IV	+/-	+	+	+	+
43a IV	+	++	++	++	++
51a II	+	++	++	++	++
64a V	+	++	++	++	++
tFf6B	-	-	-	-	+/-
8a	+	++	++	++	++

O repique das cepas foi realizado em ágar contendo Rodamina B 0,001% , óleo de oliva 1%, MgSO₄.7H₂O 0,2 g/L; K₂HPO₄ 0,7 g/L; KH₂PO₄ 0,4 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01%. A atividade foi avaliada diariamente pela presença de halos alaranjados fluorescentes por irradiação com UV 365nm. Os sinais (-); (+/-); (+) e (++) indicam sem, fraca, moderada e intensa fluorescência, respectivamente.

Do total de 11 cepas fúngicas testadas, as cepas 43a IV, 51a II, 64a V e 8a apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparadas com as demais cepas. A Figura 12 apresenta o aspecto de visualização de atividade lipásica neste ensaio para a cepa do gênero *Rhizopus* codificada como 64a V.

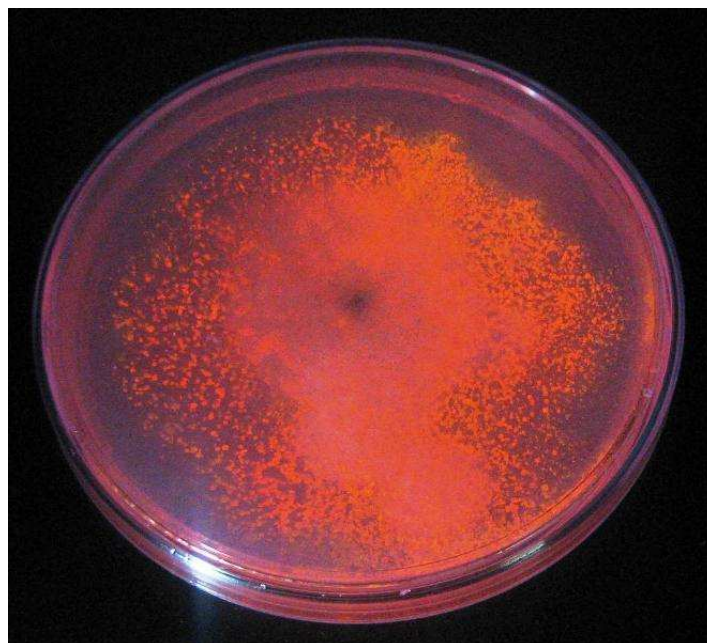


FIGURA 12 - HALOS FLUORESCENTES PRODUZIDOS PELA CEPA 64a V DO GÊNERO *Rhizopus* EM MEIO SÓLIDO CONTENDO RODAMINA B

Condições de cultivo: meio BDA contendo óleo de oliva 1%, corante Rodamina B 0,001%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L, extrato de levedura 2 g/L e Tween 80 0,01%, 30°C. O resultado positivo é indicado pela fluorescência alaranjada observada sob luz UV a 365 nm.

5.1.2 Seleção por Fermentação Submersa (FS)

As cepas 43a IV, 51a II, 64a V e 8a foram selecionadas para cultivos em FS por terem apresentado maior intensidade de fluorescência quando comparadas com as demais linhagens fúngicas. Dentre elas, a cepa 43a IV foi selecionada aleatoriamente para ser testada nas modificações feitas no processo fermentativo com o objetivo de melhorar a produção da lipase. Após a definição dos parâmetros da FS para esse fungo, os demais fungos

selecionados foram cultivados por FS para quantificar a produção da enzima. Nestes experimentos, o método de dosagem de atividade enzimática utilizado foi o do pNPP.

(a) Comparação do efeito do tipo de inóculo

As características do inóculo (tamanho e tipo) influenciam a obtenção do produto de interesse pelo processo fermentativo (PAPAGIANNI, 2004). Em fermentações anteriores utilizando o meio de cultivo de Elibol e Ozer (2000) e a inoculação direta de suspensão de esporos (DIAZ *et al.*, 2006), a produção de enzima foi insignificante. Assim, decidiu-se comparar a produção da enzima com dois tipos de inóculo: (a) direto: suspensão de esporos diretamente adicionada ao meio de cultura final para produção de lipases e (b) através de pré-inóculo: suspensão de esporos inoculada ao meio de cultura, que foi cultivado durante 48 h e, posteriormente, adicionado ao meio final de produção de lipases.

Os resultados (Figura 6) mostraram que a fermentação iniciada com o pré-inóculo, resultou na produção máxima de 1,1 U/mL de enzima em 24 h de cultivo, enquanto que a produção máxima de enzima com a suspensão de esporos diretamente inoculada no meio de produção de lipases foi de 0,48 U/mL em 18 h. Assim, o pré-inóculo de 48 h foi selecionado para as fermentações subseqüentes. Entre os fatores que determinam o desenvolvimento do fungo e a produção do composto de interesse, a quantidade, o tipo (esporo ou vegetativo) e a idade do inóculo são de prima importância (PAPPAGIANI, 2004). Colen, 2006 estudou o efeito da adição de 10^6 e 10^8 esporos/mL e de 10 % (v/v) de inóculo vegetativo de *Colleotrichum gloesporioides* cultivado por 24 h na produção de lipases por fermentação submersa. O autor não obteve diferença entre os rendimentos de produção de lipases, sendo a produção máxima (27 U/mL) alcançada com o mesmo tempo de fermentação (72 h). O efeito do tipo de inóculo, avaliado por Li e Zhong (1996) na produção de glutamato oxidase por *Streptomyces sp*, mostrou que a produção da enzima foi maior (2,7 U/mL em 33 h) com o emprego do pré-

cultivo do que com a aplicação direta da suspensão de esporos (1,0 U/mL em 36 h). El-Enshasy, Farid e El-Sayed (2000) mostraram que o tipo de inóculo de *Streptomyces natalensis* tinha um efeito significativo na produção do antibiótico natamicina. A mais alta concentração do antibiótico (1,4 g/L) foi obtida quando o inóculo estava na forma de esporos. Com o uso de pré-inóculo de 48 h, a produção foi de 0,96 g/L.

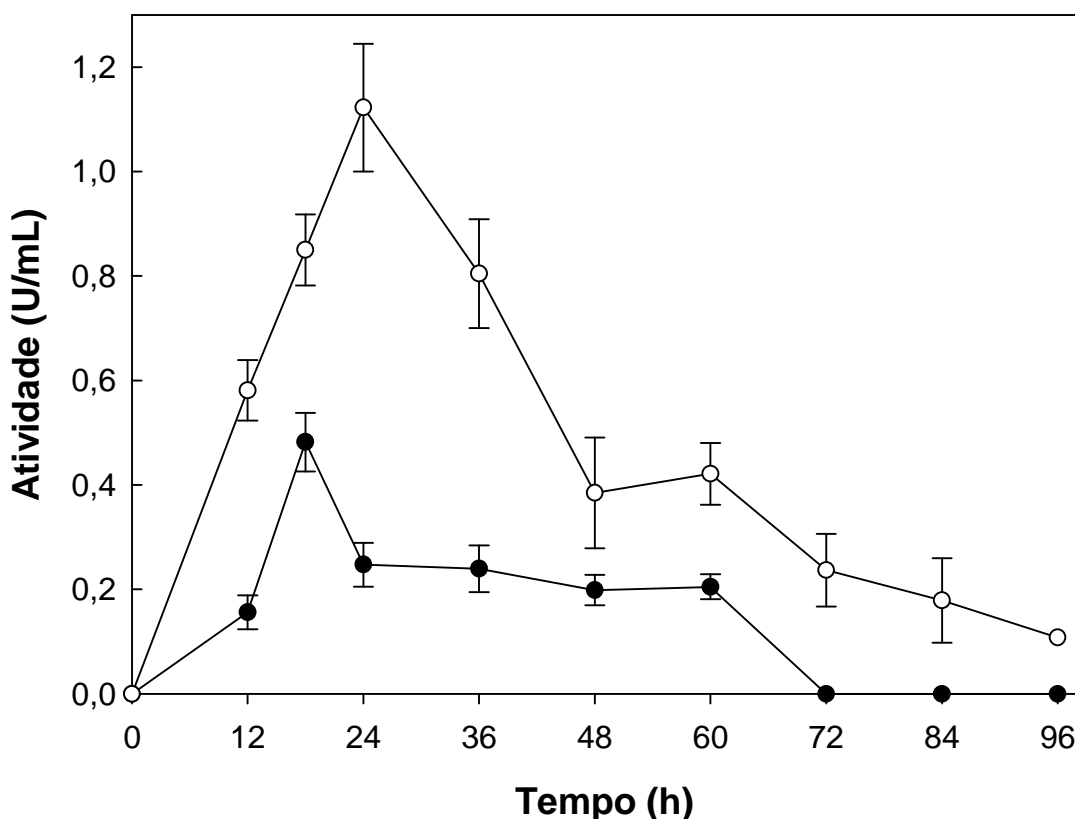


FIGURA 13 - EFEITO DO TIPO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LINHAGEM FÚNGICA 43a IV

(a) (●) direto: suspensão de esporos diretamente adicionada ao meio de cultura final para produção de lipases e (b) (○) pré-inóculo: suspensão de esporos adicionada ao meio de cultura cultivado durante 48 h e adicionado ao meio final de produção de lipases. Condições de cultivo para o pré-inóculo e meio de cultura final: meio composto por óleo de oliva 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L; 40°C, 180 rpm. Os valores são médias de triplicatas das atividades volumétricas obtidas. Dosagem pelo método do pNPP.

(b) Efeito da presença do óleo de oliva no pré-inóculo

No mesmo experimento, foi avaliado se a presença do óleo de oliva no pré-inóculo aumentaria a produção de lipases durante o cultivo. Os resultados (Figura 14) mostraram que a produção de lipase foi superior quando utilizado pré-inóculo sem o indutor óleo de oliva. Para o pré-inóculo sem indutor, em 24 h de fermentação foram produzidas 1,1 U/mL de enzima, enquanto que a produção máxima de lipase partindo de pré-inóculo com indutor, foi de 0,4 U/mL em 12 h de fermentação. Esta atividade refere-se somente à produção de enzima durante o cultivo no meio final de produção de lipases, pois não foi detectada atividade durante o cultivo do pré-inóculo.

Pode-se observar que a presença do indutor no pré-inóculo de 48 h não aumentou a produção de lipases no cultivo quando comparado com o pré-inóculo sem indutor. A provável explicação para esse resultado pode estar relacionada ao efeito do tempo de fornecimento do indutor ao meio de cultura. Zhang, Wei e Tong (2003) adicionaram o indutor Tween 85 para produção de lipases de *Candida rugosa* nos tempos 0, 6 e 18 h de cultivo. A adição nos tempos de 0 e 6 h foi mais efetiva para produção da enzima do que no tempo de 18 h, sendo inferido que provavelmente o indutor ativou a expressão de algum dos genes *lip* no estágio inicial de crescimento da célula.

Outro estudo (DEIVE *et al.*, 2009), referente ao tempo efetivo de adição do indutor no meio de cultivo, mostrou que a adição de óleo de girassol após 10 h de cultivo de *Thermus thermophilus* HB27 (início da fase exponencial) resultou na produção de 591 U/L de lipases contra 517 U/L e 513 U/L obtidas com a adição do indutor no tempo inicial e 5 h, respectivamente. O tempo também foi importante na produção de lipases por *Rhizopus arrhizus*. Após 48 h de cultivo sem óleo de oliva, a atividade lipolítica era de 52 U/mL. Com a adição do indutor, a atividade passou para 157 U/mL em 96 h de cultivo (LI; WANG; TAN, 2006). Portanto, no presente trabalho, o pré-inóculo sem óleo de oliva entrou em contato com o indutor após 48 h de crescimento do microrganismo, o que poderia explicar a maior produção de lipases quando

comparado com o pré-inóculo contendo o indutor desde o início do crescimento do microrganismo.

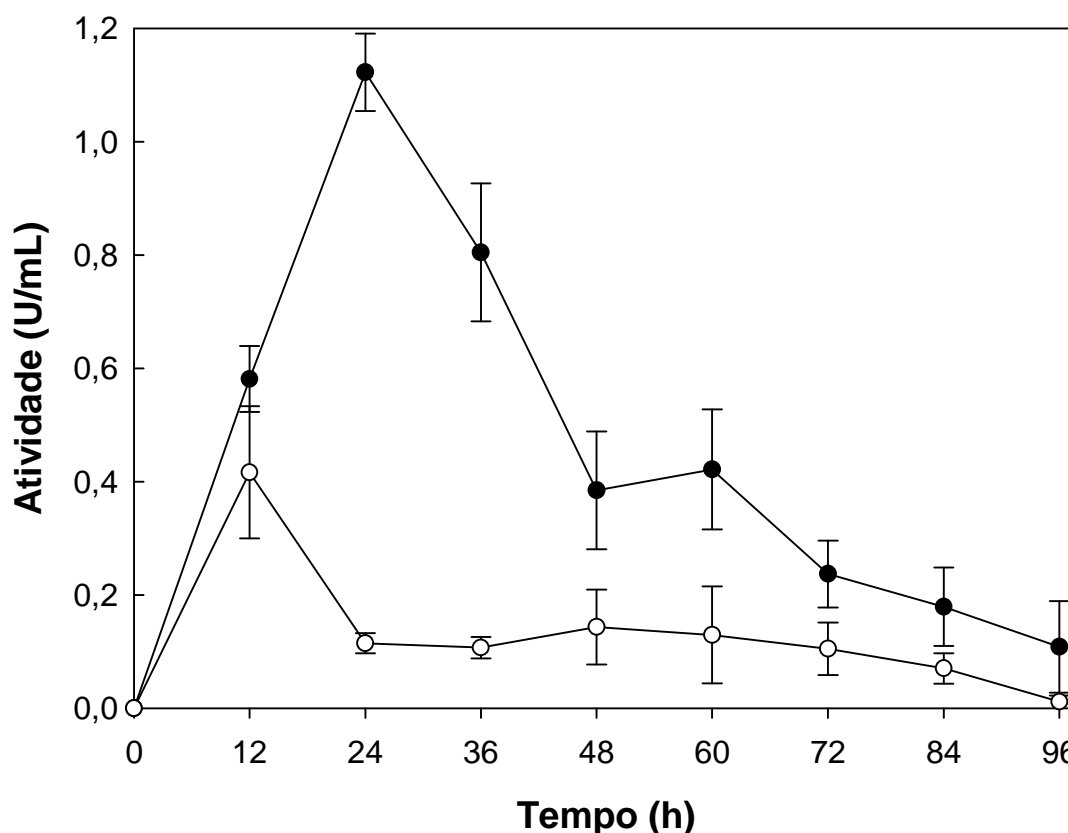


FIGURA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE OLIVA NO PRÉ-INÓCULO NA PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LINHAGEM FÚNGICA 43a IV

Pré-inóculo de 48 h sem (●) e com óleo de oliva (○). Condições de cultivo: meio composto por óleo de oliva 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7g/L; KH_2PO_4 0,4g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, 40°C, 180 rpm. Os valores são médias de triplicatas das atividades volumétricas obtidas. Dosagem pelo método do pNPP.

A partir dos resultados obtidos para cepa a 43a IV, os cultivos para as linhagens 64a V, 51a II e 8a foram realizados com pré-inóculos de 48 h, sem óleo de oliva.

A comparação entre os resultados dos cultivos de cada linhagem fúngica (Figura 15) mostra que a maior produção de lipase (1,1 U/mL) foi obtida com a linhagem 43a IV em 24 h. A linhagem 8a produziu 0,64 U/mL em 24 h, a 64a V produziu 0,18 U/ml em 36 h e com a cepa 51a II não houve produção da

enzima. Os resultados obtidos com a cepa 43a IV são diferentes daqueles informados pessoalmente pelo Professor Jesús Cordova, Universidade de Guadalajara, México, que obteve 2,8 U/mL contra o substrato *p*NPP em 16 h de cultivo, empregando o meio descrito por Diaz *et al.* (2006), composto por *corn steep liquor*, peptona e sais. Cabe a ressalva que neste trabalho também foi testado este meio, porém não houve produção de lipase com nenhuma das cepas fúngicas (método *p*NPP).

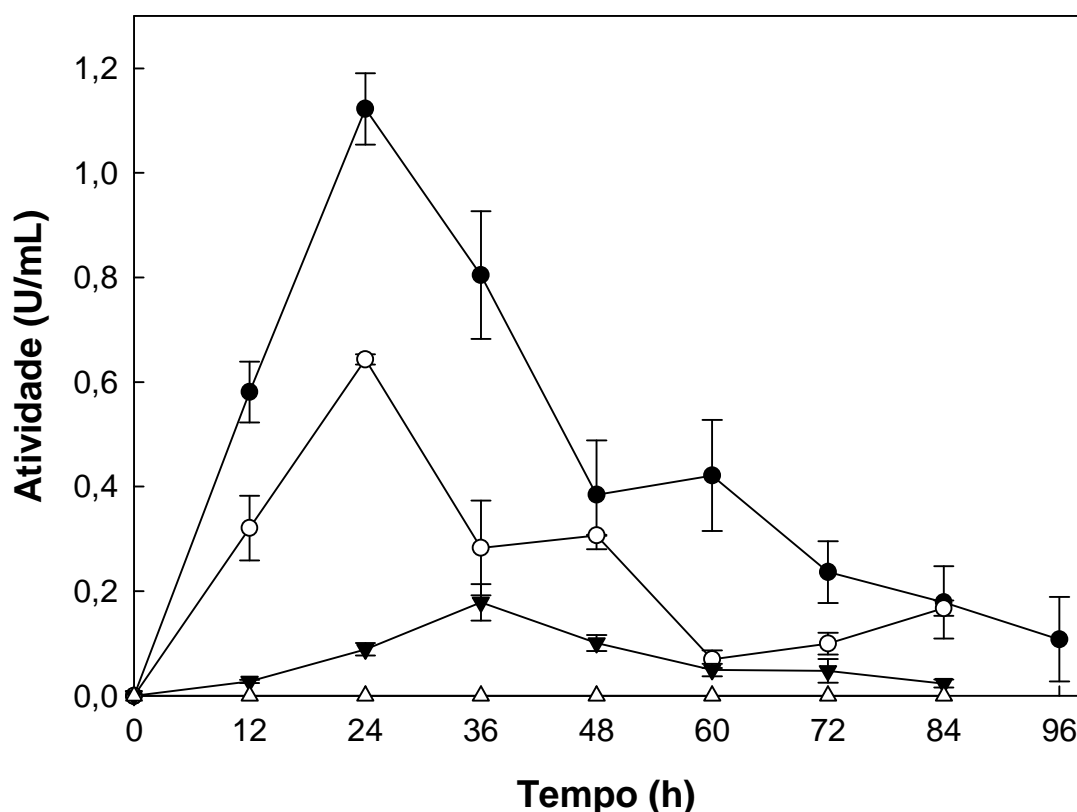


FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELAS DIFERENTES CEPAS DO GÊNERO *Rhizopus*

Cepas 43a IV (●), 8a (○), 64a V (▼) e 51a II (Δ) cultivadas nas seguintes condições: meio composto por óleo de oliva 1%, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/L; K₂HPO₄ 0,7g/L; KH₂PO₄ 0,4g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, 40°C, 180 rpm. Os valores são médias de triplicatas das atividades volumétricas obtidas. Dosagem pelo método do *p*NPP.

A baixa produção de lipases obtida por fermentação submersa (FS) para o gênero *Rhizopus* vem sendo reportada na literatura (LI; WANG; TAN; 2006; YANG *et al.*, 2005). Na tentativa de aumentar a produção de lipases do fungo

Rhizopus arrhizus, Elibol e Özer (2000) e Rajendram e Thangavelu (2009) recorreram às ferramentas estatísticas. Os primeiros empregaram a metodologia de superfície de resposta para avaliar o efeito da concentração de glucose e óleo de milho sobre a produção da enzima e obtiveram 0,36 U/mL de atividade lipolítica contra tributirina. Já os últimos empregaram o método estatístico de Plackett–Burman para selecionar dentre 20 fatores, aqueles que teriam alta influência sobre a produção de lipases e a máxima produção alcançada foi de 3,98 U/mL em meio otimizado. Esses resultados confirmam a baixa produção de lipases dos fungos do gênero *Rhizopus* por FS.

A partir dos experimentos em FS, foi selecionada a cepa 43a IV para a continuidade dos estudos de produção da enzima por FES.

5.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Os estudos de FES foram realizados com a estirpe 43a IV, previamente selecionada. Essa cepa, isolada da polpa de coco nas regiões tropicais de Jalisco (México), havia sido testada para produção de lipase apenas por FS pelo professor Jesús Cordova (Universidade Guadalajara, México).

5.2.1 Seleção de substratos

Os substratos selecionados para os estudos de FES foram farelo da semente de girassol e bagaço da cana-de-açúcar. A principal razão para a utilização do farelo de girassol foi o fato de ter sido empregado com sucesso anteriormente para a produção de lipases (FERNANDES, 2007). No entanto, esse substrato não é um resíduo agroindustrial, pois foi obtido da moagem das sementes de girassol. A composição centesimal do farelo da semente de girassol, determinada de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz

(2005), foi a seguinte: lipídios 25,9%; carboidratos totais 45,7%; proteínas 18,0 e fibras 28,5%.

O bagaço da cana foi o outro sólido testado na FES. Os motivos que levaram à seleção desse substrato foram os seguintes: (1) o bagaço é um resíduo agroindustrial, (2) esse resíduo por ser considerado um sólido inerte, devido a sua estrutura fibrosa, que é mantida praticamente constante durante o processo fermentativo, apresenta como vantagem o fornecimento do produto de interesse com maior grau de pureza quando comparado com um substrato facilmente consumido pelo microrganismo (OOIJKAAS *et al.*, 2000; RAIMBAULT, 1998). A composição centesimal do bagaço de cana apresentou as seguintes porcentagens: lipídios 0,49%; carboidratos menos de 0,1%; proteínas 0,88%, fibras 88,20%, umidade 9,01% e resíduo mineral fixo 2,04%. A umidade, resíduo mineral fixo e lipídios foram analisados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005), proteínas e fibras segundo os métodos da Association of Analytical Communities (AOAC) (2005) e os carboidratos calculados de acordo com a Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003 (BRASIL, 2003).

Inicialmente, os substratos foram testados isoladamente. A produção de lipases ocorreu somente com o farelo de girassol, sendo a máxima de 4,0 U/gSS no tempo de 48 h (Figura 16).

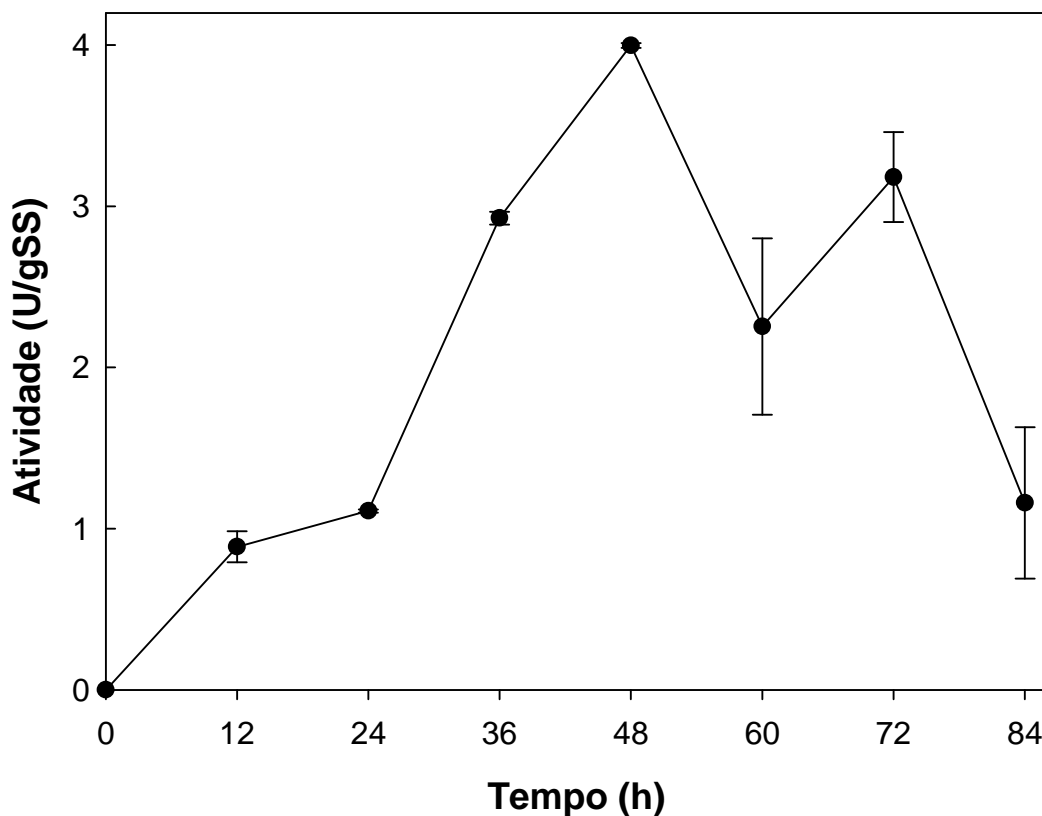


FIGURA 16 - PRODUÇÃO DE LIPASES PELA CEPA 43a IV EM FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL

Condições de cultivo: substrato farelo da semente de girassol; umidade inicial 58,2%, temperatura 40°C. Os resultados são médias de dupli catas das atividades obtidas por grama de sólido seco (U/gSS). Dosagem pelo método do pNPP.

No bagaço de cana, suplementado com meio de cultura emulsificado com óleo de oliva 5% (v/v), meio de cultura emulsificado com sebo de origem animal 5% (v/v), meio de cultura emulsificado com gordura do efluente de laticínios 5% (m/v) e o bagaço de cana umedecido com o próprio efluente de laticínios não houve crescimento do fungo e nem produção da enzima.

A ausência de produção de lipase no bagaço de cana impregnado com os meios descritos na seção 4.3.3, não inviabiliza a função do bagaço de cana no processo fermentativo. Provavelmente o bagaço deveria ter sido impregnado com o meio líquido mais concentrado em nutrientes para aumentar a disponibilidade desses ao fungo e, conseqüentemente, facilitar a colonização do bagaço pelo microrganismo. Diaz *et al.* (2006) concentraram

aproximadamente duas vezes o meio de cultura contendo óleo de oliva para impregnar com 2 mL cada 1 g de bagaço de cana para produção de lipases por *R. homothallicus* e obtiveram, após modificações na fonte de carbono e nitrogênio e adição de oligonutrientes, 1500 U/gSS após 12 h de fermentação. Além disso, o tempo de fermentação poderia ter sido estendido, conforme observado para a produção de lipases por *Aspergillus niger*, cultivado por 120 h em bagaço de cana umedecido com água para produzir 5,0 U/gSS de atividade lipolítica (KAMINI; MALA; PUVANAKRISHNAN, 1998).

A detecção de atividade lipolítica no farelo de girassol mostrou que esse substrato possui os nutrientes necessários para o crescimento do fungo e o indutor para produção da enzima. A literatura relata que o uso de girassol como indutor na produção de lipases tanto por fermentação submersa quanto fermentação sólida é feito na forma de óleo. O óleo de girassol é composto majoritariamente pelo ácido linoléico (68%), seguido pelo ácido oléico (19-21%) e ácido palmítico (7%) (WANG; XU; SHAN, 2008).

Wang, Xu e Shan (2008) testaram diferentes indutores na produção de lipase por *Rhizopus chinensis* em FS e constaram que o melhor indutor foi o óleo de oliva, seguido da soja e girassol, com atividades relativas de 165%, 106%, 71,5%, respectivamente, quando comparadas com o meio basal sem adição de indutor. A razão para maior preferência do óleo de oliva como indutor em relação ao óleo de girassol pode ser devida à predominância do tipo de ácidos graxos nos dois indutores e conseqüente preferência do microrganismo, pois, enquanto o óleo de oliva tem 71% de ácido oléico, o de girassol tem 68% de linoléico. No entanto, a seleção do indutor depende do microrganismo em estudo. Como exemplo, Rodriguez *et al.* (2006) suplementaram bagaço de cana com diferentes tipos de óleo (oliva, milho e girassol) e obtiveram atividades lipolíticas similares (596, 504 e 493 U/gSS, respectivamente), para todos os indutores testados com *Rhizopus homothallicus*. O microrganismo *Thermus thermophilus* HB27 teve a produção de lipases aumentada em torno de 40% em relação ao controle (372, 2 U/mL) com a adição dos indutores óleo de oliva e girassol (1 g/L) (DEIVE *et al.*, 2009).

Outro ponto chave na produção de lipases é o efeito repressor da glucose em meio líquido. O trabalho realizado por Hsu, Lee; Shaw (2008) mostrou que em meios líquidos contendo glucose, os níveis de expressão dos genes LIP de *C. rugosa* foram baixos, com repressão significativa de LIP2. O efeito repressor da glucose também foi verificado por Elibol e Özer (2000) na produção de lipases de *Rhizopus arrhizus*, onde concentrações de glucose acima de 1 g/L acarretaram a inibição da produção de lipases. Contrariamente ao que é observada para FS, a repressão catabólica da glucose na produção de lipases por FES é baixa (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). Como exemplo, o trabalho realizado por Azeredo *et al.* (2007) mostrou que o substrato torta de babaçu suplementado com glucose não provocou nenhuma repressão catabólica na produção da lipase por *Penicillium restrictum*, ao contrário do que foi observado na FS. Kamini, Mala e Puvanakrishnan (1998) mostraram que na presença de glucose e sacarose, não ocorreu inibição da produção de lipase por *Aspergillus niger* cultivado em torta do óleo de gergelim; no entanto, na presença de amido a produção foi totalmente inibida. No presente trabalho, a produção de lipases ocorreu no farelo de girassol contendo 47,9% de carboidratos (FERNANDES, 2007). Como descrito acima, essa produção ocorreu provavelmente devido à não interferência repressora da glucose ou simplesmente pelo fato do fungo absorver primeiramente moléculas simples disponíveis no farelo de girassol.

A máxima atividade obtida para a cepa 43a IV utilizando farelo de girassol como substrato e o método espectrofotométrico do pNPP de dosagem de atividade pode ser considerada baixa (4,0 U/gSS), se comparada com as reportadas na literatura, para fungos, em trabalhos que utilizam o mesmo método de dosagem. Por exemplo, a atividade lipolítica de *Aspergillus niger* cultivado em farelo de trigo foi de 630 U/gSS (MAHADIK *et al.*, 2002). A atividade lipolítica contra pNP-laurato obtida de *Penicillium simplicissimum* cultivado na torta de babaçu foi de 77 U/gSS (GUTARRA *et al.*, 2009). A determinação dessas atividades depende da eficiência do método de extração da enzima contida no sólido fermentado. No trabalho de Mahadik *et al.* (2002), a atividade lipolítica de 630 U/gSS foi obtida por extração do sólido fermentado com solução contendo NaCl 1% e Triton X-100 0,5% após 2 h de incubação, a

25°C e 180 rpm. Quando a extração foi realizada com água destilada, o valor da atividade lipolítica foi de 230 U/gSS. A extração de lipases do farelo da semente de girassol foi feita com solução de NaCl 2% após 1 h de incubação, a 30°C e 200 rpm.

A literatura relata que, dependendo das características químicas do substrato, torna-se necessária a suplementação com nutrientes sintéticos ou associação com outros substratos (AZEREDO *et al.*, 2007; FERNANDES, 2007; DIAZ *et al.*, 2006; BENJAMIN; PANDEY, 2004; MAHADIK *et al.*, 2002; GOMBERT *et al.*, 1999; BUSHAN *et al.*, 1994). Cordova *et al.* (1998) obtiveram 5,0 U/g e 2,7 U/g com o cultivo de *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis*, respectivamente, no bagaço de cana. Porém, esses valores subiram para 20,2 U/gSS e 79,6 U/gSS quando os fungos foram cultivados com bagaço e torta da extração do óleo de oliva. A produção máxima de lipase por *P. restrictum* foi de 30,3 U/gSS após 24 h de cultivo, utilizando a torta de babaçu impregnada com 2% de óleo de oliva (GOMBERT *et al.*, 1999). Mahadik *et al.* (2002) verificaram que *Aspergillus niger* cultivado em farelo de trigo, impregnado com meio sintético contendo óleo de oliva 1% (m/v), produziu 630 U/gSS de lipases em 120 h de cultivo.

O farelo da semente de girassol é um substrato natural, cujas características químicas favoreceram o crescimento e produção de lipases pelo fungo 43a IV. No entanto, sabe-se que substratos naturais são geralmente degradados e, como conseqüência, a geometria e as características do meio mudam, levando a uma diminuição na transferência de calor e massa, o que seria extremamente desvantajoso em um processo de produção de larga escala. Porém, essa desvantagem pode ser reduzida com o uso de um substrato inerte cujas características são praticamente mantidas durante o processo fermentativo, permitindo um melhor controle de transferência de calor e massa (OOIJKAAS *et al.*, 2000). Diante dessas observações, decidiu-se avaliar a mistura do farelo de semente de girassol com bagaço de cana e as primeiras proporções testadas foram 1:1 e 1:3, respectivamente.

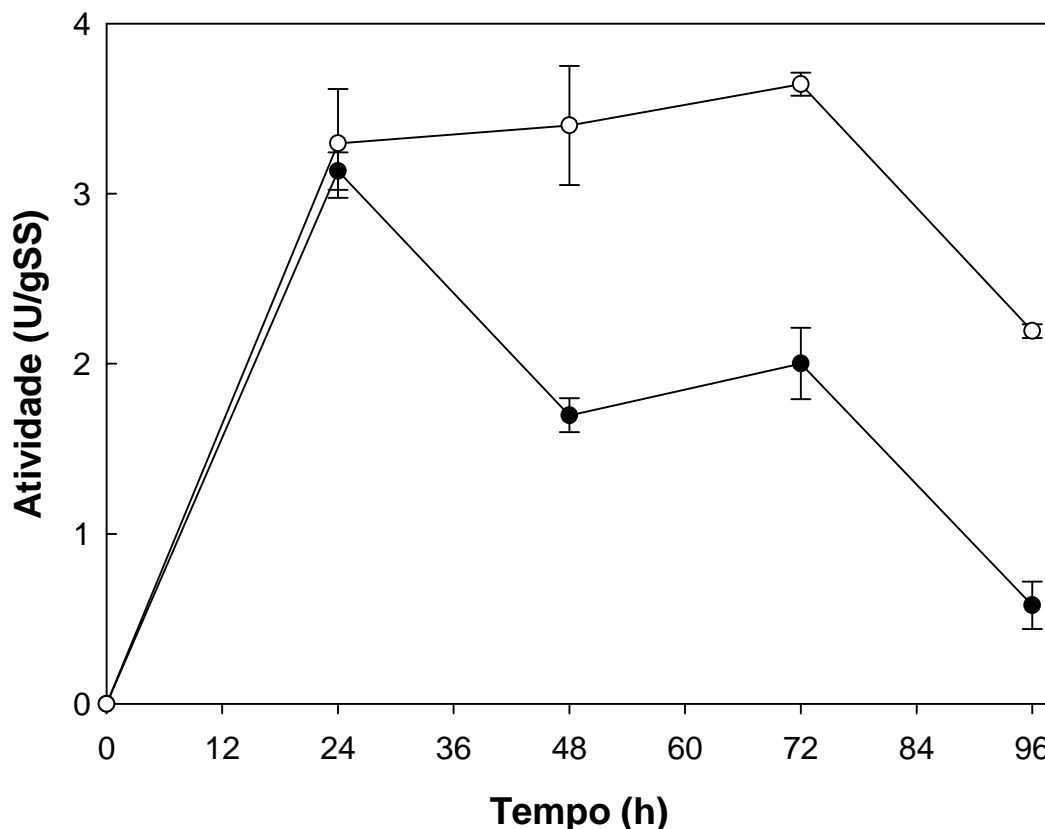


FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE LIPASES EM MISTURAS DE FARELO DE GIRASSOL E BAGAÇO DE CANA PELO FUNGO 43a IV

Condições de cultivo: substrato farelo da semente de girassol e bagaço de cana nas proporções 1:1 (○) e 1:3 (●); umidades iniciais 72,8% (○) e 78,2% (●), temperatura 40°C, pH inicial 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades por grama de sólido seco (U/gSS). Dosagem pelo método do *pNPP*.

A produção de lipases ocorreu nas misturas de farelo da semente de girassol e bagaço de cana (Figura 17). As atividades lipolíticas obtidas após 24 h de incubação foram 3,3 U/gSS e 3,1 U/gSS para as misturas 1:1 e 1:3, respectivamente. Esses resultados mostraram o efeito positivo da adição do bagaço de cana ao farelo de girassol, pois houve uma redução no tempo de fermentação de 48 h (apenas farelo de girassol) para 24 h (mistura de farelo e bagaço). Porém, com o decorrer da fermentação, observou-se que a produção de lipases diminuiu após 18 h de fermentação para a proporção 1:3 e continuou até 72 h para a mistura 1:1, indicando a relação entre a produção de enzima e a disponibilidade de nutrientes. Essa relação foi verificada na produção de lipases por *Aspergillus niger* na mistura farelo de trigo e torta de óleo de

gergelim, onde a adição de 25% de torta de gergelim em 75% de farinha de trigo, aumentou a produção de lipases de 271,6 U/gSS para 384 U/gSS em 72 h de fermentação (MALA *et al.*, 2007).

5.2.2 Estudo do efeito de diferentes proporções de farelo de girassol e bagaço de cana na produção de lipase

Considerando que a produção máxima da enzima foi semelhante para ambas as misturas de farelo de girassol e bagaço de cana no tempo de 24 h (Figura 17), que o farelo de girassol não é um resíduo agroindustrial e que não seria interessante a aplicação de um sólido fermentado contendo uma elevada concentração de lipídeos em um efluente cujo problema é a gordura, decidiu-se testar o efeito de diferentes proporções de farelo de girassol e bagaço de cana na produção de lipases, investigando-se também a produção de lipases em tempos inferiores a 24 h. Para isso, as proporções testadas foram as seguintes:

- 1 g de farelo de girassol e 9 g de bagaço de cana (1:9);
- 2,5 g de farelo de girassol e 7,5 g de bagaço de cana (1:3);
- 5 g de farelo de girassol e 5 g de bagaço de cana (1:1);
- 7,5 g de farelo de girassol e 2,5 g de bagaço de cana (3:1);
- 10 g de girassol (1:0, controle)

De acordo com os resultados (Figura 18), a produção máxima de lipases ocorreu no tempo de 18 h em todas as condições de mistura de substratos, sendo que a mistura 1:1 bagaço de cana e farelo de girassol resultou na maior atividade lipolítica (4,7 U/gSS). Para o substrato farelo de semente de girassol, o pico máximo de produção da enzima, 4,5 U/gSS, continuou ocorrendo em 48 h.

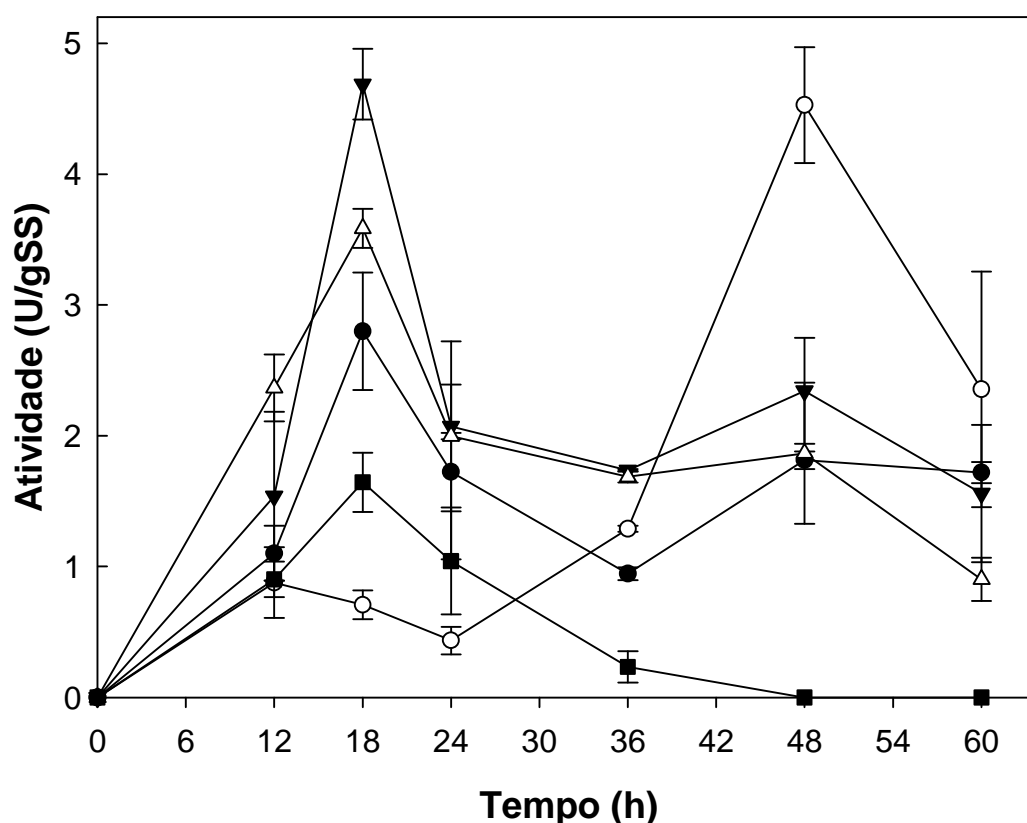


FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE LIPASES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE MISTURAS DE FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL E BAGAÇO DE CANA PELO FUNGO 43a IV

Condições de cultivo: substrato farelo da semente de girassol e bagaço de cana nas proporções: 1,0g/9,0g (■), 2,5g/7,5g (Δ), 5,0g/5,0g (▼), 7,5g/2,5g (●) e 10,0g/0,0g (○); umidades iniciais para as proporções 75-79% e para o farelo da semente de girassol 60,2%; temperatura 40°C, pH 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades obtidas por grama de sólido seco (U/gSS). Dosagem pelo método do pNPP.

A diferença no tempo de produção de lipases provavelmente ocorreu devido à menor compactação do substrato quando se utilizou o bagaço de cana na mistura, o que permitiu maior aeração do meio, facilitando o crescimento do microrganismo e a produção da enzima, conforme pode ser observado na Figura 19, que mostra o aspecto dos substratos após 18 h de cultivo.

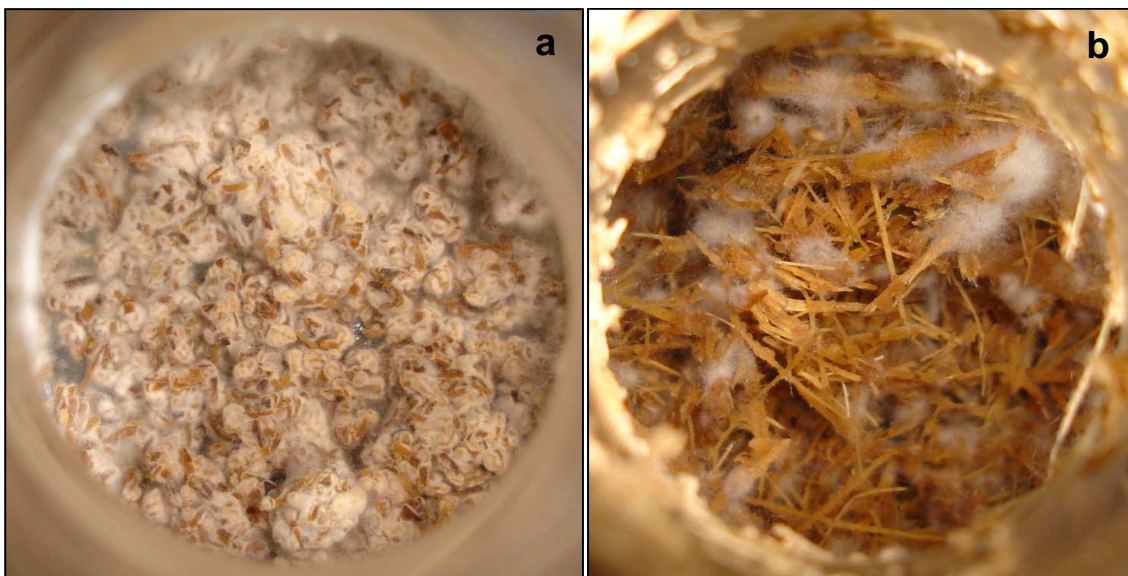


FIGURA 19 – ASPECTO DOS SUBSTRATOS FERMENTADOS COM A CEPA 43a IV APÓS 18 h DE CULTIVO A 40°C

(a) farelo da semente de girassol e (b) mistura farelo de girassol e bagaço de cana (1:3)

No tempo de 18 h de fermentação, observa-se que, quanto menor o valor da massa de farelo de girassol utilizada em relação ao bagaço de cana, menor a produção lipolítica detectada, indicando novamente a relação de nutrientes e produção da enzima. Ao contrário do resultado obtido na Figura 17, na proporção de 1:1, a atividade lipolítica diminui após 18 h de fermentação, porém, manteve-se superior em relação a todas as proporções até 60 h de fermentação. Apesar da atividade lipolítica obtida na mistura 1:3 ter sido menor (3,6 U/gSS) do que na mistura 1:1, e considerando o objetivo da aplicação do sólido fermentado em efluentes, onde é desejável o emprego de um sólido com menor carga orgânica e menor teor de lipídeos, adotou-se, para as futuras fermentações, a mistura de substratos 1:3.

5.2.3 Comparação da produção de lipases por diferentes estirpes de fungos filamentosos

Como a cepa 43a IV apresentou atividade lipolítica na FES, o objetivo desse experimento foi verificar se as outras cepas que apresentaram atividade na FS (item 5.1.2, Figura 15) poderiam produzir lipases por FES. Para tanto, foram testadas as cepas 8a e 64a V, cujas atividades pela FS foram 0,64 U/mL em 24 h de cultivo e 0,18 U/mL em 36 h de cultivo, respectivamente, nas mesmas condições de FES utilizadas para a cepa 43a IV.

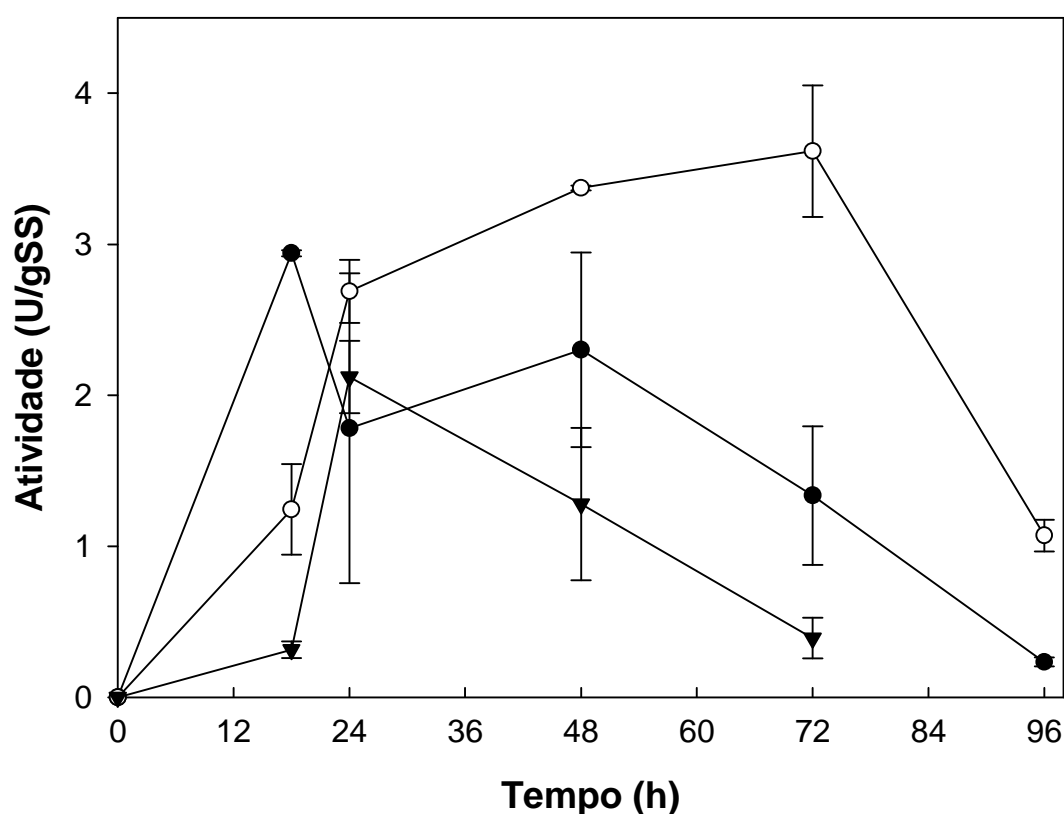


FIGURA 20 – PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO COM FUNGOS DO GÊNERO *Rhizopus*

Fungos testados: 43a IV (●), 8a (○), 64a V (▼). Condições de cultivo: substrato farelo da semente de girassol e bagaço de cana, 1:3; umidade inicial 77,8%, temperatura 40°C, pH 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades por grama de sólido seco (U/gSS). Dosagem pelo método do pNPP.

Os resultados acima (Figura 20) mostram que apenas o fungo 43a IV apresentou maior velocidade inicial de produção de enzima. A cepa 64a V apresentou um pico máximo de produção de 2,1 U/gSS em 24 h de fermentação, enquanto a cepa 8a apresentou maior pico de atividade (3,61 U/gSS) em 72 h. Portanto, mesmo não tendo o maior valor de atividade dentre os fungos testados, a cepa 43a IV continuou sendo empregada em trabalhos subseqüentes, devido ao menor tempo de cultivo requerido para a produção de lipases.

Neste ponto do trabalho, o fungo 43a IV foi enviado para caracterização no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP), onde foi caracterizado como *Rhizopus microsporus* e catalogado como *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM (ANEXO II).

5.2.4 Determinação direta da atividade lipolítica no sólido fermentado por titulometria

Todos os valores de atividade apresentados nos itens anteriores foram determinados pelo método espectrofotométrico do pNPP (item 4.4.6.1), após extração da enzima do sólido fermentado. Porém, tendo em vista a aplicação direta do sólido fermentado no efluente, o objetivo deste experimento foi determinar a atividade lipolítica do sólido fermentado e liofilizado pelo método titulométrico, que é específico para lipases. Para tanto, *R. microsporus* foi cultivado por 18 h na mistura farelo da semente de girassol e bagaço de cana (1:3), a 40°C, 79% de umidade inicial e liofilizado.

Para a determinação da atividade por titulometria foram testados três substratos: tributirina, tricaprilina e trioleína. Esses substratos, como descrito em 4.4.6.2, foram utilizados na forma de emulsão e os resultados estão apresentados na Figura 21.

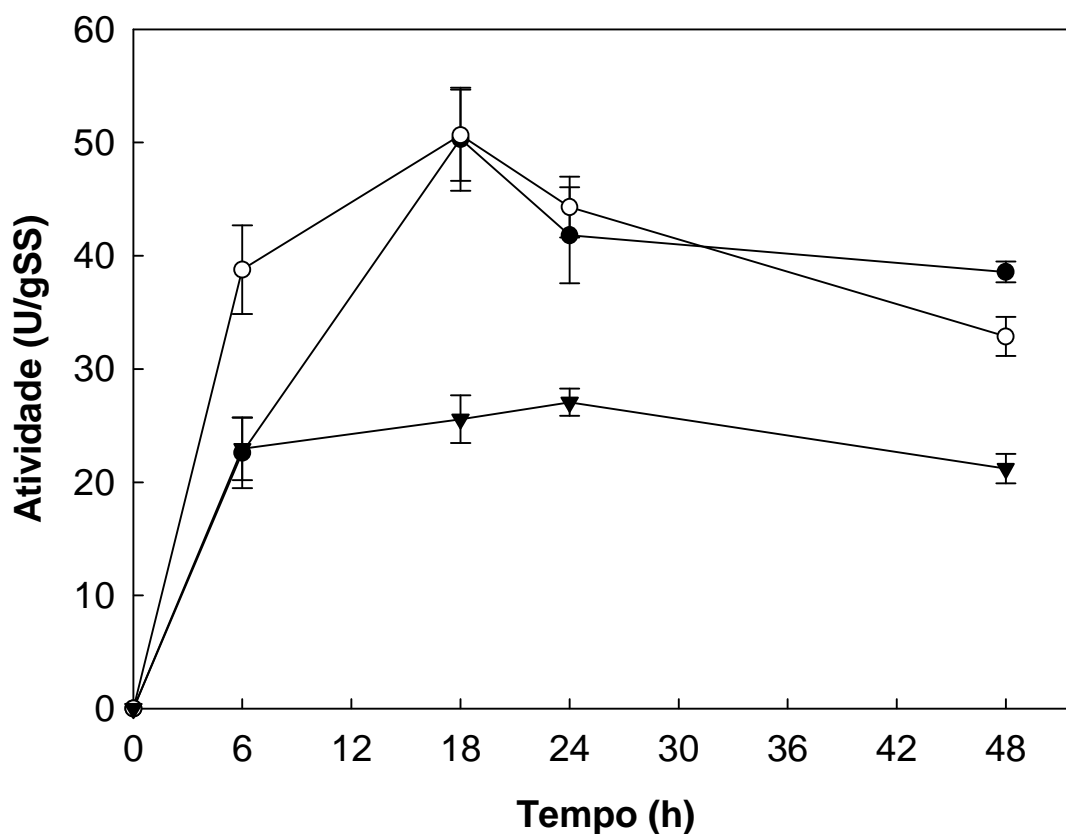


FIGURA 21 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Substratos testados: tributirina (●), tricaprilina (○) e trioleína (▼). Meio reacional: solução de Tris-HCl 2,5 mM e NaCl 150mM, CaCl₂ 2mM e goma arábica 3%. Condições de reação: temperatura 37°C e pH 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades obtidas por grama de sólido seco (U/gSS).

O sólido fermentado apresentou maior atividade lipolítica (50,6 U/gSS) contra os substratos tributirina e tricaprilina (Figura 21), e uma atividade menor (25,6 U/gSS) contra a trioleína. Ao contrário do uso direto do sólido fermentado na determinação da atividade lipolítica pelo método titulométrico, os trabalhos descritos na literatura dosam a atividade lipolítica no extrato aquoso obtido do sólido fermentado, sendo o óleo de oliva, o substrato utilizado. Portanto, valores de 17,3 U/gSS de atividade lipolítica contra óleo de oliva já foram determinados a partir do extrato aquoso de torta de babaçu cultivada por *Penicillium restrictum* (AZEREDO *et al.*, 2007; GOMBERT *et al.*, 1999), bem como por *Penicillium simplicissimum* (26 U/gSS) (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Para o extrato aquoso contendo lipases obtido de farelo de soja cultivado por

P. verrucosum (KEMPKA *et al.*, 2008) e de torta de gergelim cultivado por *Aspergillus niger* (MALA *et al.*, 2007), os valores de atividades foram 43 e 384 U/gSS, respectivamente. A atividade lipolítica de *Rhizopus homothallicus* cultivado em bagaço de cana foi em torno de 1500 U/gSS contra tricaprilina (DIAZ *et al.*, 2006).

As atividades contra a trioleína (TC18) são importantes porque demonstram que existe uma lipase verdadeira no material sólido (JAEGER; REETZ, 1998). No entanto, foi escolhida a tricaprilina (TC8) como substrato para continuidade dos experimentos devido à sua maior solubilidade e conseqüente facilidade de preparo da emulsão.

Para avaliar se realmente seria necessária a emulsificação da tricaprilina nas dosagens lipolíticas por titulometria, testou-se a atividade lipolítica do sólido fermentado com tricaprilina emulsificada e não emulsificada (Figura 22). Os resultados mostraram que o valor da atividade medida com substrato emulsificado foi praticamente o dobro (51,1 U/gSS) quando comparado com o substrato não emulsificado (25,0 U/gSS). A maior atividade encontrada no sólido fermentado por *R. microsporus* em sistema emulsionado mostra que a enzima é ativada pela existência da interface água/óleo (ativação interfacial) e confirma a presença de uma lipase verdadeira no sólido fermentado. Sarda e Desnuelle (1958) definiram lipases como um grupo especial de esterases que exibem o fenômeno de ativação interfacial. Outros autores, entretanto, relataram que algumas lipases não apresentam as propriedades da ativação interfacial, mas ao contrário de esterases comuns, hidrolisam ésteres de ácido graxo de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998). Portanto, a enzima presente no sólido fermentado apresenta duas propriedades que a caracterizam como uma lipase: a atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa e o fenômeno de ativação interfacial.

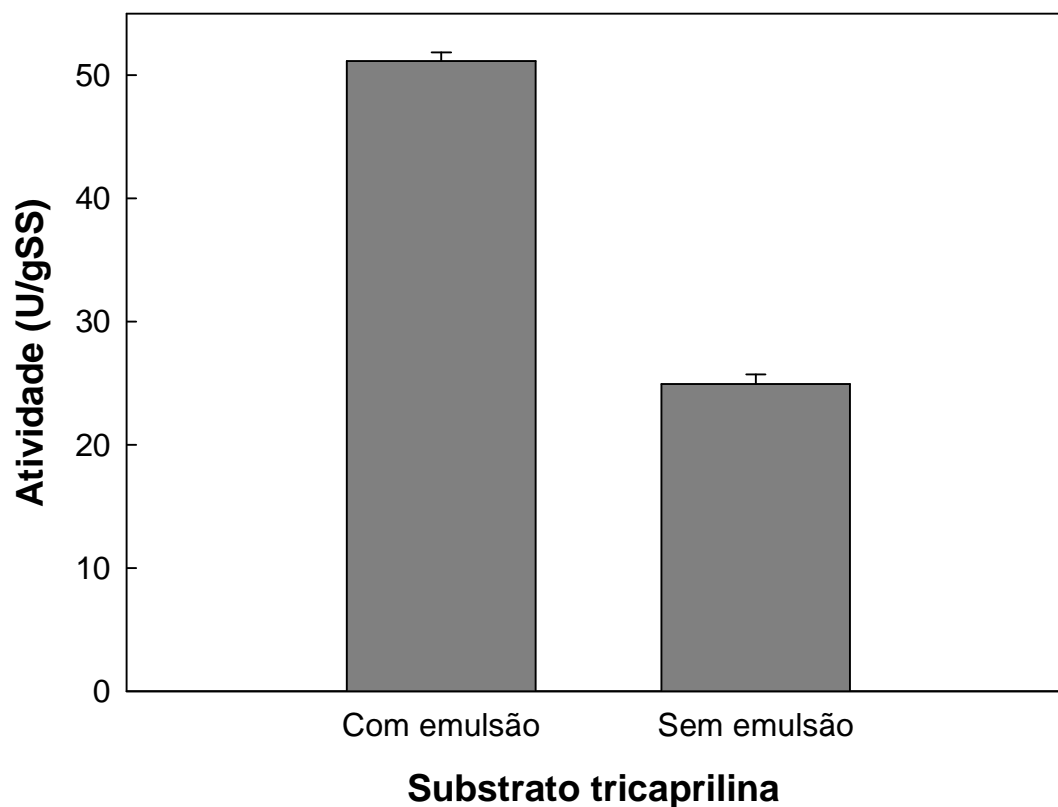


FIGURA 22 - EFEITO DA PRESENÇA DE EMULSÃO NA ATIVIDADE DA LIPASE PRODUZIDA POR *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Meio reacional: solução de Tris-HCl 2,5 mM e NaCl 150mM, CaCl₂ 2mM e goma arábica 3%. Condições de reação: temperatura 37°C e pH 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades por grama de sólido seco (U/gSS).

5.2.5 Efeito de diferentes condições de tratamento dos substratos de FES na produção da atividade lipolítica

O objetivo desse experimento foi confirmar, com o método titulométrico, os resultados obtidos com o método do pNPP em relação à proporção e ao tempo de fermentação para a máxima produção de lipases. Além disso, visando simplificar o processo de FES, foram também testadas condições de preparo dos substratos, a saber, o efeito da lavagem do bagaço de cana e da classificação por peneiramento de ambos os substratos na produção da enzima. As condições testadas estão descritas na Tabela 8.

TABELA 8 - PROPORÇÕES DOS SUBSTRATOS FARELO DA SEMENTE DE GIRASSOL (FSG) E BAGAÇO DE CANA DE-AÇÚCAR (BCA) E CONDIÇÕES DE PREPARO DESSES SUBSTRATOS

Proporções dos substratos (FSG: BCA)	Condições de tratamento dos substratos
1:3	Bagaço: lavado, seco, não tamisado
1:3	Bagaço: não lavado, não tamisado
1:3	Sementes de Girassol: ligeiramente trituradas e bagaço: lavado, não tamisado
1:9	Bagaço: lavado, seco, não tamisado

Os resultados apresentados na Figura 23 confirmam os resultados anteriormente obtidos com o método do $pNPP$, em que o pico máximo de produção da enzima ocorreu em 18 h.

A cinética de produção da enzima (Figura 23) foi semelhante para todas as condições testadas, com produtividades máximas da lipase em 18 h de cultivo. O pico máximo de produção de lipases foi $61 \text{ U/gSS} \pm 6$ obtido com o bagaço não lavado, seguido por $56,1 \text{ U/gSS} \pm 0,1$ para o bagaço previamente lavado. As médias de atividade obtidas para o bagaço não lavado e lavado são consideradas iguais ($p > 0,05$). Este é um resultado importante, pois a utilização do bagaço sem tamisar e sem a lavagem permite o aproveitamento total do resíduo, tornando o processo de produção da enzima mais simples e econômico.

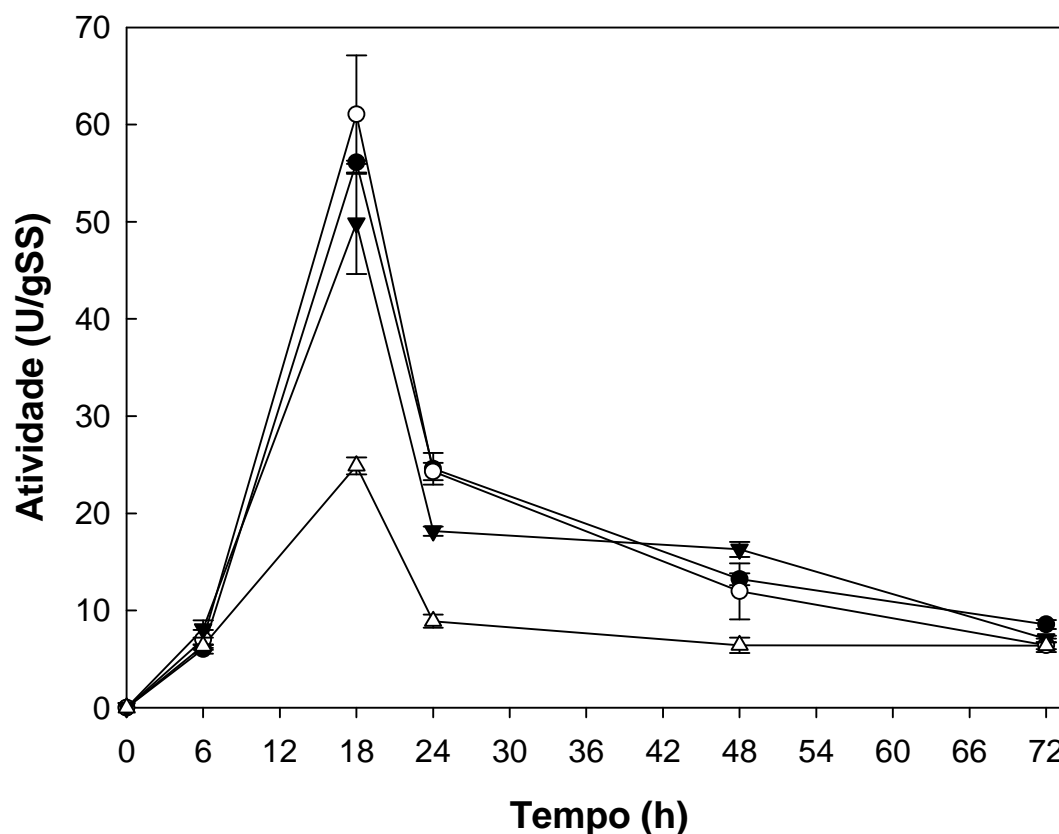


FIGURA 23 - PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO POR *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM, COM DOSAGEM DE ATIVIDADE REALIZADA DIRETAMENTE NO SÓLIDO FERMENTADO, USANDO TRICAPRILINA COMO SUBSTRATO

Condições de cultivo: 1:3 (BCA não lavado/não tamisado) (○); 1:3 (BCA lavado/não tamisado) (●); 1:3 (FSG não tamisado e BCA lavado/não tamisado) (▼); 1:9 (BCA lavado/não tamisado) (△); temperatura 40°C, umidade inicial 75 – 79%, pH 7,0. Os resultados são médias de duplicatas das atividades por grama de sólido seco (U/gSS).

Em relação ao farelo de girassol, pode-se observar que, apenas com a quebra da semente de girassol (com partículas grosseiras), sem a moagem completa das sementes, o valor para atividade lipolítica foi 49,8 U/gSS \pm 5. Essa atividade foi considerada estatisticamente igual ($p > 0,05$) às atividades obtidas com as sementes moídas e o bagaço não lavado (61,0 U/gSS \pm 6) e lavado (56,1 U/gSS \pm 0,1). A relevância desse resultado reflete no escalonamento do processo, onde não seria interessante em termos

econômicos e práticos a moagem das sementes do girassol para obtenção do farelo.

Em um processo de escalonamento de produção do composto de interesse, as tentativas em evitar a padronização do tamanho das partículas seriam extremamente interessantes, pois se aproveitaria totalmente o substrato e diminuiria as etapas de execução do processo. Tendo em vista essas limitações, Godoy *et al.* (2009) aplicaram o delineamento estatístico de Placket-Burman para avaliar se a variável tamanho da partícula do resíduo de semente de mamona teria efeito na produção de lipases por *Penicillium simplicissimum*. A resposta estatística mostrou que todas as faixas de granulometria do substrato poderiam ser utilizadas.

5.2.6 Efeito do processo de secagem do sólido fermentado sobre a atividade lipolítica

O objetivo deste experimento foi verificar se a secagem do sólido fermentado em estufa poderia ser uma alternativa para o processo de liofilização, uma vez que, em larga escala, a secagem do material por liofilização é onerosa. Para tanto, 10 g do sólido fermentado foram incubados em estufa a $55^{\circ}\text{C} \pm 5$ e a cada período de tempo, uma amostra de 1,75 g foi retirada da estufa, sendo que 0,75 g foi utilizado para dosagem de atividade lipolítica, onde para cada determinação foi empregado 0,25 g de sólido, enquanto que a massa restante, 1 g, foi submetida à determinação da umidade. O extrato bruto do sólido fermentado, preparado conforme 4.3.4.1, também foi incubado nas mesmas condições.

Conforme mostrado na Figura 24, durante as primeiras duas horas de secagem do sólido fermentado, há uma perda de aproximadamente um terço da atividade lipolítica inicial. Uma perda similar foi observada no extrato bruto. Entretanto, depois deste ponto, o comportamento foi diferente para os dois preparados enzimáticos. A atividade lipolítica no extrato bruto continuou a

decrecer até não ser mais detectada, depois de 9 h de incubação. No caso do sólido fermentado, as perdas de atividade com o tempo foram pequenas, estabilizando-se em aproximadamente 44 U/gSS, depois de 4 h de secagem, quando a umidade era de 58%. Quando a amostra do sólido fermentado foi seca por liofilização o valor da atividade final foi de 46,8 U/gSS. Assim, concluiu-se que a secagem em estufa é uma alternativa viável à liofilização. Além disso, os resultados mostraram que a enzima contida no substrato sólido é mais estável ao processo de secagem do que a enzima que se encontra livre no meio líquido. Provavelmente a enzima é protegida por interação com as células do microrganismo ou com as próprias partículas de substrato, um fenômeno já observado em enzimas imobilizadas em suportes sintéticos (GHAMGUI *et al.*, 2007). Outra hipótese, seria que a produção de lipases no sólido fermentado continuou ocorrendo durante a secagem em estufa.

Estudos mostram que a termotolerância de produtos obtidos por FES geralmente é superior àqueles obtidos por FS. Acuña e Argüelles (1995) relataram aumento de termotolerância para as pectinases de *Aspergillus niger* produzidas por FES, enquanto que para as enzimas produzidas por FS praticamente não foi detectada atividade. O estudo da termoestabilidade a 50°C de lipases de *Rhizopus homothallicus* apontou que as enzimas obtidas por FS apresentaram uma desnaturação mais rápida do que as enzimas provenientes da FES (substrato bagaço de cana): os tempos de meia-vida foram 0,44 h e 0,72 h, respectivamente (DIAZ *et al.*, 2006). Diaz *et al.* (2006) atribuíram as causas dessa maior termoestabilidade da enzima produzida por FES a compostos associados não covalentemente com as enzimas, que afetariam as propriedades físico-químicas da molécula.

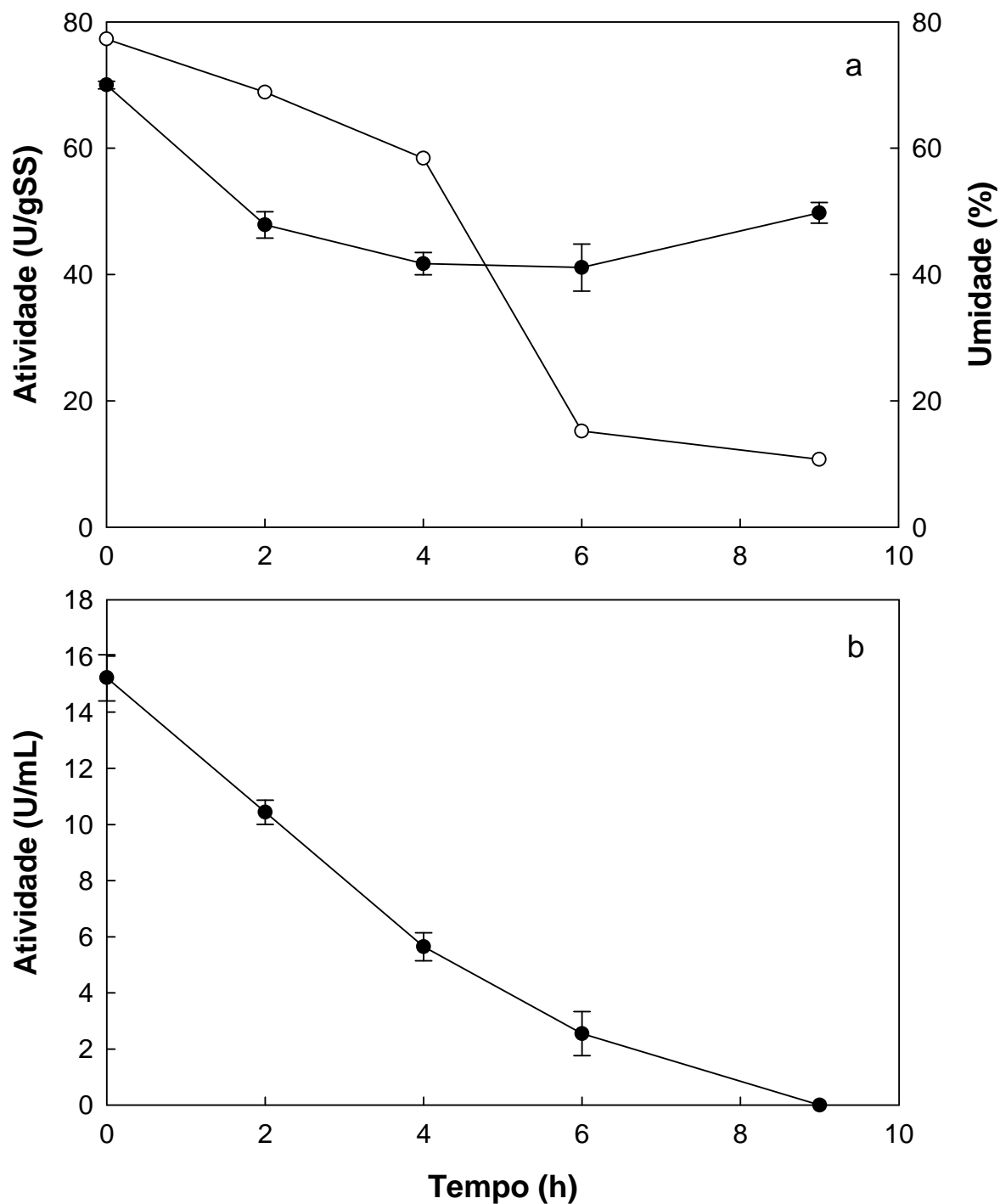


FIGURA 24 - EFEITO DA SECAGEM EM ESTUFA SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

(a) sólido fermentado; (b): extrato aquoso do sólido fermentado. Temperatura de secagem em estufa: $55^{\circ}\text{C} \pm 5$. Coleta de amostras a cada intervalo de tempo para determinação da atividade lipolítica (●) e umidade do sólido fermentado (○). Os resultados são médias de triplicatas das atividades por grama de sólido (U/gSS) e das atividades volumétricas (substrato tricaprilina) para o extrato aquoso (U/mL).

5.2.7 Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

A secagem do sólido em estufa mostrou que a enzima contida no sólido apresenta maior estabilidade frente à temperatura de 55°C do que a enzima no estado livre. A partir dessa informação, decidiu-se avaliar a melhor temperatura de ação da lipase contida no sólido fermentado em comparação com a lipase no extrato aquoso.

A enzima livre e a enzima contida no sólido fermentado apresentaram maior atividade catalítica na temperatura de 50°C (Figura 25). Porém, pode-se observar que, quando a temperatura foi elevada para 60°C, o decaimento da atividade nessa temperatura foi 77% para a enzima livre e 58% para a enzima suportada no sólido em relação à atividade obtida na temperatura de 50°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de enzimas obtidas por FES vem sendo estudada por outros autores no extrato bruto do sólido fermentado e não diretamente no sólido fermentado, como foi feito no presente trabalho. Diaz *et al.* (2006) verificaram que a melhor temperatura para a atividade da lipase de *Rhizopus homothallicus* foi de 40°C para a enzima produzida por FES e 30°C para a produzida por FS, sendo que, para ambos os casos, na temperatura de 55°C a atividade lipolítica decresceu abruptamente, alcançando 40% e 10% do valor da atividade inicial, para as duas temperaturas, respectivamente.

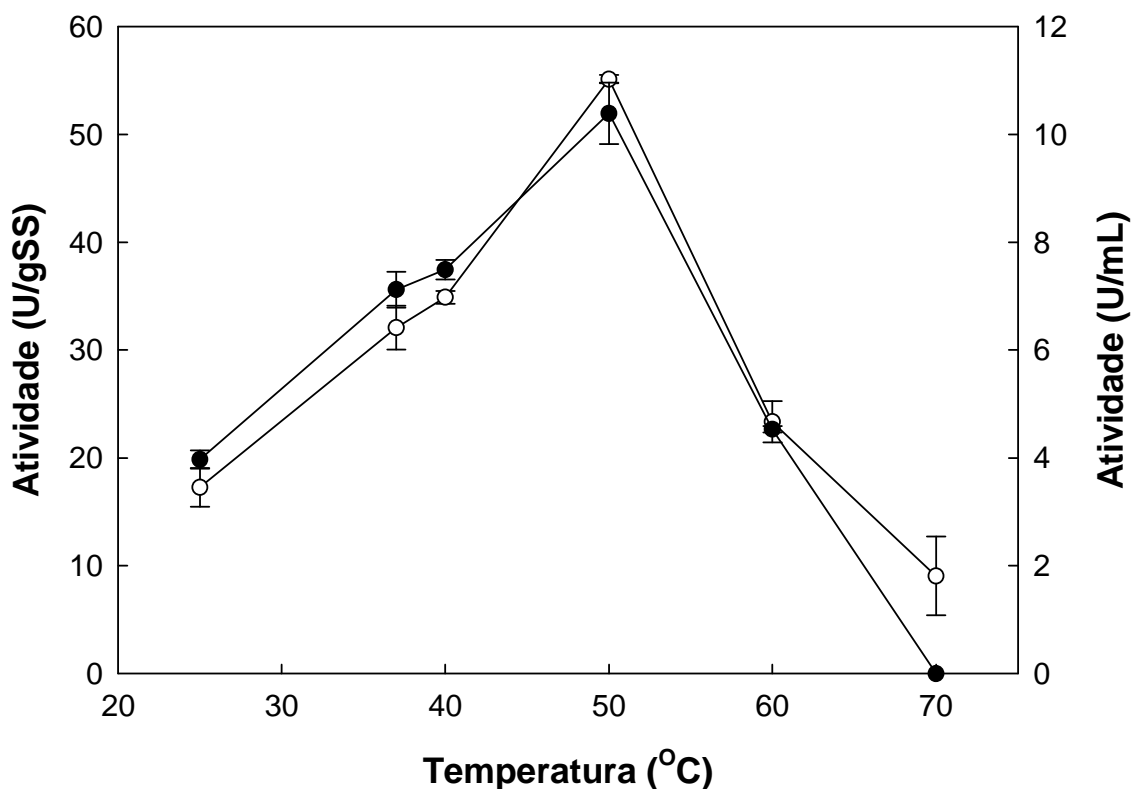


FIGURA 25 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Atividade lipolítica do sólido fermentado (●) e extrato aquoso (○). Os resultados são médias de triplicatas das atividades determinadas em pH Stat, com o substrato tricaprilina por grama de sólido seco (U/gSS) e atividades volumétricas para o extrato aquoso (U/mL).

5.3 ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS

Nos estudos de tratamento enzimático do efluente, os conteúdos de O&G estudados foram superiores a 1000 mg/L, pois a literatura aponta que valores acima de 800 mg/L de O&G podem gerar problemas operacionais nos processos de tratamento biológico (LEAL *et al.*, 2006; JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002). Além disso, o primeiro bloco de experimentos foi feito com efluente esterilizado para investigar o comportamento da enzima e do próprio fungo *R. microsporus*, sem a interferência da microbiota do efluente.

O acompanhamento da liberação de ácidos livres totais foi feito durante 120 h de tratamento do efluente com sólido fermentado (0,3% m/v). O motivo para o uso do termo “ácidos livres” foi explicado na seção de Materiais e Métodos, no item 4.4.7.4. Verificou-se que, em 12 h, ocorreu um pico de liberação de ácidos totais (4,4 mmol/L) (Figura 26a) e, concomitantemente, foi detectado o maior pico de atividade lipolítica no efluente contra tricaprilina (3500 U/L) (Figura 26b).

O decréscimo do teor de ácidos livres a partir de 12 h pode ser atribuído ao consumo pelo microrganismo presente no sólido fermentado, uma vez que nos experimentos controle, realizados com efluente adicionado de sólido fermentado autoclavado, e não adicionado de sólido, o teor de ácidos livres não sofreu variação significativa durante 120 h de tratamento, mantendo-se em torno de 3,0 mmol/L e 1,6 mmol/L, respectivamente. Além disso, esses resultados mostram também que a acidez no efluente aumentou com adição do sólido fermentado autoclavado, quando comparada com a acidez do efluente sem a adição deste material, provavelmente devido à presença de ácidos livres no sólido fermentado.

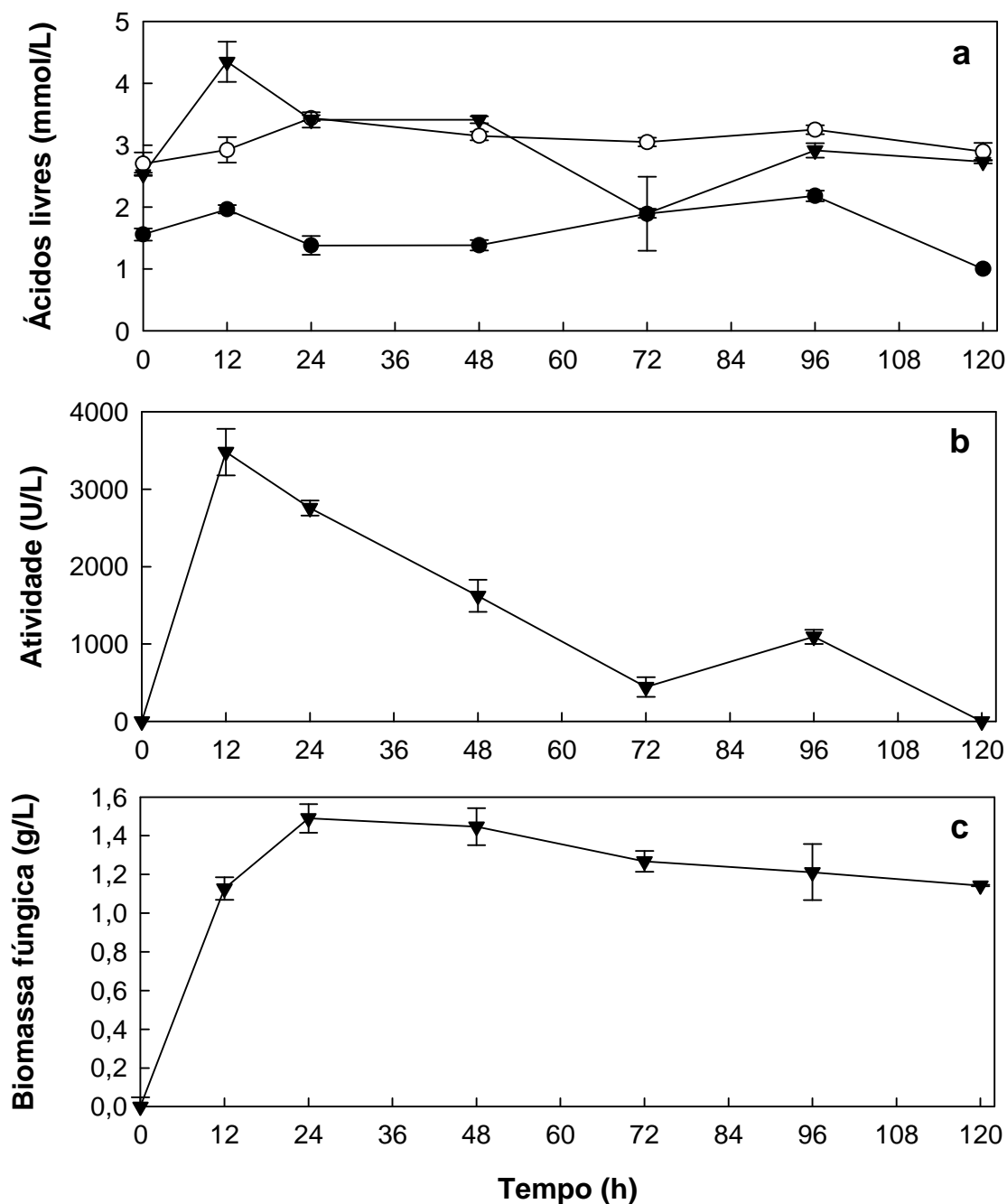


FIGURA 26 - (a) ANÁLISE COMPARATIVA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) VARIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA (c) CURVA DE CRESCIMENTO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SÓLIDO FERMENTADO

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,21 g de sólido fermentado (▼) contendo 7 U, incubados a 35°C e 150 rpm. Controles: 70 mL de efluente sem sólido fermentado (●) e 70 mL de efluente com 0,21 g de sólido fermentado autoclavado (○). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

A Figura 26c mostra que houve crescimento de *R. microsporus* no efluente, com início da fase estacionária em 24 h, quando o valor de biomassa foi de aproximadamente 1,5 g/L.

A determinação de óleos e graxas durante o tratamento do efluente mostrou uma remoção acima de 50% de O&G em 24 h de tratamento, chegando a 91% de remoção em 120 h de tratamento (Figura 27). O interessante nesse experimento é que os incrementos de remoção de O&G foram maiores até 48 h e o crescimento do fungo ocorreu em 12 e 24 h, mostrando que, provavelmente, o fungo está utilizando os lipídeos, que passaram a ser fonte de energia para a sua manutenção.

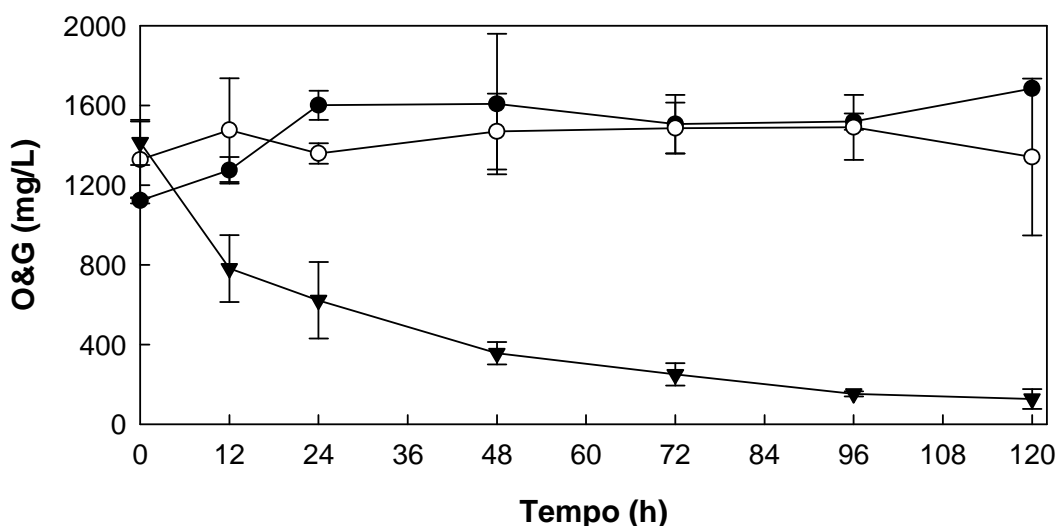


FIGURA 27 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO.

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,21 g de sólido fermentado (▼) contendo 7 U, incubados a 35°C e 150 rpm. Controles: 70 mL de efluente sem sólido fermentado (○) e 70 mL de efluente com 0,21 g de sólido fermentado autoclavado (●). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Devido ao crescimento do fungo no efluente, a próxima etapa foi avaliar se a atividade enzimática detectada no efluente era devida à enzima presente no sólido fermentado ou à enzima produzida pelo fungo durante o seu crescimento no efluente (Figura 28). Para isso, o sólido fermentado foi

adicionado no efluente contendo azida sódica 0,5% (m/v) para impedir o crescimento do fungo, já que é um composto que inibe a enzima Citocromo C-oxidase (KRAHL *et al.*, 1941). Como controle, o sólido fermentado também foi adicionado no efluente sem azida, permitindo o crescimento do microrganismo. Os resultados (Figura 28) mostraram que, no efluente contendo azida sódica, a concentração de ácidos livres foi maior, provavelmente porque os triglicerídeos são hidrolisados pela enzima presente no sólido e não são consumidos depois pelo microrganismo. Esses resultados apontaram que é possível adicionar o sólido fermentado não apenas com a função de hidrolisar a gordura presente no efluente, mas também com a função de remoção dos ácidos graxos liberados pela ação do microrganismo.

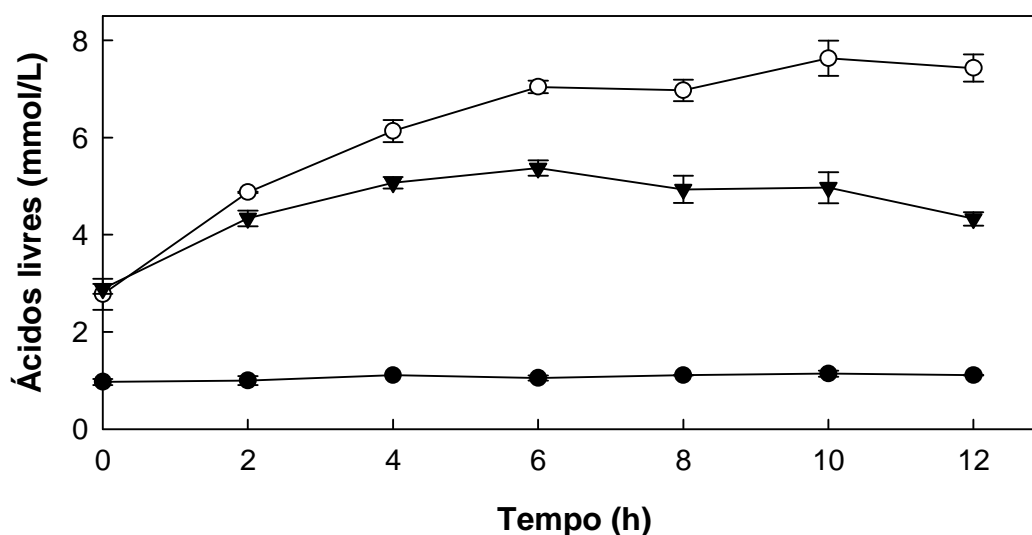


FIGURA 28 -. EFEITO DA AZIDA SÓDICA NA LIBERAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES NO EFLUENTE ESTÉRIL DURANTE TRATAMENTO COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO.

Condições de ensaios: 70 mL de efluente + 0,21 g de sólido fermentado com 7 U incubados com (○) e sem (▼) azida sódica 0,5% (m/v) e 70 mL de efluente sem sólido fermentado (●) a 35°C e 150 rpm. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

5.4 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Devido ao crescimento do *R. microsporus* durante o tratamento do efluente com sólido fermentado, decidiu-se avaliar o efeito da adição direta do fungo no efluente. Porém, cabe ressaltar que as comparações dos resultados com o tratamento do efluente com sólido fermentado foram feitas apenas para avaliar a capacidade do fungo se desenvolver isoladamente no sistema e produzir lipases.

O tratamento com os esporos do fungo mostra que o pico de concentração de ácidos totais também ocorreu em 12 h (Figura 29a). No entanto, pode-se observar que a concentração máxima de ácidos livres com esporos foi menor (2,5 mmol/L) do que com sólido fermentado (4,4 mmol/L) mesmo quando esses valores são descontados dos valores obtidos nos controles. Provavelmente, isso se deve ao maior consumo desses ácidos pelos esporos, que no início do tratamento requerem mais nutrientes para a germinação e formação da massa micelial.

Os resultados mostram que, com 12 e 24 h de tratamento, foi possível detectar atividade lipolítica no efluente, mostrando a produção de lipases no efluente pelo fungo (Figura 29b). Estas atividades foram menores (1350 e 1540 U/L, respectivamente) do que a atividade máxima encontrada quando se incubou o efluente com o sólido fermentado (3480 e 2757 U/L). Além disso, observa-se que a atividade enzimática para o efluente tratado com esporos, foi detectada entre 12 h e 24 h de tratamento, enquanto que para o sólido fermentado foi detectada atividade lipolítica (1093 U/L) no meio por até 96 h de incubação. Essa diferença pode ser devida à dessorção da enzima do sólido fermentado ou mesmo à produção da lipase pelas células já maduras do micélio.

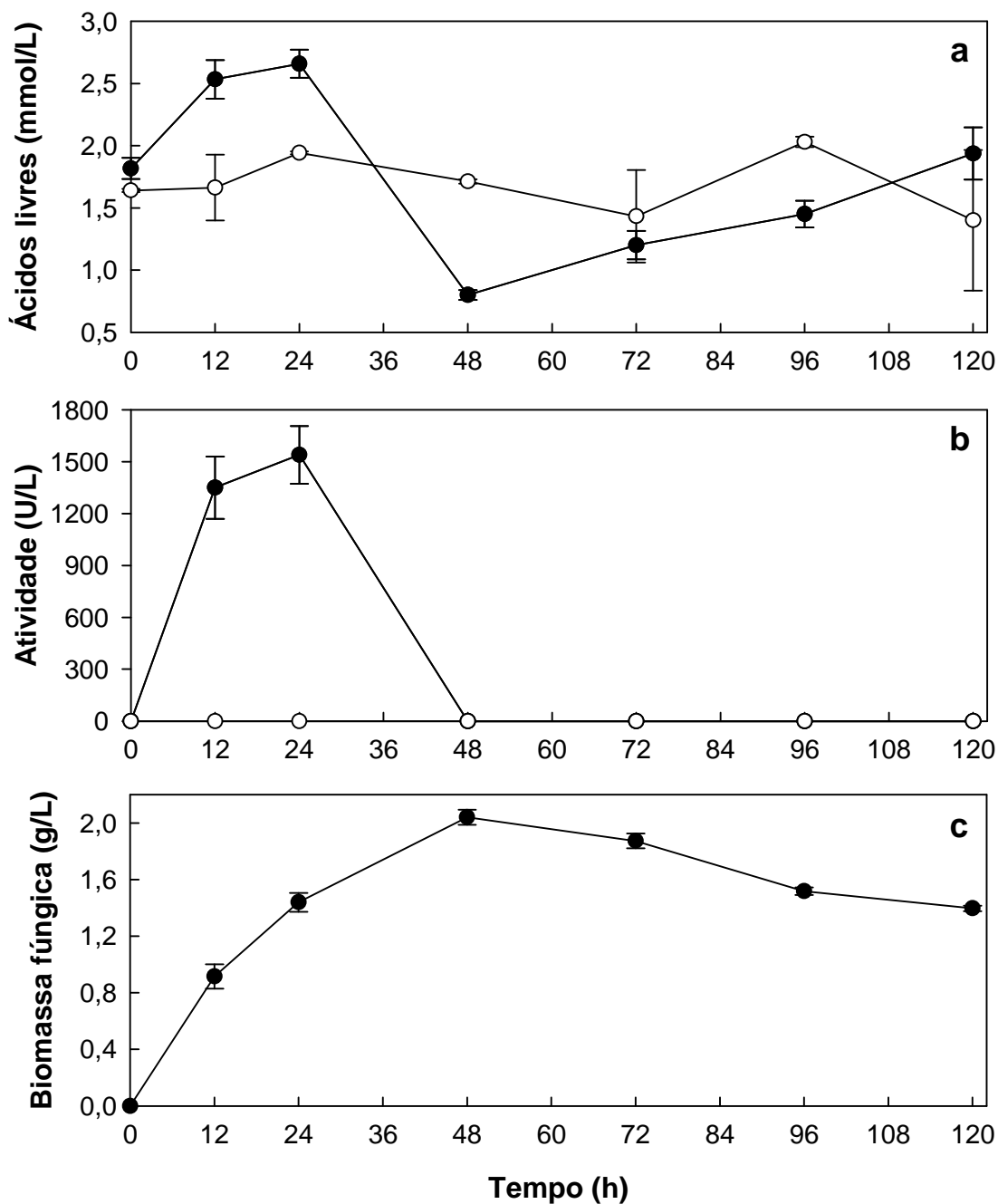


FIGURA 29 - (a) ANÁLISE COMPARATIVA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) VARIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) CURVA DE CRESCIMENTO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + $3,5 \times 10^7$ esporos/mL (●) e incubados a 35°C e 150 rpm. Controle: 70 mL de efluente sem adição de esporos (○). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

A análise da curva de crescimento mostrou que no efluente tratado com os esporos, a biomassa foi crescente (2,0 g/L) até 48 h e a partir desse tempo, deu-se início ao declínio do crescimento, chegando a 1,4 g/L após 120 h de tratamento, enquanto que para o tratamento com sólido fermentado, o pico de crescimento (1,5 g/L) foi em 24 h e em 120 h de tratamento a biomassa foi de (1,1 g/L). Esses resultados (Figura 29c) mostram o efeito da influência do tamanho inicial do inóculo (esporos e sólido fermentado) no desenvolvimento do fungo durante o tratamento, pois foram inoculados $3,5 \times 10^7$ esporos para cada 1 mL de efluente e 0,3 g de sólido fermentado para 100 mL de efluente, sem controle da biomassa presente nesse micélio.

Ao comparar-se a remoção de O&G para ambos os tratamentos fica evidenciado o efeito da influência do tamanho e do tipo de inóculo (esporos e sólido fermentado). A remoção nas primeiras 12 h de tratamento foi de 64 % para o efluente tratado com os esporos (Figura 30) contra 31% para o efluente tratado com sólido fermentado (Figura 27), o que pode ser atribuído provavelmente ao tamanho do inóculo e a maior necessidade de nutrientes pelos esporos. Ao final do tratamento, entretanto, observa-se que, mesmo produzindo uma biomassa inferior, a remoção de O&G foi de 92% após 120 h de tratamento para o efluente tratado com o sólido fermentado (Figura 27) contra 77% para o efluente tratado com esporos (Figura 30). Além disso, no efluente tratado com esporos, o teor de O&G estabilizou a partir de 48 h, o que é consistente com a ausência de atividade lipolítica.

A remoção de 78% de O&G, após 72 h de incubação do efluente com suspensão de esporos, pode ser comparada com trabalhos descritos na literatura que utilizaram células de microrganismos para tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos. Sciole e Vollaro (1997) testaram *Yarrowia lipolytica* na remoção de 16 g/L de O&G de efluentes de indústria de óleo de oliva previamente pasteurizado a 65°C por 30 min e obtiveram a remoção total de gordura após 14 h de fermentação a 30°C. Lanciotti *et al.* (2005) testaram a produção de lipases de 62 estirpes de *Y. lipolytica* empregando o efluente de indústria de produção de óleo de oliva e meio de cultura. Os resultados mostraram que determinadas estirpes produziram mais lipases em efluente

(1677 U/mL) do que em meio de cultura sintético (436 U/mL), mesmo o efluente não sendo suplementado com nutrientes e possuindo elevada concentração de compostos fenólicos.

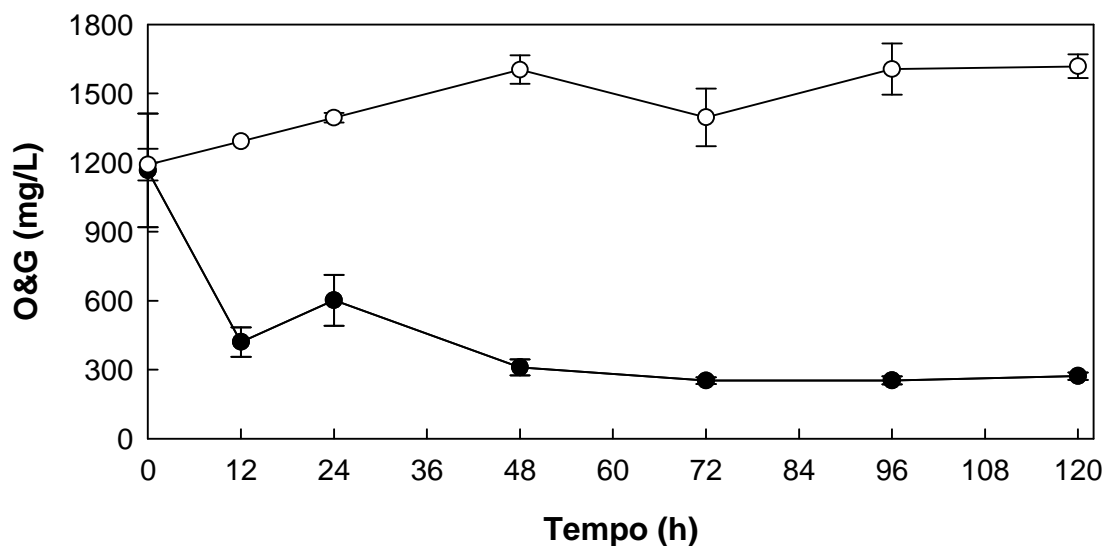


FIGURA 30 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + $3,5 \times 10^7$ esporos/mL (●) e incubados a 35°C e 150 rpm. Controle: 70 mL de efluente sem adição de esporos (○). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Dharmsthiti e Kuhasuntisuk (1998) estudaram a hidrólise de lipídeos presentes em efluente de restaurante empregando um inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* (10^7 UFC/mL) e verificaram que, em 5 dias de tratamento, os lipídeos (250 mg/L) foram totalmente consumidos pelo microrganismo. El-Bestawy, El-Mastry e El-Adl (2005) avaliaram isolados de bactérias quanto à capacidade de liberação e consumo de ácidos graxos em meio mínimo suplementado com 1% de óleo de palma. Os resultados mostraram que, em 6 dias de tratamento, os isolados *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas* sp liberaram 62,5% e 58,4% de ácidos graxos, respectivamente, enquanto o controle (efluente sem inóculo) apresentou 53% desses ácidos. Depois desse período, as cepas passaram a consumir os ácidos graxos

gerados. Já os resultados para *Escherichia coli* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* mostraram que esses isolados consomem mais ácidos graxos do que hidrolisam, pois, no período de 6 dias, a concentração de ácidos graxos foi de 43,4% e 34,8%, respectivamente, enquanto que, no controle, foi de 53%. Quando foi feita a combinação dos isolados de bactérias *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, a concentração de ácidos graxos foi de 4,4% contra 19% do controle, indicando maior velocidade de consumo de ácidos graxos quando foi utilizada a associação dessas bactérias. Loperena *et al.* (2009) prepararam um efluente de laticínios semi-sintético contendo 0,5 g/L de O&G e aplicaram um consórcio de *Bacillus pumillus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, que removeu 72% de gordura após 24 h de incubação.

Os resultados deste bloco de experimentos mostram que o tratamento do efluente com o sólido fermentado é mais vantajoso do que com os esporos. Isto é consistente com o fato de que no sólido fermentado existem lipases que foram previamente produzidas e a biomassa do fungo está pronta para produzir lipases, que também auxiliam na remoção de O&G do efluente. Ainda assim, o tratamento de efluentes com esporos é uma vertente deste trabalho que merece ser explorada em trabalhos futuros, pois como observado nos trabalhos expostos acima, a eficiência dos microrganismos em produzir enzimas e remover gorduras depende das condições experimentais adotadas.

5.5 ESTUDOS DE BIODEGRADABILIDADE REFERENTE AO PRIMEIRO LOTE DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS PREVIAMENTE ESTERILIZADO

Para avaliar o efeito da remoção de óleos e graxas (O&G) na biodegradabilidade do efluente, foram selecionados dois tempos de incubação, 12 e 72 h. A avaliação da biodegradabilidade do efluente, após a hidrólise e a pré-remoção de O&G, foi estimada pela razão DBO_5/DQO e pelo teste de Zahn-Wellens. Em termos de biodegradabilidade de efluentes, a maior aplicação do parâmetro Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5) está

associada à obtenção da razão DBO_5/DQO , que permite estimar a fração da DQO que poderia ser metabolizada pelos microrganismos presentes em um sistema aeróbio, nas condições do teste de DBO_5 . Além disso, a razão DBO_5/DQO é uma resposta rápida, quando comparada com o teste de Zahn-Wellens, para o efeito das diferentes condições de tratamento aplicadas no efluente. O teste de Zahn-Wellens permite a avaliação diária do potencial de biodegradação das amostras em estudo, por meio da remoção de DQO, utilizando-se biomassa não aclimatada. A aplicação de ambos os testes no primeiro lote de efluente teve por objetivo avaliar a biodegradabilidade por métodos diferentes. Cabe a ressalva que para a determinação da razão de biodegradabilidade, a DQO determinada foi a total e para o teste de Zahn-Wellens foi determinada a DQO solúvel, representada por DQO_d , apenas com o objetivo de minimizar o desvio padrão das médias das determinações obtidas.

5.5.1 Determinação da razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO)

Os resultados da análise de biodegradabilidade pela razão DBO_5/DQO são mostrados na Tabela 9.

A adição de gordura no efluente para aumentar a concentração de O&G acima de 1000 mg/L, elevou a DQO no efluente de 3680 mg/L para 6908 mg/L. Com o aumento de gordura no efluente, a DBO_5 continuou constante, indicando que a gordura não foi degradada em 5 dias, o que resultou na diminuição da razão DBO_5/DQO de 0,88 para 0,47. Esse último valor, inferior a 0,6, é considerado uma baixa razão de biodegradabilidade que poderia prejudicar o tratamento biológico (JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008). Por outro lado, o tratamento do efluente com sólido fermentado por 12 h aumentou a biodegradabilidade do efluente para 0,63, indicando que a DQO de difícil degradação passou, em partes, a ser de fácil degradação.

TABELA 9 - NÍVEIS DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO₅) e DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) NO ESTUDO DO EFLUENTE ESTÉRIL DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS APÓS TRATAMENTO COM SÓLIDO FERMENTADO E COM SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Tratamentos	Parâmetros			
	DBO ₅ (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO ₅ /DQO	[O&G] (mg/L)
Efluente original	3254	3680	0,88	640
Efluente + gordura	3250	6908	0,47	2314
Efluente +SF* (12h)	4253	6747	0,63	1556
Efluente + SF (72h)	1134	2570	0,44	440
Efluente + SE** (12h)	3643	6560	0,55	1499
Efluente + SE (72h)	968	1840	0,52	378

Condições de ensaios: 500 mL de efluente + 1,5 g de sólido fermentado (SF*) contendo 50 U e 500 mL de efluente + $2,5 \times 10^8$ esporos (SE**) incubados a 35°C e 150 rpm.

O mais interessante foi que a DQO se manteve praticamente constante no tratamento de 12 h com sólido fermentado, enquanto a DBO₅ aumentou, o que possibilitou o aumento da razão DBO₅/DQO, mostrando que a hidrólise com uma remoção de 33% de O&G aumentou a biodegradabilidade do efluente. No entanto, o tratamento por 72 h resultou na diminuição da razão para 0,44 com uma remoção de O&G de 81%. Quando o efluente sem adição de gordura e o efluente tratado por 72 h são comparados, observa-se que o teor de O&G está abaixo de 1000 mg/L para ambas as condições, porém, as razões DBO₅/DQO são diferentes (0,88 e 0,44, respectivamente) . O valor de DBO₅ para o efluente pré-tratado por 72 h foi três vezes menor em relação ao efluente não adicionado de gordura. Provavelmente a carga orgânica residual, ou seja, aquela que não foi removida pelo fungo *R. microsporus* durante 72 h de tratamento, pode ser considerada de baixa biodegradabilidade.

O tratamento do efluente com esporos apresentou razões DBO_5/DQO de 0,55 e 0,52 nos tempos de 12 e 72 h, respectivamente. Contrariamente do que foi observado para o sólido fermentado para o tempo de 72 h, o tratamento com esporos manteve uma razão DBO_5/DQO consideravelmente elevada (0,52) apesar de inferior a 0,6 e com alta remoção de O&G (84%). O motivo provavelmente seja pela liberação de produtos do metabolismo e de lise do micélio de *R. microsporus* que contribuíram para o aumento da carga orgânica biodegradável.

Todos esses resultados mostram que o tratamento do efluente durante 12 h com sólido fermentado aumenta a biodegradabilidade do efluente. No entanto, em 72 h de tratamento, tem-se o aumento da remoção de O&G, mas com diminuição da biodegradabilidade, que ocorre devido a diminuição da matéria orgânica biodegradável previamente removida por *R. microsporus*. Conseqüentemente, o efluente fornecido para o teste de DBO_5 pode conter matéria orgânica de lenta biodegradabilidade que necessitaria de um tempo acima de cinco dias para ser metabolizada.

5.5.2 Teste de biodegradabilidade aeróbia de Zahn-Wellens

A Tabela 10 mostra os valores de DQO_d , óleos e graxas, proteínas e açúcares totais determinados para todas as condições de tratamento do efluente antes do teste de biodegradabilidade.

Pode-se observar que os maiores valores de DQO_d e O&G foram determinados para o efluente não tratado (6300 mg/L e 1624 mg/L, respectivamente).

TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE ESTÉRIL DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM SÓLIDO FERMENTADO E ESPOROS DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Tratamentos	Parâmetros			
	DQO _d (mg/L)	[O&G] (mg/L)	Proteínas (mg/L)	Açúcar total (mg/L)
Efluente bruto	6300 ± 60	1624 ± 60	170 ± 17	1924 ± 162
Efluente + SF* (12h)	5195 ± 309	1182 ± 54	96 ± 4	1698 ± 189
Efluente + SF (72h)	1976 ± 104	59 ± 5	50 ± 1	884 ± 96
Efluente + SE** (72h)	3420 ± 327	378 ± 33	148 ± 3	943 ± 158

Condições de ensaios: 500 mL de efluente + 1,5 g de sólido fermentado (SF*) contendo 50 U e 500 mL de efluente + $2,5 \times 10^8$ esporos (SE**) incubados a 35°C e 150 rpm.

Para o efluente tratado por 72 h com sólido fermentado foi determinado o menor valor de DQO_d e O&G (1976 mg/L e 59 mg/L, respectivamente), indicando que *R. microsporus* removeu matéria orgânica do efluente. No entanto, quando o efluente foi tratado diretamente com a suspensão de esporos por 72 h, observa-se que, em relação ao tratamento com sólido fermentado, o valor de DQO_d foi praticamente o dobro e isso foi devido aos resíduos de micélio no efluente, pois o fungo cresceu disperso no efluente e mesmo com a filtração, foi detectada biomassa no efluente filtrado.

No teste de Zahn–Wellens, os valores iniciais de DQO_d do efluente devem ser padronizados para 1000 mg/L. Assim, os efluentes submetidos aos tratamentos com sólido fermentado e esporos foram diluídos para atingir esse valor de DQO no reator aeróbio e conseqüentemente as concentrações iniciais de O&G, proteínas e açúcares também foram modificadas (Tabela 11).

TABELA 11 - PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO DISPERSA (DQO_d) DO EFLUENTE ESTÉRIL PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE ZAHN-WELLENS

Tratamentos	Parâmetros			
	DQO _d (mg/L)	[O&G] (mg/L)	Proteínas (mg/L)	Açúcar total (mg/L)
Efluente bruto	1000	258	30	305
Efluente + SF* (12h)	1000	227	18	327
Efluente + SF (72h)	1000	30	25	447
Efluente + SE** (72h)	1000	110	43	275

Condições de ensaios: 500 mL de efluente + 1,5 g de sólido fermentado (SF*) contendo 50 U e 500 mL de efluente + $2,5 \times 10^8$ esporos (SE**) incubados a 35°C e 150 rpm.

Após de 3 h do início do teste, foi realizada a primeira coleta do efluente para determinação de DQO_d (Tabela 12) e sólidos suspensos totais (Figura 31).

De acordo com o protocolo de Zahn-Wellens, a medida de DQO feita nesse tempo é um indicativo de adsorção da matéria orgânica do efluente no lodo. Após esse período, a biodegradabilidade foi acompanhada diariamente até o 14º dia. No entanto, apenas nos três primeiros dias foi possível avaliar uma remoção significativa de DQO. Nas primeiras 3 h, a remoção de DQO_d em relação a DQO inicial (1000 mg/L) no efluente bruto foi 80%. Em 24 h de teste, a remoção de DQO_d no efluente bruto em relação ao tempo de 3 h passou para 40%. Para o efluente pré-hidrolisado com sólido fermentado durante 12 e 72 h, os valores de remoção de DQO_d em relação à DQO_d inicial, nas primeiras 3 h de teste, foram 56% e 45%, respectivamente. Em 24 h de teste, os valores de remoção de DQO_d em relação ao tempo de 3 h passaram para 74% e 72%, respectivamente e para o efluente pré-tratado com esporos, a remoção de DQO_d foi de 65%, no tempo de 3 h em relação ao tempo inicial e 67%, no tempo de 24 h em relação ao tempo de 3 h. (Tabela 12).

A explicação para essa inversão de remoção de DQO_d entre os tempos

de 3 h e 24 h para o efluente bruto e os que foram pré-hidrolisados pode ser devida às características físico-químicas da carga lipídica do efluente, ou seja, no efluente bruto, a maior remoção de DQO (80%) pode ser devida à adsorção da gordura no lodo.

TABELA 12 – DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO SOLÚVEL (DQO_d) OBTIDA DURANTE O TESTE DE ZAHN-WELLENS PARA EFLUENTE ESTÉRIL DE LATICÍNIO TRATADO PREVIAMENTE COM SÓLIDO FERMENTADO E SUSPENSÃO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Tratamentos	Valores de DQO _d (mg/L)				
	0h	3h	24h	48h	72h
Efluente bruto	1000	205	123	81	10
Efluente + SF (12h)	1000	438	116	76	0
Efluente + SF* (72h)	1000	580	163	313	188
Efluente + SE** (72h)	1000	345	115	124	83
Controle glucose	1000	1255	384	72	0
Controle dietilenoglicol	1000	511	296	390	304

Condições de hidrólise: 500 mL de efluente + 1,5 g de sólido fermentado (SF*) contendo 50 U e 500 mL de efluente + $2,5 \times 10^8$ esporos (SE**) incubados a 35°C e 150 rpm.

No tempo de 24 h, a remoção de DQO_d, em relação ao tempo de 3 h, caiu para 40%, pois provavelmente, o lodo poderia ainda estar degradando a matéria orgânica adsorvida do efluente não tratado. Para os efluentes hidrolisados, no tempo de 24 h, a remoção de DQO, em relação ao tempo de 3 h, para todas as condições passou a ser maior, pois a matéria lipídica foi mais facilmente assimilada pelo lodo e pode-se observar que para o efluente tratado por 12 h com sólido fermentado, a remoção de DQO foi total no terceiro dia de tratamento. Durli (2007) mostrou remoção total de DQO, através do Teste de

Zahn-Wellens, tanto para efluente de laticínios tratado com sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* por 72 h (102 mg/L de O&G) como para efluente não tratado (255 mg/L de O&G). Porém, a remoção total da DQO, para o efluente tratado, ocorreu no sétimo dia de teste, enquanto que para o efluente não tratado, ocorreu no nono dia de teste.

A determinação da DQO para o efluente pré-tratado com suspensão de esporos durante 72 h mostra que o lodo ativado removeu do tempo de 3 h para 24 h, 66% de DQO. Essa remoção de DQO foi menor do que aquela determinada para o efluente pré-hidrolisado com sólido fermentado por 72 h, cujo valor foi 72%. Provavelmente, a mesma explicação dada anteriormente para a razão de biodegradabilidade do efluente tratado previamente com esporos pode ser dada aqui, ou seja, o efluente fornecido ao lodo ativado pode conter matéria orgânica de lenta biodegradabilidade oriunda do próprio metabolismo de *R. microsporus*.

5.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE E REMOÇÃO DE LIPÍDEOS DO EFLUENTE ESTÉRIL DE LATICÍNIOS ATRAVÉS DO USO DE SÓLIDO FERMENTADO E ESPOROS DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

Como descrito anteriormente, o efluente foi tratado em condições fixas de temperatura (35°C), agitação (150 rpm), pH (7,0), concentração de sólido fermentado (0,3% m/v). Para otimizar o processo de hidrólise, decidiu-se variar alguns desses parâmetros de tratamento. Cabe ressaltar que, para estes experimentos foi selecionado o tempo de 12 h de hidrólise do efluente, com o objetivo de aumentar a eficiência do processo no menor intervalo de tempo de tratamento. No entanto, para o tratamento do efluente com esporos, o tempo selecionado foi de 72 h, pois o objetivo foi avaliar o potencial do microrganismo na remoção de gordura.

5.6.1 Efeito da variação da concentração de sólido fermentado na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente estéril

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de sólido fermentado [0,1; 0,3; 0,5 e 1,0% (m/v)] na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente, avaliando-se a remoção de O&G, o teor de ácidos livres e a atividade lipolítica no efluente. Para isso, as diferentes massas de sólido fermentado, contendo a atividade inicial de 33 U/gSS, foram adicionadas assepticamente ao efluente esterilizado por autoclavação, que foi incubado a 35°C, 150 rpm por um período de 12 h. Após esse tempo, o efluente foi filtrado em malha de nylon para separação do sólido fermentado mais micélio, os quais foram submetidos a secagem (55°C) para obtenção da biomassa. No efluente filtrado foram realizadas as determinações de concentração de ácidos livres totais, de O&G e atividade lipolítica. Os controles empregados foram o sólido fermentado previamente autoclavado por 30 min e efluente sem o sólido fermentado.

Os resultados mostram (Figura 31a,b,c) que o aumento da concentração de ácidos livres no efluente, assim como a atividade lipolítica e diminuição do teor de O&G foram diretamente proporcionais ao aumento das massas de sólido fermentado empregadas. Em todas as concentrações testadas, a acidez do efluente tratado com sólido fermentado foi maior do que a detectada no controle (sólido fermentado autoclavado), indicando a ação de lipases suportadas no sólido.

Devido aos resultados similares obtidos para as concentrações de 0,3 e 0,5%, em termos de concentração de ácidos livres, atividade e remoção de O&G, a concentração selecionada para os próximos experimentos continuou sendo 0,3% (m/v) com o objetivo de evitar o aumento da carga orgânica do efluente e diminuir os custos do processo, bem como pelos estudos que mostram o impacto negativo de altas concentrações de sólido fermentado no tratamento anaeróbio do efluente (RIGO *et al.*, 2008a; VALLADÃO; FREIRE; CAMMAROTA, 2007).

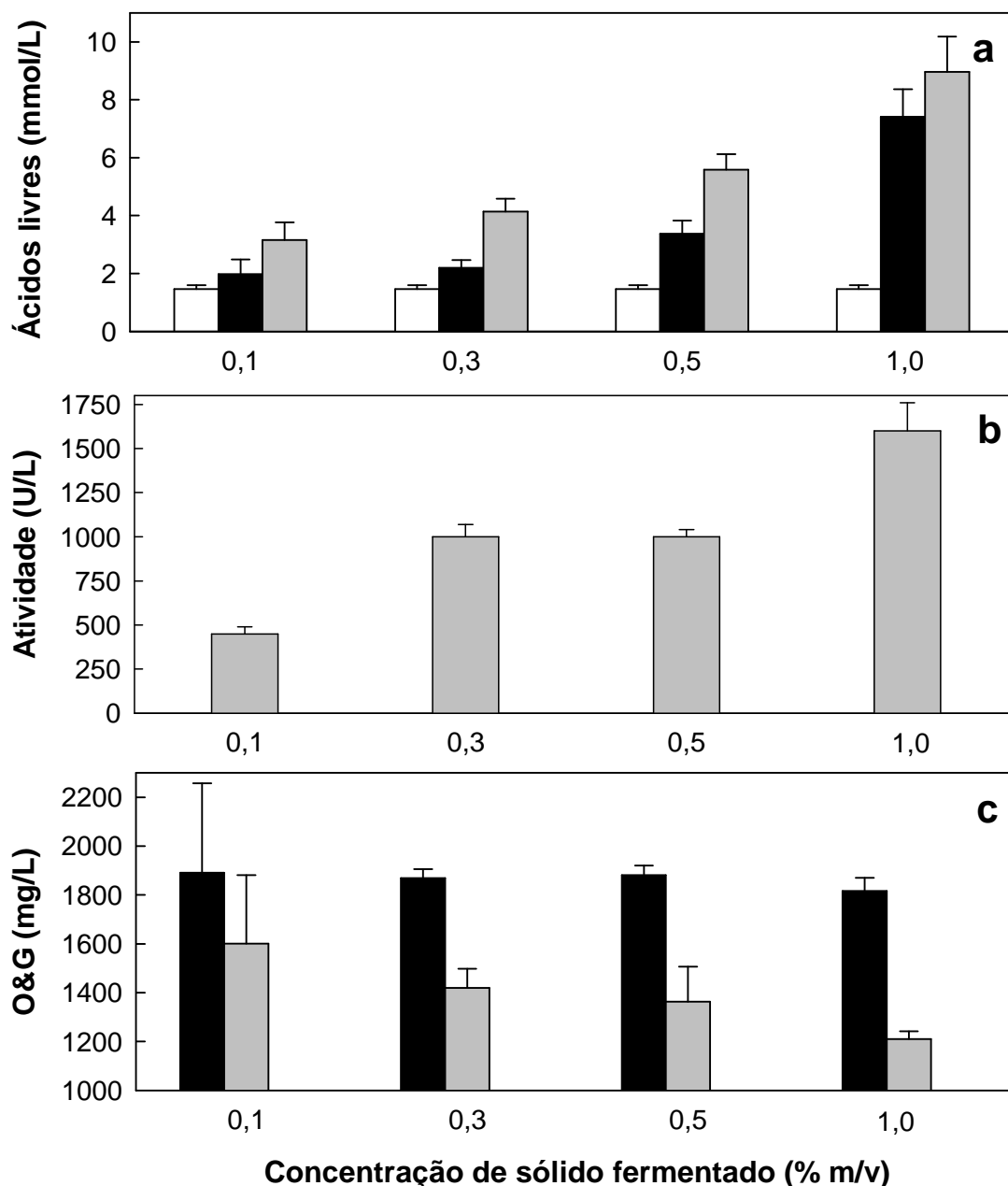


FIGURA 31 - (a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDO FERMENTADO

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% (m/v) de sólido fermentado (■) contendo atividade inicial de 33 U/gSS incubados a 35°C e 150 rpm por 12 h. Controles: 70 mL de efluente sem adição de sólido fermentado (□), 70 mL de efluente + 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% (m/v) sólido fermentado autoclavado (▒). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

O efeito do aumento da concentração do sólido fermentado foi avaliada sobre o crescimento do fungo (Figura 32), onde o aumento de biomassa produzida (0,16; 0,31; 0,51 e 1,05 g/L) foi diretamente proporcional à massa do sólido fermentado adicionada no tratamento [0,1; 0,3; 0,5 e 1% (m/v)].

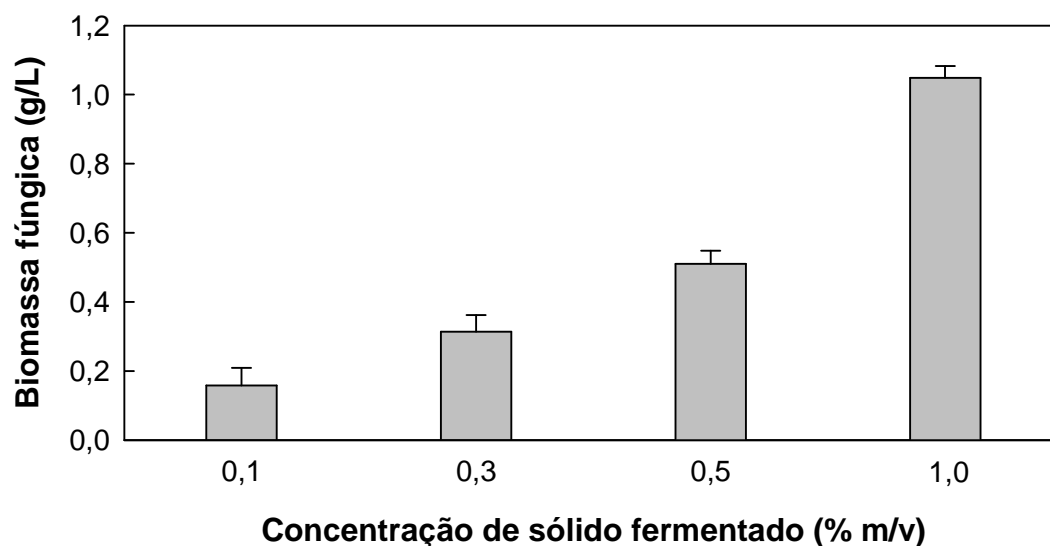


FIGURA 32 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDO FERMENTADO

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% (m/v) de sólido fermentado (■) contendo atividade inicial de 33 U/gSS incubados a 35°C e 150 rpm por 12 h. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

O estudo do efeito da variação na concentração de sólido fermentado sobre a hidrólise enzimática de lipídeos de efluentes é restrito na literatura. Cammarota, Teixeira e Freire (2001) testaram três concentrações de sólido fermentado de *Penicillium restrictum* [0,1, 0,5 e 1,0%, (m/v)] na hidrólise de efluente de laticínio. Nas primeiras 12 h de incubação, a liberação de ácidos foi crescente com os valores de concentração (11, 22 e 26 $\mu\text{mol/mL}$), mas, após 24 h de incubação, atingiu o pico máximo após 24 h de incubação (26, 27 e 29 $\mu\text{mol/mL}$).

Com o emprego das mesmas concentrações de sólido fermentado

citadas acima, Valladão, Freire e Cammarota (2007) estudaram a hidrólise de diferentes valores de O&G do efluente de abatedouro de aves (150 – 1200 mg/L) durante 22 h e o teor de ácidos também foi linear com os valores das concentrações de sólido utilizadas, sendo que na concentração de 150 mg/L de O&G, os valores de ácidos livres para as respectivas massas de sólido fermentado [0,1, 0,5, e 1,0%(m/v)] foram 1,0, 3,4; e 4,6 $\mu\text{mol/ml}$, enquanto que para 1200 mg/L de O&G, os teores de ácidos livres foram 3,2; 4,2 e 7,3 $\mu\text{mol/ml}$. Rigo *et al.* (2008a) aplicaram um delineamento fatorial para avaliar a melhor condição de hidrólise de efluente de carne suína e em relação à concentração de sólido fermentado o melhor valor foi 5,0% (m/v).

O interessante em relação à concentração de sólido fermentado é que o maior teor de ácidos, geralmente obtido pela maior concentração de sólido fermentado, pode prejudicar o tratamento biológico anaeróbio. Essa constatação foi feita por Valladão, Freire e Cammarota (2007) e por Rigo *et al.* (2008a) que verificaram uma redução na remoção de DQO no tratamento anaeróbio para os tratamentos de hidrólise com os mais altos valores de concentração de sólido fermentado. Os autores justificaram estes resultados pela liberação de ácidos graxos de cadeia longa, que são conhecidos por inibir a atividade de determinadas bactérias dentro do processo anaeróbio (KUANG; LEPESTEUR; PULLAMMANAPPALLIL, 2002).

5.6.2 Efeito da temperatura na hidrólise e remoção de lipídeos do efluente estéril pelo sólido fermentado

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito de diferentes valores de temperatura no tratamento do efluente com sólido fermentado. Para isso, 0,3% (m/v) de sólido fermentado (33 U/gSS) foi adicionado asépticamente ao efluente estéril, que foi em seguida incubado a 25°C, 35°C e 45°C, a 150 rpm em agitador orbital. Após 12 h de tratamento, o efluente foi filtrado para separação do sólido fermentado e micélio, os quais foram submetidos à secagem (55°C) para obtenção da biomassa. No filtrado foram determinadas a

concentração de ácidos livres totais, de O&G e a atividade lipolítica. Os controles empregados foram o sólido fermentado previamente autoclavado por 30 min e o efluente sem sólido fermentado.

Conforme mostrado na Figura 33a, o efluente tratado com sólido fermentado apresentou maior concentração de ácidos livres (5,8 mmol/L), bem como maior atividade lipolítica (1970 U/L) (Figura 33b), e crescimento do fungo (0,55 g/L) (Figura 34) na temperatura de 35°C do que na temperatura de 45°C, cujos respectivos valores foram: 3,81 mmol/L, 1450 U/L e 0,22 g/L. No entanto, a remoção de gordura foi em torno de 50% para ambas as temperaturas (Figura 33c).

O interessante nesses resultados é que a melhor temperatura de ação da lipase do sólido fermentado (Figura 25) foi de 50°C. Portanto, esperava-se que a temperatura de 45°C fosse a melhor temperatura para o tratamento enzimático do efluente. Leal *et al.* (2006) relataram que para efluente semi-sintético de laticínios, a mesma temperatura deste trabalho (35°C) acarretou no maior teor de ácidos liberados pela hidrólise com sólido fermentado após 12 h. Porém, no tempo de 24 h, a temperatura que resultou no maior teor de ácidos foi de 45°C. Essa também foi a melhor temperatura na hidrólise dos lipídeos do efluente da indústria de carne suína incubado por 24 h com sólido fermentado (RIGO *et al.*, 2008a).

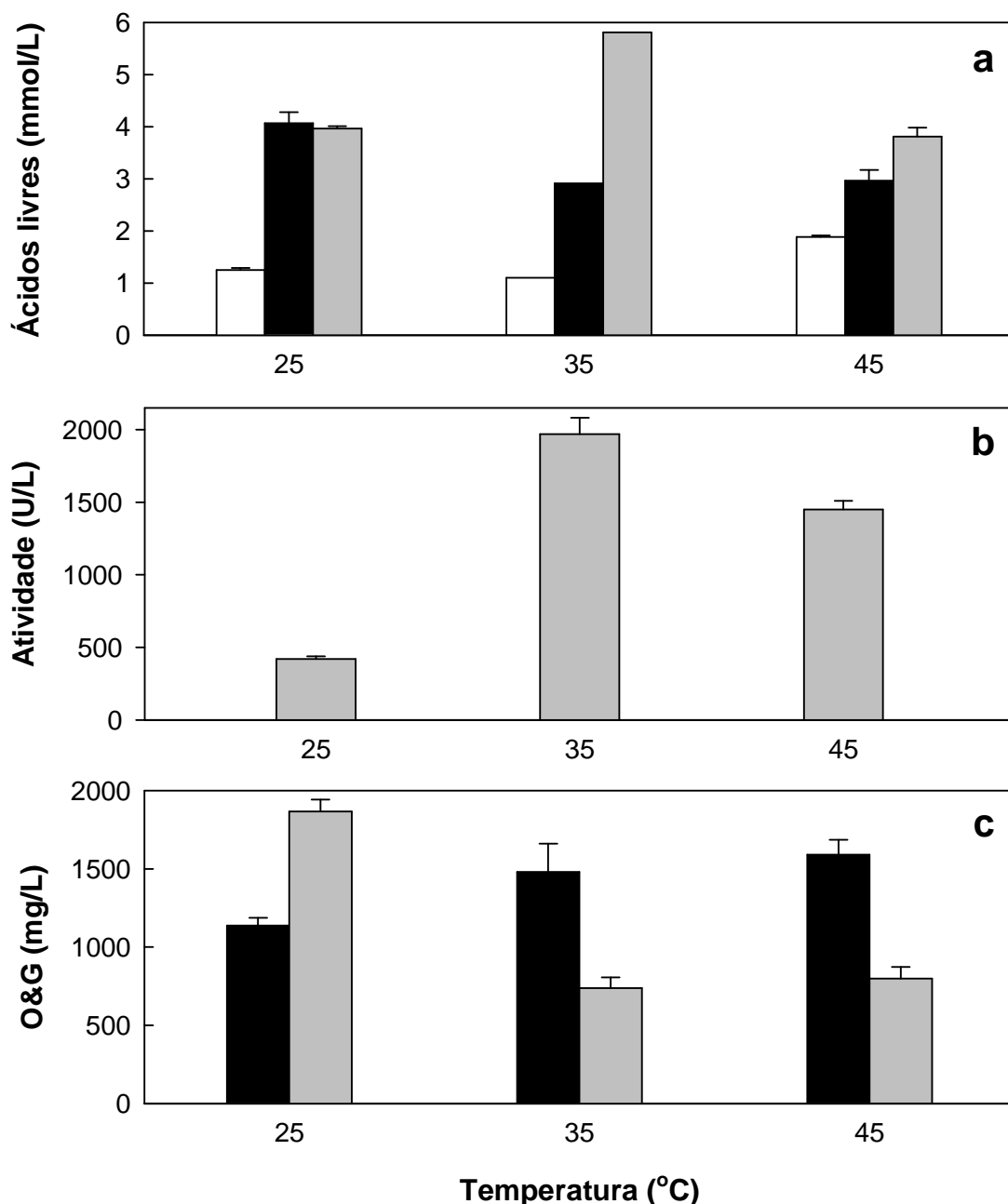


FIGURA 33 - (a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,3% (m/v) de sólido fermentado (■) contendo atividade inicial de 33 U/gSS incubados a 25°C, 35°C e 45°C e 150 rpm por 12 h. Controles: 70 mL de efluente sem adição de sólido fermentado (□), 70 mL de efluente + 0,3% (m/v) sólido fermentado autoclavado (■). Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

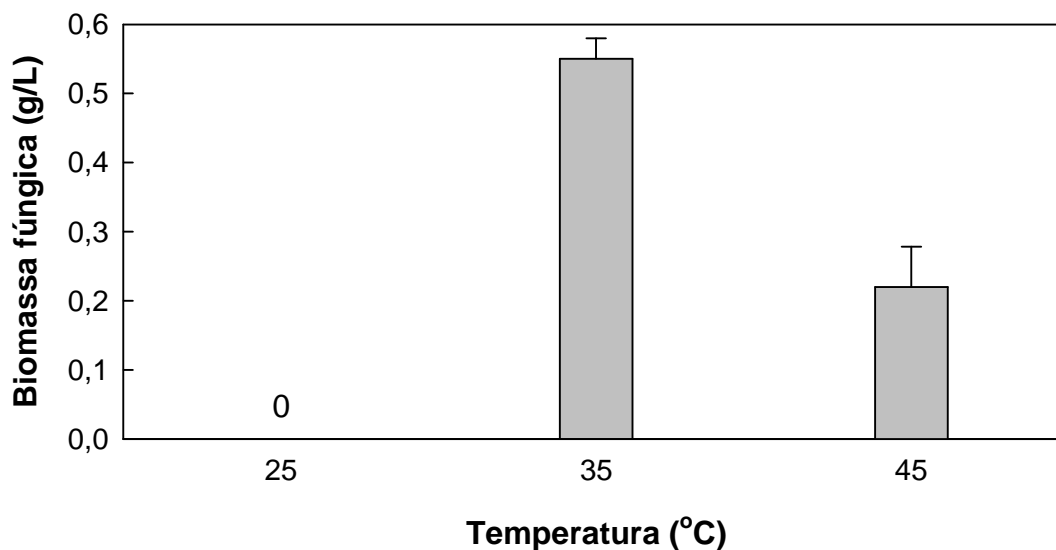


FIGURA 34 - EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM 0,3% (m/v) DE SÓLIDO FERMENTADO.

Condições de ensaio: 70 mL de efluente + 0,3% (m/v) de sólido fermentado (■) contendo atividade inicial de 33 U/gSS incubados a 25°C, 35°C e 45°C e 150 rpm por 12 h. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

A hidrólise do efluente com esporos por 72 h mostrou que a produção de ácidos livres nas temperaturas de 35°C e 45°C foi praticamente nula (Figura 35a), acompanhada por atividade lipolítica de 360 U/L e 560 U/L (Figura 35b), respectivamente. No entanto, a remoção de O&G foi de 95% na temperatura de 35°C e 75% na temperatura de 45°C (Figura 35c) com crescimento de 2,23 g/L e 1,79 g/L (Figura 36). Esperava-se que a detecção de atividade lipolítica fosse maior na temperatura de 35°C, já que a remoção de O&G e crescimento do fungo foram melhores nessa temperatura. No entanto, pode-se inferir que além da atividade lipolítica extracelular, lipases ligadas ao micélio poderiam contribuir para a remoção de O&G na temperatura de 35°C e que a temperatura de 45°C aumentaria a secreção de lipases extracelulares.

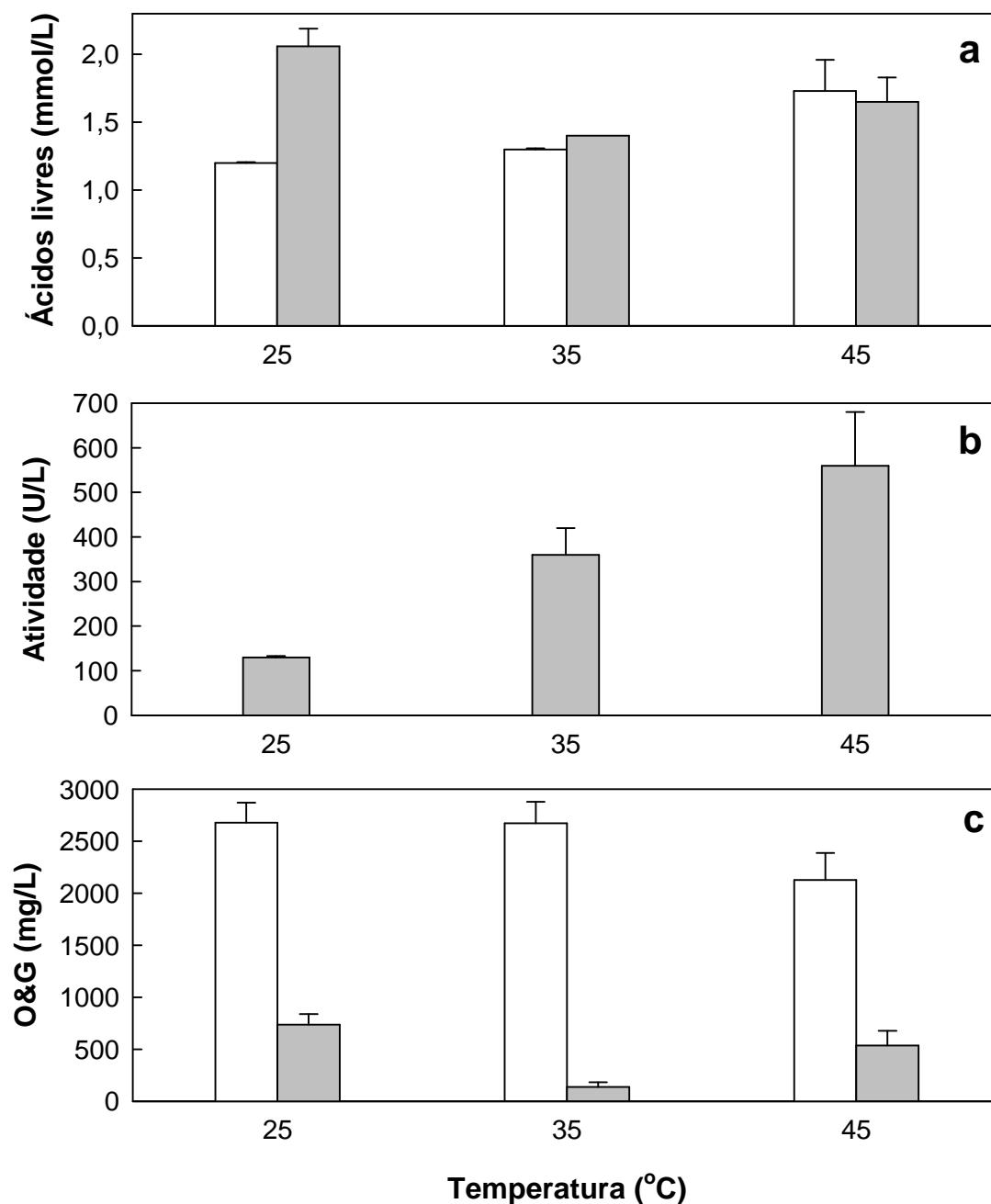


FIGURA 35 - (a) ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS LIVRES, (b) PERFIL DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E (c) REMOÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS (O&G) DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS

Condições de ensaio: 70 mL de efluente com adição de $3,5 \times 10^7$ esporos (■) e sem adição de $3,5 \times 10^7$ esporos (□) incubados nas temperaturas 25°C, 35°C e 45°C, agitação 150 rpm por 72 h. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

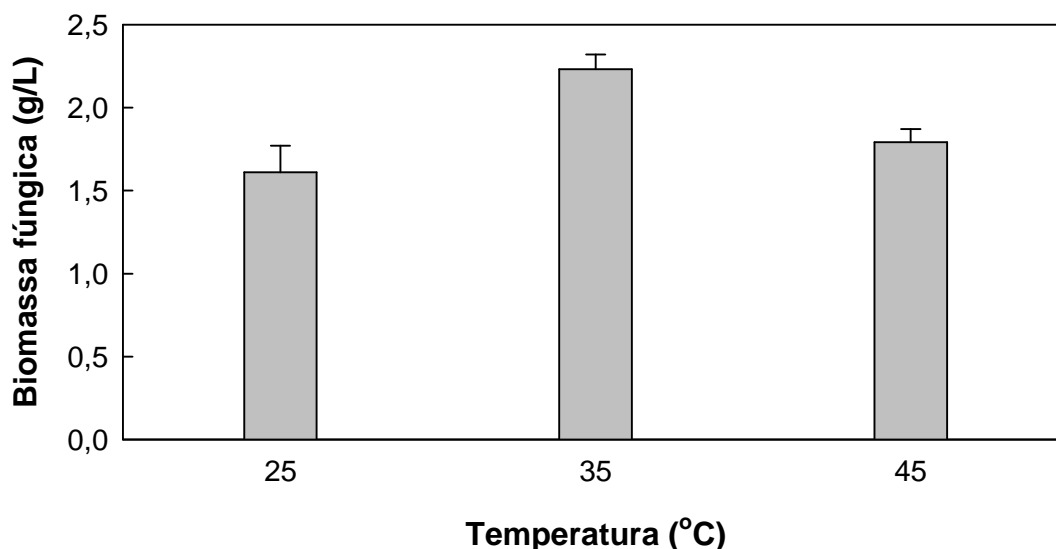


FIGURA 36 - EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM DURANTE O TRATAMENTO DO EFLUENTE ESTÉRIL COM SUSPENSÃO DE ESPOROS

Condições de ensaio: 70 mL de efluente com adição de $3,5 \times 10^7$ esporos (■) incubados nas temperaturas 25°C, 35°C e 45°C, agitação 150 rpm por 72 h. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de três determinações.

Quando os resultados da hidrólise do efluente com sólido fermentado e esporos são comparados, observa-se que o maior peso de biomassa seca 0,55 g/L e 2,23 g/L, respectivamente, foi obtido na temperatura de 35°C. A diferença desses valores de biomassa mostra que a biomassa fúngica contida no sólido fermentado foi inferior à concentração inicial de esporos. Em relação à remoção de O&G, a hidrólise com esporos resultou na diminuição de 95% e 75 % do teor da gordura inicial nas temperaturas de 35°C e 45°C, enquanto no sólido fermentado a remoção foi de 50% para ambas temperaturas. A atividade lipolítica detectada no efluente mostrou que para o efluente tratado com esporos, a maior atividade foi detectada na temperatura de 45°C (560 U/L), enquanto que para o sólido fermentado o maior valor de atividade foi de 1970 U/L na temperatura de 35°C. Independente da temperatura de ação observou-se que no efluente contendo sólido fermentado, a detecção de atividade foi maior do que para o tratamento com esporos. No entanto, a remoção de O&G foi maior para o tratamento com esporos. Provavelmente, a limitação na

remoção de O&G no tratamento com sólido fermentado deve-se ao tamanho e tipo de inóculo, pois a biomassa seca foi de 0,55 g/L para o efluente tratado com sólido fermentado e 2,23 g/L para o efluente tratado com esporos. Além disso, tem-se a diferença do tempo de tratamento, enquanto o sólido fermentado foi incubado por 12 h, os esporos foram incubados por 72 h.

5.7 ESTUDOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E BIODEGRADABILIDADE REFERENTE AO SEGUNDO LOTE DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS NÃO ESTERILIZADO E PREVIAMENTE ESTERILIZADO

Os experimentos de hidrólise do efluente de laticínios apresentados até aqui foram feitos a partir de um único lote de efluente que foi coletado e congelado. Porém, devido ao longo tempo de congelamento (15 meses), decidiu-se realizar uma nova coleta, que serviu também para avaliar o efeito do tratamento com sólido fermentado em um efluente não-esterilizado, para validar os resultados obtidos nas etapas anteriores deste trabalho. Foram feitos experimentos de hidrólise com o sólido fermentado (0,3% m/v), comparando-se amostras autoclavadas com não autoclavadas. Os experimentos foram seguidos nos tempos de 12 h e 72 h, e foram avaliados os parâmetros O&G, atividade lipolítica e ácidos livres, DQO e DBO₅. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Os resultados mostram primeiramente que a remoção de O&G foi de 78% e 80% para ambos os efluentes (estéril e não estéril) tratados com sólido fermentado durante 72 h (Tabela 13). No efluente não esterilizado sem adição de sólido fermentado foi observada uma remoção de O&G de 37% no mesmo tempo, indicando a ação dos microrganismos endógenos do efluente, que foi menos eficiente do que o tratamento com sólido fermentado.

TABELA 13 – PARÂMETROS DETERMINADOS NO SEGUNDO LOTE DE EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DR

Parâmetros e tratamentos	Tempo de tratamento (h)		
	0	12	72
UFC/L			
Não esterilizado	$2,42 \times 10^9$	$6,76 \times 10^9$	$1,07 \times 10^{12}$
Não esterilizado + SF	$2,42 \times 10^9$	$1,63 \times 10^{10}$	$3,16 \times 10^{12}$
Biomassa fúngica (g/L)			
Não esterilizado + SF	0	0	0
Esterilizado	nd	nd	nd
Esterilizado + SF	0	$0,85 \pm 0,03$	$1,53 \pm 0,07$
DBO₅ (mg/L)			
Esterilizado	3130	3352	3551
Não Esterilizado	4499	2190	808
Esterilizado + SF	3130	3977	1329
Não esterilizado + SF	4499	3035	371
DQO (mg/L)			
Esterilizado	5378	5657	6813
Não esterilizado	5892	7335	4048
Esterilizado + SF	5378	6235	2988
Não esterilizado + SF	5892	6733	3126
DBO₅/DQO			
Esterilizado	0,58	0,59	0,52
Não Esterilizado	0,76	0,30	0,20
Esterilizado + SF	0,58	0,64	0,44
Não esterilizado + SF	0,76	0,45	0,12
O&G (mg/L)			
Esterilizado	1598 ± 20	1357 ± 16	1345 ± 22
Não Esterilizado	1358 ± 20	1210 ± 4	848 ± 50
Esterilizado + SF	1598 ± 20	1118 ± 74	348 ± 17
Não esterilizado + SF	1358 ± 20	1088 ± 51	268 ± 25

Condições de hidrólise: 500 mL de efluente + 1,5 g de sólido fermentado (SF) contendo 50 U incubados a 35°C e 150 rpm. UFC: unidade formadora de colônia.

Ao contrário do experimento feito com efluente esterilizado, onde houve produção de biomassa por *R. microsporus* (1,5 g/L), não foi detectada biomassa fúngica no efluente não-esterilizado (Tabela 13). Provavelmente o fungo contido no sólido teve o crescimento inibido pela ação dos microrganismos endógenos do efluente. Portanto, esses resultados indicam que a maior remoção de O&G (80%) no efluente tratado com SF deve-se à ação de hidrólise dos lipídeos pelas lipases contidas no sólido, que disponibilizaram moléculas mais simples para os microrganismos do efluente.

Alguns trabalhos discutem a interferência dos microrganismos endógenos na hidrólise do efluente, mas apenas no sentido de mostrar que, quanto maior o tempo de hidrólise, maior a remoção de ácidos livres pelos microrganismos do efluente. Cammarota, Teixeira e Freire (2001) verificaram o declínio na concentração de ácidos livres após 24 h de incubação do efluente com diferentes concentrações de sólido fermentado devido à ação de microrganismos do próprio efluente, e como solução, selecionaram o tempo de 12 h para diminuir a interferência desses microrganismos. No entanto, após a hidrólise de 12 h com 0,1%, 0,2% e 0,5% de sólido fermentado, o efluente, cuja concentração inicial de O&G era de 800 mg/L, passou a ter os seguintes valores de O&G no efluente: 718 mg/L, 531 mg/L e 534 mg/L, respectivamente; em termos de percentuais, a remoção de O&G foi de 10, 34 e 33%, indicando a ação dos microrganismos endógenos. Leal *et al.* (2002) observaram esse declínio na concentração de ácidos depois de 6 h de tratamento do efluente com 10% (v/v) de extrato aquoso contendo lipases obtido da extração do sólido fermentado de *Penicillium restrictum*. Rigo *et al.* (2008a) afirmaram que os microrganismos do efluente não interferiram na hidrólise enzimática. Mesmo que a ação dos microrganismos no processo de hidrólise seja considerada desprezível por esses autores, pode-se observar pela razão DBO_5/DQO que, dependendo do grau de remoção de O&G, a biodegradabilidade do efluente é alterada (Tabela 13). Além disso, conforme apresentado na revisão bibliográfica, estudos são realizados para determinar a concentração de O&G que gera problemas operacionais ao tratamento biológico. Assim, o tratamento com sólido fermentado torna-se interessante como coadjuvante dos tratamentos biológicos, pois além de hidrolisar, remove gordura.

Em relação aos valores de DBO_5 , o efluente esterilizado sem adição de sólido fermentado manteve o nível de DBO_5 constante em todos os tempos de tratamento. Para as outras três condições de tratamento mostradas na Tabela 13, houve uma redução significativa de DBO_5 no tempo de 72 h, sendo que a maior remoção de DBO_5 ocorreu para no efluente não estéril tratado com sólido fermentado, indicando a ação sinérgica entre a enzima liberada do sólido fermentado e os microrganismos endógenos do efluente.

Como ocorreu para o primeiro lote de efluente (Tabela 9), o efluente esterilizado tratado com sólido fermentado, primeiro aumentou a DBO_5 de aproximadamente 3000 mg/L no efluente original para um 4000 mg/L em 12 h de tratamento, e depois diminuiu para um valor em torno de 1000 mg/L após 72 h de tratamento. Para o efluente não estéril tratado ou não com sólido fermentado, a DBO_5 diminuiu, alcançando valores abaixo de 1000 mg/L.

O valor de DQO no efluente esterilizado sem adição de sólido fermentado não diminuiu no tempo de 72 h de tratamento, enquanto que a remoção de DQO no efluente não esterilizado e nos efluentes esterilizado e não esterilizado pré-hidrolizados com sólido fermentado foi de 31%, 44% e 47%, respectivamente. Para o efluente não esterilizado sem adição de sólido fermentado incubado por 12 h, houve um aumento de 24% de DQO em relação ao tempo inicial.

Após 72 h de incubação do efluente não esterilizado e do efluente não esterilizado tratado com sólido fermentado, observou-se que em relação ao tempo inicial, houve um aumento de 1000 vezes no número de microrganismos endógenos para ambos os casos, acompanhado por uma remoção de 31% e 47% de DQO para o efluente não esterilizado e para o efluente não esterilizado tratado com sólido fermentado, respectivamente. A remoção de DBO_5 para os dois efluentes foi 82% e 92%, enquanto o teor de O&G foi removido 38% e 80%. Esses resultados mostram o efeito positivo da pré-hidrolise do efluente não estéril com sólido fermentado.

Como resultado das mudanças em DBO_5 e DQO, o valor de DBO_5/DQO ,

em 72 h de tratamento, caiu significativamente para efluente não estéril tratado e não tratado com sólido fermentado. Para a amostra tratada com sólido fermentado a razão caiu para 0,12, enquanto que para o efluente não tratado, a razão de biodegradabilidade foi 0,2, indicando que apenas 12% e 20%, respectivamente, da carga orgânica total representada pela DQO seria biodegradável. Esses baixos valores da razão DBO_5/DQO significam que o efluente poderia não ser apropriado para o tratamento biológico subsequente, sugerindo que o tratamento poderia ser interrompido antes de 72 h ou que a DQO residual não biodegradada em 5 dias, deveria permanecer um período maior em contato com o lodo ativado.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho comprovou-se a eficiência da ação do sólido fermentado produzido por *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM na hidrólise e na remoção de lipídeos de efluente de indústria de laticínios. Os experimentos foram feitos com amostras de efluente esterilizadas e não esterilizadas, provenientes de duas coletas, com características físico-químicas significativamente diferentes. O tratamento do efluente com o sólido fermentado foi eficiente em ambos os casos, em termos de remoção de gordura, de DQO e de DBO₅, mostrando a viabilidade de aplicação do sólido fermentado em uma situação real de hidrólise de efluentes.

As principais conclusões relacionadas a cada etapa do trabalho foram:

- A estirpe 43 a IV, identificada como *Rhizopus microsporus*, foi selecionada para os estudos de produção de lipases por FES, por ter apresentado o maior pico de produção de lipases (1,1 U/mL) em 24 h de cultivo quando comparada com as demais testadas;
- A mistura de farelo de semente de girassol e bagaço de cana não tratado previamente, na proporção 1:3, foi adequada para produção de lipases por *R. microsporus*, apresentando atividades de 25 U/gSS contra a trioleína e 60 U/gSS contra a tricaprilina;
- No efluente esterilizado, incubado com sólido fermentado, foi detectado pico de concentração de ácidos livres e atividade lipolítica após 12 h, crescimento do fungo até 48 h e remoção de O&G de 83% após 72 h de tratamento;
- No efluente esterilizado, incubado com suspensão de esporos de *R. microsporus*, foi detectado pico de concentração de ácidos livres e atividade lipolítica após 12 e 24 h, crescimento do fungo até 48 h e remoção de 78% de O&G após 72 h de tratamento;

- Após 12 h de incubação com sólido fermentado, a razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO) para o efluente esterilizado foi superior a 0,6 e caiu para 0,44 após 72 h de tratamento;
- Pelo teste de biodegradabilidade de Zahn-Wellens, o efluente esterilizado pré-hidrolisado com sólido fermentado apresentou melhor biodegradabilidade em relação ao efluente bruto e pré-hidrolisado por 72 h, com remoção total de DQO_d no terceiro dia de tratamento;
- No efluente não esterilizado, as lipases do sólido fermentado hidrolisaram os lipídeos e os produtos da hidrólise foram removidos pelos microrganismos endógenos, já que não foi detectado o crescimento de *R. microsporus*;
- A ação sinérgica das lipases do sólido fermentado com a microbiota do efluente resultou na remoção de 80% de O&G no tempo de 72 h, enquanto a microbiota no mesmo tempo de tratamento removeu 38% de O&G;
- O tratamento com sólido fermentado por 12 h aumentou a biodegradabilidade ($DBO_5/DQO = 0,44$) do efluente não esterilizado em relação ao efluente não esterilizado sem tratamento com sólido fermentado ($DBO_5/DQO = 0,30$). No entanto, no tempo de 72 h, a biodegradabilidade foi baixa tanto para o efluente não estéril tratado com sólido fermentado ($DBO_5/DQO = 0,12$) quanto para o efluente não estéril ($DBO_5/DQO = 0,20$), devido ao consumo da matéria orgânica biodegradável pela microbiota do efluente nesse tempo de incubação.

7 TRABALHOS FUTUROS

O estudo da hidrólise dos lipídeos do efluente de laticínios com o sólido fermentado por *R. microsporus* permitiu identificar pontos no campo da FES, como no tratamento do efluente, a serem explorados, como:

- Estudos de escalonamento da produção das lipases por FES em biorreator piloto;
- Purificação e estudo das características bioquímicas das lipases contidas no sólido fermentado;
- Estudos da biodegradabilidade do efluente, em faixas menores de tempo, por método de respirometria;
- Estudos de biodegradabilidade do efluente pré-hidrolisado em reatores anaeróbios;
- Estudos da ação do sólido fermentado na diminuição do tamanho da matéria lipídica particulada;
- Estudos exploratórios do desenvolvimento do fungo *R. microsporus* no efluente, quando adicionado em diferentes fases de crescimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNÃ-ARGÜELES, M.E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 808-814, 1995.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; VAN OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 9, p. 995–1013, 2006.

ALVES, M.M.; VIEIRA MOTA, J.A.; ÁLVARES PEREIRA, R.M.; PEREIRA, M.A.; MOTA, M. Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: oleic acid toxicity and biodegradability. **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 264-270, 2001.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg. AOAC International, 2005

AOCS, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, AOCS: Champaign, 2004.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA, 2005.

AZBAR, N.; YONAR, T. Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW). **Process Biochemistry**, v. 39, n.7, p. 869-875, 2004.

AZEREDO, L.A.I.; GOMES, P.M.; SANT'ANNA JR, G.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium*

restrictum in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 361-365, 2007.

BECKER, P.; KÖSTER, D.; POPOV, M.N.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MÄRKL, H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. **Water Research**, v. 33, n. 3, p. 653-660, 1999.

BENJAMIN; S.; PANDEY, A. Mixed-solid substrate fermentation. A novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. **Acta Biotechnologica**, v. 18, n. 4, p. 315-324, 2004.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADY, L.; BRZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGENJENSEN, B.; NORSKOV, L; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. Manual de tratamento de águas residuárias industriais. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, São Paulo, 764p, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 26 de dez. 2003

BRUM, L.F.W.; SANTOS JÚNIOR, L.C.O.; BENEDETTIC, B.S. Reaproveitamento de Água de Processo e Resíduos da Indústria de Laticínios. **2nd International Workshop Advances in Cleaner Production**, São Paulo, Brazil, 2009.

BRZOZOWSKI, A.M.; SAVAGE, H.; VERMA, C.S.; TURKENBURG, J.P.; LAWSON, D.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071–15082, 2000.

BUSHAN, B.; DOSANJH, N.S.; KUMAR, K.; HOONDAL, G.S. Lipase production from alkalophilic yeast sp by solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 841-842, 1994.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; DE ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 441-448, 2008.

CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. 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, 2006.

CAMPOS, J.R. Tratamento de efluentes sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: ABES, 435p, 1999.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, 614-621, 2005.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, J.R.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CAVALCANTI, E. D'A. C.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANA JR, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 79-84, 2005.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 215-222, 2000.

CHEN, Y.; CHENG, J.J.; CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044-4064, 2008.

CHERNICARO, C.A.L. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, Reatores anaeróbios. Belo Horizonte, v. 5, 246p, 1997.

CHIPASA, K.B.; MĘDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 635-645, 2006.

CIRNE, D.G.; PALOUMET, X.; BJÖRNSSON, L.; ALVES, M.M.; MATTIASSON, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste – Effects of lipid concentration. **Renewable Energy**, v. 32, n. 6, p. 965-975, 2007.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase. 206f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

CONAMA 357 – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, LEGISLAÇÃO

AMBIENTAL FEDERAL, **Resolução nº 357**, 2005. Disponível em www.mma.gov.br. Acesso em 20/01/2006.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 75-78, 1998.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry-a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

DAMASCENO, F.R.C.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Impact of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 730-738, 2008.

DANALEWICH, J.R.; PAPAGIANNIS, T.G.; BELYEA, R.L.; TUMBLESON, M.E.; RASKIN, L. Characterization of dairy waste streams current treatment practices, and potential for biological nutrient removal. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3555-3568, 1998.

DEIVE, F.J.; CARVALHO, E.; PASTRANA, L.; RÚA, M.L.; LONGO, M.A.; SANROMAN, M.A. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3630-3637, 2009.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n.1-2, p.75-80, 1998.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; WINKLER, F.K. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. **Faraday Discuss**, v. 93, p. 95-105, 1992.

DONKIN, M.J. Bulking in aerobic biological systems treating dairy processing wastewaters. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 2, p. 67-72, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analysis Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-355, 1956.

DURAND, A. Birreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 313, n. 2-3, p. 113-125, 2002.

DURLI, E. Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderia cepacia LTEB11. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

EIKELBOON, D.H. Filamentous organisms observed in activated sludge. **Water Research**, v. 9, p. 365-388, 1975.

EI-BESTAWY, E.; EL-MASRY, M.H.; EL-ADL, N.E. The potentiality of free Gram negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 815-822, 2005.

EL-ENSHASY, H.A.; FARID, M.A.; EL-SAYED, E.A. Influence of inoculum type

and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 5-6, p. 333-342, 2000.

ELIBOL, M.; ÖZER, D. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 219-223, 2000.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 97-103, 1998.

FERNANDES, M.L.M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 120f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GAVALA, H.N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I.V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 73, n. 1, p. 59-63, 1999.

GHAMGUI, H.; NABIL, M.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparison study. **Biochemical Engineering**, v. 37, n. 1, p. 34-41, 2007.

GILBERT, E.J. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 8, p. 634-645, 1993.

GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais. Apostila. UFMT, 2004. Disponível em www.ufmt.br/efluentesindustriais. Acesso em: 10/12/2005.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 5, p. 317-322, 2009.

GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L., CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n.1-2, p. 85-90, 1999.

GRADY, C.P.L.; DAIGGER, G.T.; LIM, H.C. Biological wastewater treatment. 2^a ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 1076 p.

GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; SILVA, J.N.; GUEDES, I.A.; LINS, U.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations. **Biotechnology Journal**, v.4, p. 1-10, 2009.

HARDIN, M.T.; MITCHELL, D.A.; HOWES, T. An approach to designing rotating drum bioreactors for solid-state fermentation on the basis of dimensionless design factors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 3, p. 274-282, 2000.

HARDIN, M.T.; HOWES, T.; MITCHELL, D.A. Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 145-153, 2001

HARDIN, M.T.; HOWES, T.; MITCHELL, D.A. Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 89-101, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAUA, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.

HJORTH, A.; CARRIÈRE, F.; CUDREY, C.; WÖLDIKE, H.; BOEL, E.;

LAWSON, F.F.; CAMBILLAU, C.; DODSON, G.G.; THIM, L.; VERGER, R. A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4702-4707, 1993.

HÖLKER, U; HÖFER, M; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HÖLKER, U; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HSU, K.H.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Promoter analysis and differential expression of the *Candida rugosa* lipase gene family in response to culture conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1992-1998, 2008.

HWU, C.S.; TSENG, S.K.; YUAN, C.Y.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1571-1579, 1998.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. Disponível em: w.w.w.iap.pr.gov.br. Acesso em: 20/11/2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

IKASARI, L., MITCHELL, D.A., 1996. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 171–175, 1996.

IWAMOTO, T.; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective.

Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 92, n. 1, p. 1-8, 2001.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DĘBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4199-4205, 2008.

JANSSEN, P.H.; MONK, C.R.; MORGAN, W.H. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 120, v. 1-2, p.195-200, 1994.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 1, p. 121-128, 2006.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, n. 1-2, 127-135, 2007.

JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. Manual on the causes and

control of activated sludge bulking and foaming, 2^a ed. USA: Lewis Publishers. 190 p., 1993.

JORDÃO, E.D.; PESSÔA, C.A.: Tratamento de esgotos domésticos. 3^a ed., Rio de Janeiro: ABES. 720 p, 1995.

JÖRDENING, H.J.; WINTER, J. Environmental Biotechnology: Concepts and applications. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 450 p, 2005.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797-1802, 2002.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

KEMPKA, A.P.; LIPKE, N.L.; PINHEIRO, T.L.F.; MENOCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

KIM, H.K.; PARK, S.Y.; LEE, J.K.; OH, T.K. Gene cloning and characterization of thermoestable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 66-71, 1998.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environment Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KRAHL, M. E.; KELTCH, A. K.; NEUBECK, C. E.; CLOWES, G. H. A. Studies on cell metabolism and cell division - V. Cytochrome oxidase activity in the eggs of *Arbacia punctulata*. **The Journal of General Physiology**, v. 24, p. 597-617, 1941.

KRIEGER, N. Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências–Bioquímica)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KUANG, Y.; LEPESTEUR, M.; PULLAMMANAPPALLIL, P.; HO, G.E. Influence of co-substrates on structure of microbial aggregates in long-chain fatty acid-fed anaerobic digesters. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 190–194, 2002.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; BALDI, D.; ANGRISANI, R.; SUZZI, G.; MASTROCOLA, D.; GUERZONI, M.E. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive Mill wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 317-322, 2005.

LEAL, M.C.C.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, 175-180, 2002.

LEAL, M.C.C.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LEE; W.H.L.; KIM, K.J.; KIM, M.G.; LEE, S.B. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 613-615, 1995.

LEE, D.W.; KOH, Y.S.; KIM, K.J.; KIM, B.C. CHOI, H.J.; KIM, D.S.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y.R. Isolation and characterization of a

thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 393-400, 1999.

LEFEBVRE, X.; PAUL, E.; MAURET, M. Kinetic characterization of saponified lipid residues aerobic biodegradation. **Water Research**, v. 32, n. 10, p. 3031-3038, 1998.

LI, Q.S.; ZHONG, J.J. Short communication: production of L- glutamate oxidase by *Streptomyces* sp. N1 in submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v, 12, n. 6, p. 651-652, 1996.

LI, D.; WANG, B.; TAN, T. Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 40-43, 2006.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 65–71, 2004.

LONGHI, S.; CAMBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1441, n. 2-3, p. 185-196, 1999.

LOPERENA, L.; FERRARI, M.D.; DÍAZ, A.L.; INGOLD, G.; PÉREZ, L.V.; CARVALLO, F.; TRAVERS, T.; MENES, R.J.; LAREO, C. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1762–1766, 2009.

MACHADO, R.M.G.; SILVA, P.C.; CASSEB, M.M.S.; PRINCE, A.A.; FREIRE, V.H. Sistemas de tratamento utilizados para efluentes líquidos de laticínios. 20^o **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, 1999.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MALA, J.G.S.; EDWINOLIVER, N.G.; KAMINI, N.R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247-253, 2007.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 145-155, 2001.

MASSE, L.; MASSE, D. I.; KENNEDY, K.J. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p.1365-1372, 2003.

MATSUMIYA, Y.; WAKITA, D.; KIMURAM, A.; SANPA, S.; KUBO, M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 325-330, 2007.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENDES; A.A.; PEREIRA; E.B.; CASTRO, H.F. Biodegradation of wastewater from dairy industries previously treated with lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p. 143-149, 2006.

METCALF e EDDY. Wastewater engineering – Treatment and reuse. 4^a ed. Nova York: McGraw-Hill: 1819 p., 2003.

MIGA - Multilateral Investment Guarantee Agency. Environmental Guidelines

for Dairy Industry. Disponível em www.miga.org/documents/dairyindustry. Acesso em 22/07/2008.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002a.

MITCHELL, D.A.; TONGTA, A.; STUART, D.M.; KRIEGER, N. The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 1, p. 114-122, 2002b.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; LUIZ, F.L.; LIMA, JR.; KRIEGER, N. Evaluation of productivity of Zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 135-144, 2002c.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A, VON MEIEN O.F., KRIEGER, N., DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 1, p.15-26, 2004.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 101-105, 2002.

MUSTRANTA, A. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 1992.

OECD Guidelines – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals: 302B, 1996.

OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 357-360, 2000.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29: p. 119-131, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. New York: The Haworth Press, 735 p, 2004.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1549-1554, 1995.

PETRUY, R; LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 2, p. 141-149, 1997.

PUJOL, R.; DUCHENE, P.; SCHETRITTE, S.; CANLER, J. Biological foams in

activated sludge plants: characterization and situation. **Water Research**, v. 25, n. 11, p. 1399-1404, 1991.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 127–135, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 985-992, 2009.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S.K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2000-2009, 2007

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; DE OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Comparison of two lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. **Industry and Engineering Chemical Research**, v. 47, n. 6, p. 1760-1765, 2008a.

RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; DE OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 9, p. 1243-1248, 2008b.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

ROSA, D.R. Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura. 107f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROSA, D.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.

SALAH, R.B.; MOSBAH, M.; FENDRI, A.; GARGOURI, A.; GARGOURI, Y.; MEJDOUB, H. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, n. 2, p. 241–248, 2006.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SBRT – Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas. Tratamento de resíduos e principais análises realizadas, 2006. Disponível em: www.respotatecnica.org.br. Acesso em: 14/06/09.

SBRT – Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas. Padrões microbiológicos para salas de processamento de laticínios, 2007. Disponível em: www.respotatecnica.org.br. Acesso em: 20/06/09.

SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 85 – 107, 1997.

SCHRYVER, P.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 125–137, 2008.

SCIOLI, C.; VOLLARO, V. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. **Water Research**, v. 31, n. 10, p. 2520-2524, 1997.

SEBRAE, - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Disponível em: sebrae.com.br. Acesso em 30/05/2009.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. Research review paper. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 3, p. 123-137, 1987.

SIDHU, P.; SHARMA, R.; SONI, S.K.; GUPTA, J.K. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. **Folia Microbiologica**, v. 413, n. 1, p. 51-54, 1998.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 3, p. 1070-1074, 1986.

SUN, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its

esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.

THASSITOU, P.K.; ARVANITOYANNIS, I.S. Bioremediation: a novel approach to food waste management. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 5-6, p. 185-196, 2001.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

TSANG, Y.F.; SIN, S.N.; CHUA, H. *Nocardia* foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, 3381–3388, 2008.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-641, 2002.

URBAIN, V.; BLOCK, J.C.; MANEM, J. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. **Water Research**, v. 27, n. 5, p. 829-838, 1993.

VALLADÃO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, n. 4, p. 219-225, 2007.

VARGAS, G.D.L.P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada, Rio Grande do Sul, 2004.

VEIGA, A.A. Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e microorganismos em reatores aeróbios em série. 116f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32 – 38, 1997.

VICCINI, G.; MITCHELL, D.A.; BOIT, S.D.; GERN J.C.; DA ROSA, A.S., COSTA, R.M.; DALSENER, F.D.H.; VON MEIEN O.F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 271-294, 2001.

VICCINI, G., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. A model for converting solid state fermentation growth profiles between absolute and relative measurement bases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 191-201, 2003.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, 231-239, 2000.

VON MEIEN, O.F.; MITCHELL, D.A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4. p. 416-428, 2002.

VON SPERLING, M. Princípios básicos do tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, v.2, 210p, 1996.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Lodos Ativados. 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, v.4, 416 p, 1997.

WAKELIN, N.G.; FORSTER, C.F. An investigation into microbial removal of fats oils and greases. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 1997.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K.C.; SHEN, G.J.; WANG, H.Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 5, p. 433-438, 1995.

WANG, D; XU, Y; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 30-37, 2008.

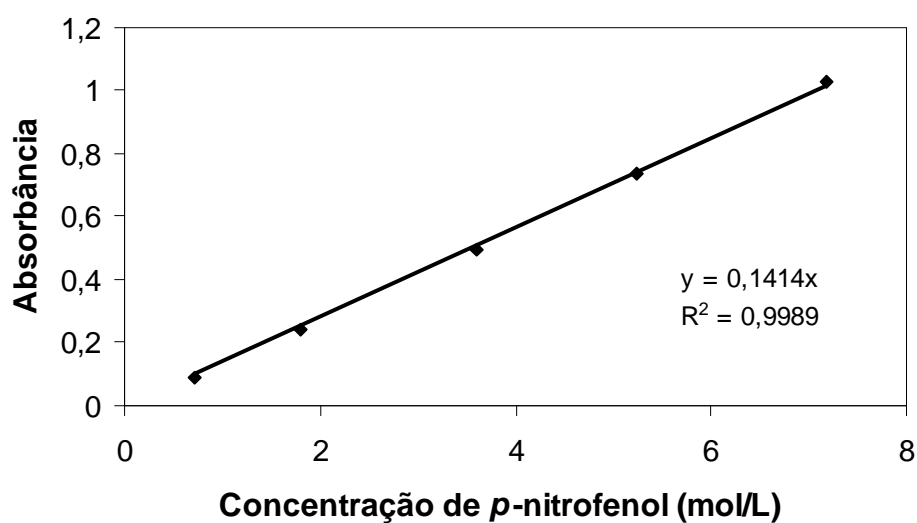
WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

ZHANG, L.Y.; WEI, D.Z.; TONG, W.Y. Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa*. **Annals of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 499-504, 2003.



ZHU, K.; JUTILA, A.; TUOMINEN, E.K.J.; PATKAR, S.A.; SVENDSEN, A.; KINNUNEN, P.K.J. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1547, n. 2, p. 329-338, 2001.

ANEXO I

CURVA DO *p*-NITROFENOL PARA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR

O valor do coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol é o coeficiente angular da equação da reta. Portanto, o *p*-nitrofenol em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8 possui o coeficiente de extinção molar de $1,4144 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

ANEXO II

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/2
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 312-07 DRM		PÁGINA: 2 de 6

Identificação de Fungo filamentososo por Taxonomia Molecular

1. Objetivos

- Identificação de uma linhagem de fungo filamentososo utilizando seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos de genes do *operon* ribossomal.

2. Metodologia utilizada

- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico da amostra foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985).
- **Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2.** A metodologia consistiu na amplificação das regiões ITS (*Internal Transcribed Space*) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 homólogos às extremidades da região ITS.
- **Seqüenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram ITS-1 e ITS-4.
- **Análise filogenética.** As seqüências parciais das regiões ITS obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 3.0 (Kumar et al., 2004). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 3.0.

3. Resultados


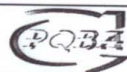
- Fragmentos da região ITS foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao seqüenciamento automático no sistema MegaBACE.
- A seqüência de DNA da região ITS está apresentada no Anexo I. Esta seqüência foi analisada usando a rotina BLAST do GenBank. A árvore filogenética construída a partir das seqüências recuperadas no GenBank, está apresentada na Figura 1.
- O resultado de identificação é apresentado a seguir, na Tabela 1.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/2
---	--	--

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 312-07 DRM	PÁGINA: 3 de 6
-----------------------------------	----------------

Tabela 1. Identificação taxonômica por métodos moleculares

Amostra	Identificação taxonômica	% similaridade BLAST
CPQBA 312-07 DRM (43a)	<i>Rhizopus microsporus</i>	98%
	<i>Rhizopus oryzae</i>	98%
	<i>Rhizopus azygosporus</i>	98%

4. Comentários


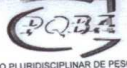
- Os resultados derivados das análises moleculares permitiram a identificação da amostra **CPQBA 312-07 DRM** como *Rhizopus* sp.
- A seqüência parcial da região D1/D2 do DNAr 28S da amostra **CPQBA 312-07 DRM (43a)** apresentou 98% de similaridade com as seqüências da mesma região do *operon* ribossomal de diferentes espécies de *Rhizopus*, a saber: *R. microsporus*, *R. oryzae* e *R. azygosporus*. Este resultado indica que a região ITS apresenta alto grau de conservação dentre as espécies do gênero *Rhizopus*.
- Os dados derivados da análise filogenética (Figura 1) corroboraram os resultados do BLAST, visto que a amostra **CPQBA 312-07 DRM** apresentou estreita relação (bootstrap de 99%) com um cluster formado por várias espécies de *Rhizopus*.
- Análises adicionais de taxonomia convencional foram conduzidas, visando a obtenção de uma identificação taxonômica mais acurada para a amostra **CPQBA 312-07 DRM**. Os dados obtidos das análises macro e microscópicas da amostra **CPQBA 312-07 DRM** após crescimento em meio ágar extrato de malte a 28°C conferem com os dados descritos em literatura para o fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* (Hoog et al., 2000; Domsch et al., 1980):
 - características macroscópicas: colônias expandidas; cabeludas, cinza-marrom com crescimento para cima. Reverso da colônia amarelado.
 - características microscópicas: esporangióforos de coloração marrom, medindo até 400 μm em comprimento e de 8-10 μm em largura; esporângio esférico medindo até 100 μm em diâmetro; columela esférica; esporangiósporos hialinos de forma elipsoidal ou subesférica, a maioria medindo entre 6-9 μm em comprimento.
- Os dados combinados da análise taxonômica molecular e convencional da amostra **CPQBA 312-07 DRM** permitiram a afiliação deste fungo filamentoso como *Rhizopus microsporus*.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/2
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 312-07 DRM		PÁGINA: 5 de 6

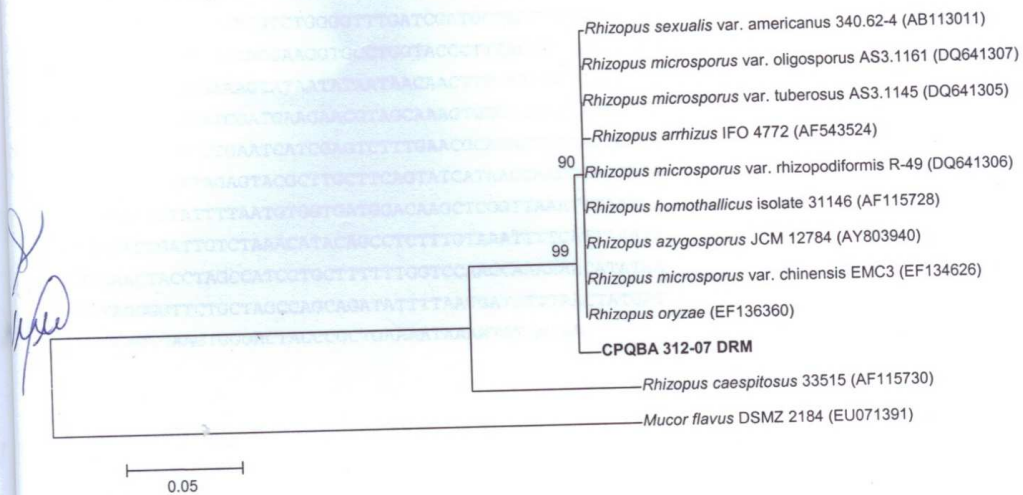


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando a relação filogenética entre a amostra **CPQBA 312-07 DRM** e linhagens de microrganismos relacionados com base em seqüências da região ITS.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br