

EDNEIA DURLI

**TRATAMENTO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS
UTILIZANDO LIPASES DE *Burkholderia cepacia* LTEB11**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química ao Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Área de Concentração em Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. NADIA KRIEGER

CURITIBA, 2007

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo.

Aos meus amados pais, Terezinha e Ivanir pelo amor e pela força, fundamentais na minha formação.

A meu amado namorado Michel, pelo carinho, pelo amor, paciência e por me ajudar e me compreender nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Andreia e Edson pelo apoio e atenção.

As minhas sobrinhas Ana Carolina, Valentina, Eduarda e Maria Clara, pelo amor delas.

À minha orientadora, professora Nadia Krieger, por sua orientação, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos padrinhos Clemair e Celso, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos meus sogros, Zélia e Edson, pelas suas orações.

Ao professor Patricio Peralta Zamora e a doutoranda Geovani Zanella do departamento de química da UFPR, pelo empréstimo do espaço no laboratório de Química Ambiental e de materiais e pela ajuda nos testes de biodegradabilidade.

A doutoranda Dayane Alberton, do Departamento de Bioquímica da UFPR, que muito me ajudou no trabalho.

A indústria de Laticínios Batávia S.A, (Carambeí, PR), que cedeu o efluente.

Aos meus grandes amigos de laboratório, Alessandra, Cinthia, Dayane, Doumit, Joel, Érika, Malu, Marcelo, Safi, Thaís, Virgínia e Vivian, pelos momentos de descontração, pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

A todos os meus amigos do departamento de química da UFPR,

A todos os colegas e funcionários da Pós-Graduação do Departamento de Química.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. LIPASES	17
2.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	22
2.3. EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS	24
2.4. TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDIOS	26
2.4.1. Processos Físico-Químicos	28
2.4.2. Processos Biológicos	29
2.5. TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS EM EFLUENTES COM ELEVADOS TEORES DE ÓLEOS E GRAXAS	34
2.5.1. Introdução	34
2.5.2. O Estado-da-Arte	34
3. OBJETIVOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES	44
4.2. MICRORGANISMO	45
4.3. MANUTENÇÃO DA CEPA E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	45
4.4. PRODUÇÃO DA ENZIMA	46
4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	47
4.5.1. Método do pNPP	47
4.5.2. Método Titulométrico	48
4.5.3. Cálculo e Expressão da Atividade Enzimática Produzida por Fermentação no Estado Sólido	49
4.6. ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE	49

4.7. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO EFLUENTE	50
4.7.1. Experimentos Prévios	51
4.7.2. Otimização do tratamento enzimático por delineamento fatorial.....	52
4.8. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE	56
4.8.1. Origem e Coleta do Lodo Ativado.....	56
4.8.2. Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia	57
4.9. ESTUDOS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NO EFLUENTE	60
4.10. MÉTODOS ANALÍTICOS	61
4.10.1. Determinação do teor de ácidos livres	61
4.10.2. Óleos e Graxas	61
4.10.3. Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	63
4.10.4. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅).....	64
4.10.5. Razão de Biodegradabilidade (DBO ₅ /DQO).....	65
4.10.6. Sólidos Suspensos Totais (SST) do Lodo Ativado.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	67
5.1.1. Caracterização da enzima.....	67
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE	68
5.3. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO EFLUENTE	69
5.3.1 Tratamento com efluente não autoclavado.....	69
5.3.2 Tratamento com efluente autoclavado.....	74
5.4. ESTUDOS DE CRESCIMENTO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NO EFLUENTE	79
5.5. OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO POR DELINEAMENTO FATORIAL	81
5.5.1. Análise de variância para a resposta “Remoção de óleos e graxas”	83
5.5.2. Análise de variância para a resposta “Atividade enzimática detectada no efluente”	87
5.5.3. Análise de variância para a resposta “Ácidos Livres”.....	89
5.5.4. Análise de variância para a resposta “demanda química de oxigênio (DQO)”	90
5.5.5. Validação do Modelo Matemático Obtido para a variável Remoção de Óleos e Graxas	92
5.6. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE	94
5.6.1. Determinação da Razão de Biodegradabilidade DBO ₅ /DQO.....	94
5.6.2. Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia	95

6. CONCLUSÕES -----	100
7. PERSPECTIVAS FUTURAS -----	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases 18
- Figura 2. Modelo tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia* 19
- Figura 3. Primeiro tanque de recebimento do efluente da unidade de lácteos. 27
- Figura 4. Caixa de gordura da unidade de produtos cárneos..... 27
- Figura 5. Lagoa anaeróbia do efluente da unidade de produtos cárneos..... 27
- Figura 6. Lagoa anaeróbia do efluente da unidade de produtos cárneos..... 27
- Figura 7. Aproximação da cobertura da lagoa da unidade de produtos cárneos... 27
- Figura 8. Detalhe do ponto de saída do efluente de uma das lagoas anaeróbias. 27
- Figura 9. Lagoa de equalização na Indústria de Laticínios Batávia S.A., em cuja entrada foi feita a coleta de amostras do efluente. 50
- Figura 10. Relação de diferentes quantidades de gordura adicionadas ao efluente com o teor de óleos e graxas obtidos no efluente após homogeneização em agitador mecânico por 2 h. 53
- Figura 11. Reatores utilizados para o teste de biodegradabilidade aeróbio. A aeração e a turbulência são proporcionadas por difusores de pedra porosa ligados a uma bomba de aquário de forma a manter o oxigênio dissolvido (OD) entre 2 e 6 mg/L. Esta foto é do momento de sedimentação do lodo para a coleta da amostra para análise de DQO. 57
- Figura 12. Curva de calibração para determinação da demanda química de oxigênio (DQO)..... 64
- Figura 13. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Concentração de óleos e graxas: 167 mg/L±15 (-■-), 242mg/L±20 (-●-), 348mg/L± 7 (-▲-), 690±35 mg/L (-▼-). Condições: 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm..... 71
- Figura 14. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente não-autoclavado com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 464±16 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm..... 73
- Figura 15. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente (autoclavado) com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração

- inicial de 167 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm..... 76
- Figura 16. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente (autoclavado) com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 341±22 mg/L de óleos e graxas, 0,1 % do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm..... 77
- Figura 17. Cinética de crescimento de *Burkholderia cepacia* LTEB11 nos meios: LB (1% de óleo de oliva) (-●-), LB (-■-), Efluente bruto (-▲-), sólido fermentado inoculado no efluente bruto (-▼-). Condições: concentração de O&G inicial do efluente 255 mg/L, 0,2% do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0, incubação 32 °C e 150 rpm..... 80
- Figura 18. Superfície de resposta para a variável “% de remoção de óleos e graxas” no tratamento enzimático do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11..... 85
- Figura 19. Superfície de resposta para a variável “atividade enzimática detectada no efluente” no tratamento enzimático do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11. 89
- Figura 20. Cinética de remoção de óleos e graxas no tratamento do efluente com lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 255 mg/L de óleos e graxas, 0,2 % do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0, incubação 32 °C e 150 rpm. 93
- Figura 21. Biodegradabilidade aeróbia – teste de Zahn-Wellens. Variação da DQO em amostras de efluente tratado com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Controle com glucose (-●-), efluente hidrolisado (-◆-), efluente bruto (-▲-), controle de dietilenoglicol (-■-). Condições pré-hidrólise: concentração inicial de 255±11 mg/L de óleos e graxas, 0,2 % do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0 incubação a 32 °C e 150 rpm..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada	21
Tabela 2. Descrição dos equipamentos utilizados nesse trabalho.	44
Tabela 3. Principais reagentes utilizados nesse trabalho	45
Tabela 4. Delineamento de Box-Behnken (BOX e BEHNKEN, 1960) com as variáveis independentes originais e codificadas para o tratamento enzimático de efluente da indústria de laticínios	54
Tabela 5. Condições gerais de avaliação da biodegradabilidade aeróbia (Zahn Wellens) de efluentes	58
Tabela 6. Caracterização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 produzida por fermentação no estado sólido	67
Tabela 7. Caracterização do efluente produzido pela Indústria de laticínios	69
Tabela 8. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção após 24 h de tratamento do efluente com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.	71
Tabela 9. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção após 24 h de tratamento do efluente (não-autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.	73
Tabela 10. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção de gordura após 24 e 48 h de tratamento do efluente (autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.	75
Tabela 11. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção de gordura após 48 e 72 h de tratamento do efluente (autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.	78
Tabela 12. Caracterização do efluente de indústria de laticínios utilizado para os experimentos de otimização por delineamento fatorial.....	81
Tabela 13. Delineamento fatorial 3 ³ incompleto (BOX e BEHNKEN, 1960) aplicado na otimização do tratamento de efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11. Resultados experimentais obtidos para as respostas remoção de O&G, atividade enzimática no efluente, [E] _{eff} , e DQO.....	82

Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta de “remoção de óleos e graxas (%)” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2= 0,98$	83
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a variável “remoção de óleos e graxas (%)” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13.....	84
Tabela 16. Análise de Variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta “atividade enzimática detectada no efluente” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2= 0,91$	87
Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para a variável “atividade enzimática detectada no efluente” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13....	88
Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta “ácidos livres” no efluente a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2= 0,73$	90
Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta de “DQO” a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2= 0,79$.	91
Tabela 20. Análise da Variância (ANOVA) para a variável “DQO” a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13.....	92
Tabela 21. Valores de DBO_5 e DQO e razão de biodegradabilidade (DBO_5/DQO) das amostras de efluente produzido pela Indústria de laticínios antes e após tratamento enzimático com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.	95
Tabela 22. Valores de sólidos suspensos totais (SST) do lodo ativado utilizado durante o teste de biodegradabilidade mostrado na Figura 21. Substratos: glucose e dietilenoglicol, efluente não tratado e tratado enzimaticamente com a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	99

LISTA DE ABREVIações

CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
[E] _{eff}	Atividade enzimática detectada no efluente
[E] _{inicial}	Atividade enzimática adicionada ao efluente
FCT	Farelo de casca de trigo
FES	Fermentação no estado sólido
FS	Fermentação submersa
FSG	Farelo de semente de girassol
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LB	Meio de cultura Luria Bertrani
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
O&G	Óleos e graxas
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila

RESUMO

Lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11, produzidas por fermentação no estado sólido (FES), foram empregadas no tratamento de efluentes de indústria de laticínio, com o objetivo de reduzir o teor de gordura contida no efluente. A enzima foi produzida em Erlenmeyers contendo 10 g de farelo de semente de girassol, incubados a 29 °C. A atividade lipolítica máxima foi de 205±5 U/gss, obtido em 72 h. O material fermentado foi liofilizado e então armazenado a 4 °C. Estudos foram realizados adicionando-se o sólido seco diretamente nas amostras de efluentes não autoclavadas com diferentes concentrações de O&G (167-690 mg/L), obtidas com adição de creme de leite comercial. A eficácia da hidrólise da gordura foi avaliada com base no teor de ácidos livres no efluente e pela remoção de óleos e graxas (O&G). Nestes experimentos iniciais (0,1 %, m/V de sólido fermentado, pH 7,0, 30 °C e 150 rpm) houve remoção de 82 % de O&G depois de 24 h, com uma grande variação nos resultados, que pode ser atribuída à presença de diferentes microrganismos nas amostras não autoclavadas e ao método de adição da gordura, que mostrou falta de reprodutibilidade. O tratamento enzimático (com amostras autoclavadas, 348 mg/L O&G) foi estudado utilizando-se delineamento fatorial incompleto, com três variáveis (temperatura, pH e atividade enzimática adicionada no efluente) e três níveis (T = 25, 30 e 35 °C; pH = 5,0, 7,0 e 9,0; e atividade enzimática = 23,6, 47,2 e 70,8 U/L). Os experimentos foram interrompidos depois de 48 h avaliando-se a remoção de O&G, a DQO e a atividade enzimática residual no efluente (U/L). Os coeficientes de correlação (R^2) para as respostas remoção de O&G e atividade enzimática residual no efluente foram 0,980 e 0,912, respectivamente, mostrando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Porém, no caso da DQO, o coeficiente de correlação foi relativamente baixo ($R^2=0,79$). A máxima remoção de O&G prevista pelo modelo foi de 60% após 48 h, nas condições de 29 a 32 °C, pH 8,0 a 9,2 e atividade enzimática adicionada no efluente de 47,2 U/L. Diferentes amostras de efluente foram tratadas dentro das condições otimizadas e mostraram 60% de remoção de O&G, mas somente depois de 72 h de incubação. Amostras de efluente tratado enzimaticamente foram submetidas a testes de biodegradabilidade aeróbia (Zahn-Wellens), cujos resultados mostraram que a remoção total da DQO para o efluente pré-tratado ocorreu 48 h antes do que no efluente não tratado. Os resultados deste trabalho, além de mostrar as dificuldades da utilização de amostras de efluentes reais, justificam a continuação de estudos de tratamento de efluentes com elevado teor lipídico com lipase de *B. cepacia* LTEB11 produzida por fermentação no estado sólido.

Palavras-Chave: tratamento de efluentes com elevado teor de lipídeos, hidrólise enzimática de efluentes, lipases, fermentação no estado sólido, *Burkholderia cepacia*

ABSTRACT

Lipases of *Burkholderia cepacia* LTEB11, produced by solid-state fermentation (SSF) were used in the treatment of dairy industry effluents, with the aim of reducing the fat content of the effluent. The enzyme was produced in Erlenmeyer flasks containing 10 g of sunflower meal, incubated at 29 °C. The maximum lipolytic activity was 205±5 U per gram of dry solids, obtained at 72 h. The fermented solid was lyophilized and then stored at 4 °C. Studies were undertaken in which dried solid was added directly to non-autoclaved samples with different oil and grease (O&G) contents (167 to 690 mg/L), obtained by adding a commercial milk cream to the effluent. The effectiveness of fat hydrolysis was evaluated on the basis of, firstly, the level of free acids in the effluent and, secondly, the reduction in the overall level of O&G. In these initial experiments (done with 0.1%, m/V of fermented solid, pH 7.0, 30 °C and 150 rpm) there was up to 82% removal of O&G after 24 h, but there was a large variation in the results, which is probably attributable to the presence of microorganisms in the effluent samples and to the method of grease addition, which proved to be non-reproducible. The enzymatic treatment process was further studied using autoclaved effluent samples with 348 mg/L O&G. An incomplete factorially-designed experiment was undertaken, with three variables, each at three levels (temperature = 25, 30 and 35 °C; pH = 5.0, 7.0 and 9.0; and enzymatic activity added to the effluent = 23.6, 47.2 and 70.8 U/L). The experiments were interrupted after 48 h and evaluated on the basis of the removal of O&G, the COD and the residual enzymatic activity in the effluent (U/L). The correlation coefficients (R^2) for the removal of O&G and for the residual enzymatic activity were 0.98 and 0.91, respectively, showing that the model adjusted well to the experimental data. However, in the case of COD, the correlation coefficient was relatively poor ($R^2 = 0.79$). The maximum removal of O&G predicted by the model was only 60% after 48 h, obtained for the temperature range of 29 to 32 °C and the pH range of 8.0 to 9.2, with enzyme added to the effluent at a level of 47.2 U/L. Effluent samples that were treated under these conditions showed 60 % removal of O&G, but only after 72 h. An aerobic biodegradability test (Zahn-Wellers) showed that COD was totally removed in this enzymatically-pretreated effluent 48 h earlier than it was in a non-treated effluent. The results presented here, besides showing the difficulties of using real effluent samples, justify the continuation of studies into the treatment of effluents with high fat contents using lipases of *B. cepacia* LTEB11 produced by solid-state fermentation.

Key-words: treatment of effluents with high lipid contents, enzymatic hydrolysis of effluents, lipases, solid state fermentation, *Burkholderia cepacia*.

1. INTRODUÇÃO

Os efluentes das indústrias de alimentos são caracterizados por altas concentrações de óleos e graxas, sulfatos, nitratos e fosfatos e conseqüentemente, apresentam elevada demanda química de oxigênio (DQO), apresentando baixa biodegradabilidade. No Brasil, onde são gerados 84×10^9 L de efluentes de laticínios (CAMMAROTA & FREIRE, 2006), a maioria das indústrias trata os efluentes antes do tratamento biológico por métodos físico-químicos convencionais. Esses tratamentos podem elevar os custos do processo devido aos reagentes químicos utilizados e devido à redução eficiência da remoção de sólidos dissolvidos pelos processos biológicos subseqüentes, pois a presença de sais inorgânicos pode inibir a atividade microbiana (VIDAL *et al.*, 2000).

Elevadas concentrações de lipídios resultam na formação de uma camada de gordura nas lagoas de tratamento, que impede as transferências de oxigênio, dos substratos e dos produtos, prejudicando assim o tratamento biológico aeróbio de degradação da matéria orgânica, podendo levar à morte dos microrganismos. Além disso, altas concentrações de lipídeos podem levar a um aumento da quantidade de microrganismos filamentosos, resultando na formação de lodos com diferentes características físicas (diminuição da densidade) e reduzidas atividades hidrolíticas. Este fenômeno pode interferir negativamente nos sistemas de tratamento de efluentes devido à flotação da biomassa, ao aumento do tempo de retenção hidráulica dos efluentes nas lagoas de estabilização, à redução da capacidade de aeradores e à alta demanda de produtos flocculantes (CAMMAROTA & FREIRE, 2006, MENDES *et al.*, 2005).

No tratamento biológico anaeróbio de efluentes com excesso de óleos e graxas, a degradação de lipídeos é uma etapa limitante, pois os lipídeos possuem pouca biodegradabilidade, devido à sua baixa disponibilidade. A hidrólise de triacilgliceróis libera ácidos graxos de cadeia longa e glicerol; quando esses ácidos graxos estão em excesso, ocorre a adsorção deles na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para os microrganismos (OMIL *et al.*, 2003; MASSE *et al.*, 2001, 2002).

Para tentar solucionar esses problemas, processos alternativos vêm sendo utilizados visando à redução da concentração de lipídeos contidos nos efluentes com elevada carga orgânica. Dentre eles, encontram-se os tratamentos enzimáticos, especialmente os que usam lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3). Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras. A utilização de lipases possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e a desobstrução de filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos. Além disso, a redução do custo em termos de energia e de equipamentos, leva a um aumento da eficiência do processo, tornando-o atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE *et al.*, 2001). Entretanto, um fator limitante da aplicação industrial de lipases no tratamento de efluentes é o elevado custo destas enzimas.

Pelo exposto aqui, verifica-se a necessidade de redução da carga orgânica do efluente gerado nas indústrias alimentícias para não sobrecarregar a ETE, de diminuir as dimensões e o custo do tratamento, e de reduzir também o problema ambiental, visto que as águas residuais podem eventualmente

apresentar elevado teor de óleos e gorduras, podendo prejudicar o desempenho do processo biológico subsequente, como a inibição do metabolismo microbiano.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa estudar a aplicação de lipases produzidas por fermentação no estado sólido, um processo relativamente barato de produção de enzimas, no tratamento de efluentes com elevado teor lipídico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão abordados conceitos básicos sobre lipases e métodos de produção destas enzimas, com enfoque na fermentação no estado sólido, os efluentes provenientes de indústrias de alimentos e refinarias de óleo vegetal, os tratamentos convencionais aplicados na indústria e o tratamento enzimático como um método alternativo no tratamento de efluentes com elevada carga lipídica.

2.1. LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis produzindo diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (Figura 1). No entanto, em ambientes aquo-restritos essas enzimas catalisam diversas outras reações, como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico (SALUM *et al.*, 2007; JEGANATHAN *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2004; 1999).

As lipases estão comumente presentes em vegetais, como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), em animais (pâncreas de porco) e em microrganismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (JAEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999). Os

microrganismos são excelentes produtores de lipases extracelulares e são as fontes preferidas para a produção industrial da enzima, pois possuem menor tempo de geração, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação de cultivo (ILLANES, 1994).

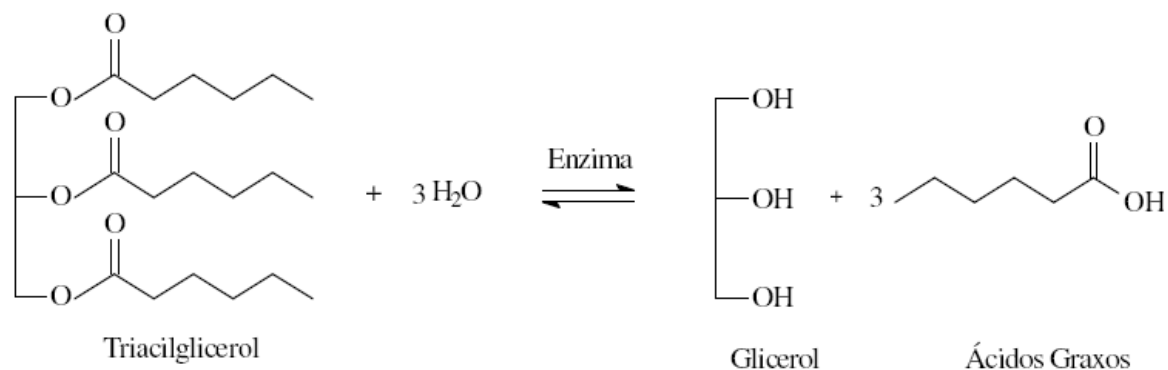


Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases

Apesar dos avanços da biologia molecular e da genética, que facilitaram a obtenção de enzimas com características especiais desejáveis em processos industriais, a seleção de cepas selvagens hiper-produtoras ainda é importante, principalmente no caso de efluentes, onde a utilização de microrganismos geneticamente modificados não é recomendada por questões de biossegurança. Além disso, a grande biodiversidade de países como o Brasil representa uma fonte praticamente inesgotável na busca por espécies selvagem produtoras de lipases (ROSA, 2004).

Lipases apresentam uma massa molar variando entre 19 a 60 kDa e possuem uma estrutura de dobramento α/β hidrolase, sendo que muitas estruturas destas enzimas já foram definidas (Figura 2). As lipases possuem um núcleo

central composto por uma folha β pregueada formada por 8 segmentos β ($\beta 1 - \beta 8$), conectadas, interligadas e envolvidas por α -hélices. O centro ativo é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato). O resíduo serina é responsável pela catálise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio ao resíduo histinina, que por sua vez encontra-se ligado a um resíduo carboxilado (aspartato ou glutamato) (CASTRO *et al.*, 2004; JAEGER & REETZ, 1998).

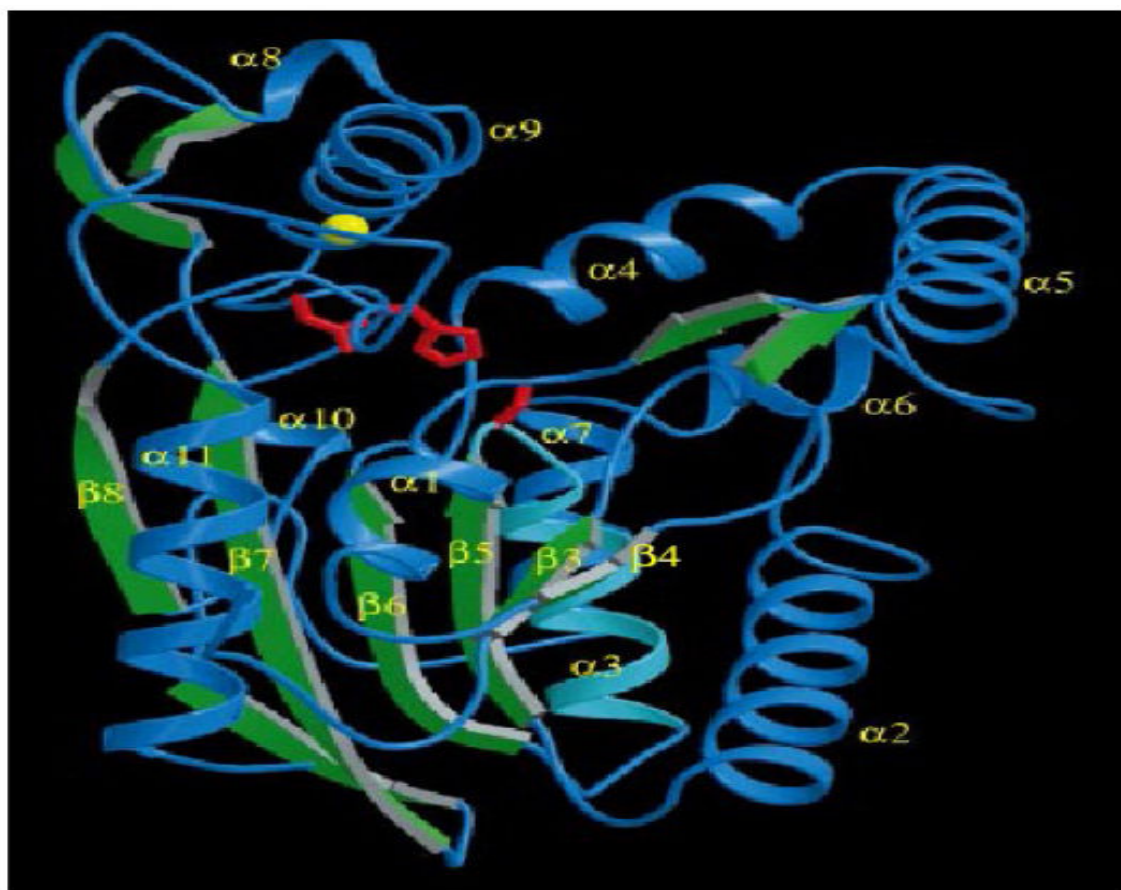


Figura 2. Modelo tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia* (SCHRAG *et al.*, 1997).

Em grande parte das lipases, o sítio ativo é coberto por uma “tampa” com características hidrofóbicas, uma estrutura helicoidal, que, em ausência de

interface óleo/água, deixa o sítio ativo inacessível ao substrato. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (CASTRO *et al.*, 2004; JAEGER *et al.*, 1999). Este fenômeno é chamado de ativação interfacial.

As lipases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, para conferir ou modificar propriedades organolépticas dos alimentos, tais como aroma, textura e digestibilidade. Além disso, são usadas no processamento de óleos e graxas, detergentes, na síntese química e farmacêutica, na indústria de papel, e na produção de cosméticos e farmacêuticos (HASAN *et al.*, 2006). Algumas aplicações industriais de lipases estão mostradas na Tabela 1.

A maior importância comercial atualmente reside na aplicação de lipases em detergentes industriais ou domésticos (HASAN *et al.*, 2006). As lipases para detergentes devem possuir características de baixa especificidade ao substrato, hidrolisando gorduras de várias composições, e serem ativas e estáveis em condições normalmente consideradas agressivas para uma enzima, como temperaturas de 40 a 60 °C, presença de detergentes e meios muito básicos (SHARMA *et al.*, 2001).

Tabela 1. Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada

Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos	Referências
<i>Hidrólise</i>				
	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Sharma <i>et al.</i> , 2001.
	Química (Processamento do Óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)	Hasan <i>et al.</i> , 2006.
	Química (Detergente)	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Sharma <i>et al.</i> , 2001.
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits diagnósticos	Hasan <i>et al.</i> , 2006.
	Tratamento de efluentes	Hidrólise	Ácidos graxos	Valladão <i>et al.</i> , 2007; Jeganathan <i>et al.</i> , 2006; Leal <i>et al.</i> , 2006, 2002; Cammarota & Freire, 2006; Lanciotti <i>et al.</i> , 2005; Rosa, 2004.
<i>Esterificação</i>				
	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais Ésteres, emulsificantes	Salum <i>et al.</i> , 2007; Fernandes <i>et al.</i> , 2007; Hasan <i>et al.</i> , 2006.
	Química Alimentos	Esterificação ou Transesterificação	Óleos ou gorduras, Flavorizantes e aromatizantes.	Hasan <i>et al.</i> , 2006.
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos- preparação de intermediários homóqu岸ais	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.	Jaeger & Eggert, 2002.
<i>Transesterificação</i>				
	Química Fina	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Fernandes <i>et al.</i> , 2007; Hasan <i>et al.</i> , 2006.

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 carne podem ser tratados através do uso de lipases de diferentes origens. O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais. Além disso, as enzimas atuam em poluentes específicos e, com os avanços da biotecnologia, algumas enzimas podem ser produzidas de forma econômica. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam a utilização de preparados enzimáticos obtidos por fermentação em estado sólido como uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura gerados na indústria de alimentos (VALLADÃO *et al.*, 2007; LEAL *et al.*, 2006, 2002; ROSA, 2004; JUNG *et al.*, 2002; CAMMAROTA *et al.*, 2001).

2.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de enzimas e outros metabólitos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Na FES, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre nos espaços entre as partículas do sólido. Na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da

matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos (MITCHELL *et al.*, 2006).

Na fermentação em estado sólido (FES), o ambiente fornecido ao microrganismo é bem diferente daquele fornecido pela fermentação submersa. A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos, que não seriam produzidos na fermentação submersa, além de possibilitar uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento. Outras vantagens associadas à FES são as possibilidades de obtenção de extratos mais concentrados, e de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, diminuindo os custos do processo (MITCHELL *et al.*, 2006, 2003; SATO & SHIGETOSHI, 1999).

Os substratos tipicamente utilizados na FES são de origem agroindustrial, subprodutos, produtos processados ou produtos agrícolas propriamente ditos. Grãos de arroz, raízes de mandioca, soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca de arroz, casca de trigo, torta de babaçu, torta de coco, torta de milho, farelo de semente de girassol, entre outros, podem ser utilizados como substratos (FERNANDES, 2006; CAMMAROTA & FREIRE, 2006; MITCHELL *et al.*, 2002).

O Brasil é um país fundamentalmente de base agrícola e florestal, que apresenta uma vasta dimensão territorial e características climáticas que lhe conferem uma posição privilegiada em termos de biodiversidade e em termos de capacidade de produzir recursos renováveis em grande escala. A estimativa do IBGE para a produção nacional em 2007 de cereais, leguminosas e oleaginosas (caroço de algodão, amendoim, arroz, feijão, mamona, milho, soja, aveia, centeio,

cevada, girassol, sorgo e trigo) é de aproximadamente 122 milhões de toneladas (MEIRA, 2007). As atividades agroindustriais e florestais no Brasil geram uma grande variedade e quantidade de resíduos sólidos que podem, potencialmente, ser aproveitados em processos de FES.

Muitos estudos estão sendo realizados para utilização de enzimas produzidas por FES no tratamento de efluentes, pois as enzimas para esta finalidade podem ser obtidas com o menor custo possível. Os trabalhos citados na literatura utilizam torta de babaçu como substrato para a produção de lipases com *Penicillium restrictum*. O material fermentado é utilizado diretamente para a hidrólise de efluentes com elevado teores de O&G (VALLADÃO *et al.*, 2007; LEAL *et al.*, 2006; ROSA, 2004; JUNG *et al.*, 2002; CAMMAROTA *et al.*, 2001).

2.3. EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS

Dentre as atividades industriais desenvolvidas no Paraná, a fabricação de produtos alimentícios e de bebidas destaca-se pelo número de empresas existentes (do total das empresas presentes no estado, 16,54 % são indústrias de alimentos e bebidas), e também pelo volume de resíduos gerados. Esta atividade, conforme dados do último boletim do Instituto Ambiental do Paraná, emite em média aproximadamente 6 milhões de toneladas de resíduos por ano (36,24% das 15.570.936,14 toneladas de resíduos totais gerados no Paraná), além de efluentes com elevada carga orgânica (IAP, 2003).

No Brasil, os setores de indústrias de carne e laticínios são responsáveis por uma boa parte da economia do país. Em 2005, 21×10^9 L de leite

foram produzidos no Brasil (IBGE, 2005), gerando aproximadamente 84×10^9 L de efluentes. Um levantamento feito com pequenos e médios laticínios no estado de Minas Gerais revelou que 90% dos efluentes gerados nesses estabelecimentos não recebem tratamento adequado (CAMMAROTA & FREIRE, 2006).

Com o aumento da atividade industrial no Brasil, também ocorreu um aumento na quantidade de efluentes gerados, os quais, na sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o impacto ambiental, tornando-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), pelo 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 5,0 a 9,0; 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 (CONAMA, 2005).

Com essas condições da resolução CONAMA, os efluentes das indústrias com elevados teores de lipídios enfrentam um desafio. Os teores de O&G dos efluentes variam de acordo com o tipo de atividade da indústria: 200 a 2000 mg/L para as indústrias de laticínios; 500 mg/L a 16000 mg/L para as indústrias de extração de óleos vegetais, (MENDES, *et al.*, 2005). Comparando-se esses valores com os valores estabelecidos percebe-se a necessidade de tratamentos para esses efluentes.

2.4. TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDIOS

Os efluentes das indústrias de refino de óleos vegetais, que apresentam além de altos teores de lipídios e uma elevada DQO, resíduos de pesticida, de insumos agrícolas e de substâncias resultantes do processo de refino, geralmente são submetidos a processos físico-químicos, seguidos de tratamento biológico para remoção de poluentes coloidais. A etapa físico-química consiste na separação do óleo por flotação, na floculação de sólidos totais e na coagulação da matéria orgânica; a etapa biológica que se segue pode ser feita em lagoas, lodo ativado ou filtros biológicos, onde a matéria orgânica é degradada pelos microrganismos que existem naturalmente nestes efluentes. Os efluentes assim tratados seguem para corpos receptores (AZBAR & YONAR, 2004). Nas Figuras 3 a 8 são mostradas fotos da estação de tratamento de efluentes da indústria de laticínios que doou as amostras de efluente para este trabalho. Os diferentes processos clássicos de tratamento de efluentes serão descritos a seguir.



Figura 3. Primeiro tanque de recebimento do efluente da unidade de lácteos.



Figura 4. Caixa de gordura da unidade de produtos cárneos.



Figura 5. Lagoa anaeróbia do efluente da unidade de produtos cárneos.



Figura 6. Lagoa anaeróbia do efluente da unidade de produtos cárneos.



Figura 7. Aproximação da cobertura da lagoa da unidade de produtos cárneos.



Figura 8. Detalhe do ponto de saída do efluente de uma das lagoas anaeróbias.

2.4.1. Processos Físico-Químicos

Um grande número de tratamentos é empregado para retenção das gorduras, e, dentre eles, os mais empregados são os tratamentos físico-químicos. Os processos físico-químicos que empregam compostos inorgânicos como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 e FeSO_4 permitem apenas uma remoção parcial de sólidos totais (MENDES *et al.*, 2005). Além disso, os reagentes químicos empregados são de custo elevado e causam uma redução na remoção dos sólidos dissolvidos e de óleos e graxas (O&G) nos processos biológicos, pois a presença destes sais pode inibir a atividade microbiana (CAMMAROTA & FREIRE, 2006; VIDAL *et al.*, 2000).

Na etapa de floculação, há a separação dos sólidos em suspensão e a flotação dos óleos e gorduras presentes no efluente. Esta etapa do processo de tratamento requer operação cuidadosa e um controle rigoroso das condições operacionais, para garantir um bom nível de remoção de gordura. No entanto, a grande variação das características físico-químicas e da carga orgânica do efluente muitas vezes leva a problemas operacionais e perda de eficiência. Além disso, altos níveis de gordura (acima de 150 mg/L) podem prejudicar o desempenho do processo biológico subsequente, levando a colmatação de filtros em reatores anaeróbio e aeróbio, além da inibição do metabolismo microbiano (PEREIRA *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2000).

Ao final do processo, caixas de gordura são utilizadas para separar o restante dos sólidos que o flotor não conseguiu retirar, formando uma massa branca, que é misturada à borra oleosa proveniente do refino e à gordura do flotor. Muitas vezes, o resíduo lipídico flotado é descartado em aterros sanitários, o que polui o ambiente (MONGKOLTHANARUK & DHARMSTHITI,

2002). As caixas de gordura comuns permitem a separação da massa de gordura por retirada manual ou por meio de raspadores. Para melhor desempenho dessas caixas, devem ser evitadas temperaturas superiores a 35°C e valores de pH acima de 8,5 na alimentação da caixa, pois nessas condições ocorre a saponificação ou emulsificação das gorduras (MENDES *et al.*, 2005). Além disso, os óleos e graxas podem solidificar em temperaturas baixas ocasionando problemas operacionais, e ainda um acúmulo de efluentes com odores desagradáveis (VALLADÃO, *et al.*, 2007).

2.4.2. Processos Biológicos

Alguns métodos convencionais para tratamento de efluentes incluem a reutilização de certas frações de soro de queijo em indústrias de laticínios e de sangue em matadouros. Quando isso não é possível, vários processos são usados, dentre eles principalmente os processos aeróbios, mas nas duas últimas décadas o uso de processos anaeróbios vem aumentando (CAMMAROTA & FREIRE, 2006). Esse tipo de processo apresenta várias vantagens como, por exemplo, dispensa a aeração, baixo consumo de energia, baixos custos de implantação, baixa produção de sólidos, produção de CH₄, aplicabilidade em pequena e grande escala, tolerância a elevadas cargas orgânicas e baixo consumo de nutrientes (MENDES *et al.*, 2006; ROSA, 2004). Processos biológicos convencionais, aeróbios ou anaeróbios, requerem uma relação DBO/DQO (razão de biodegradabilidade) de no mínimo 0,4 (MORAIS, 2005), sendo a esta razão necessária para que o consórcio de microrganismo possa consumir a matéria orgânica sem prejudicar o desempenho do tratamento

biológico. No entanto, efluentes gerados nas indústrias de refino de óleo e os produzidos pelas indústrias de laticínios geralmente apresentam DBO/DQO de 0,2, indicando a necessidade de um pré-tratamento antes da etapa biológica (AZBAR & YONAR, 2004).

2.4.2.1. Processos Biológicos Aeróbios

Dentre os principais tratamentos de natureza aeróbia destaca-se o processo de lodo ativado (JUNG *et al.*, 2002). Este é um processo fundamentado no fornecimento de oxigênio para que os microrganismos biodegradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, transformando-a em gás carbônico, água e flocos biológicos (GIORDANO, 2004). Os flocos biológicos são formados por consórcios de microrganismos que constituem comunidades dinâmicas, cada uma das quais possuindo uma determinada finalidade no processo de lodos ativados. O processo de sedimentação da biomassa, necessário para separação do efluente tratado, só é possível graças à floculação (MORAIS, 2005). Os sistemas de lodos ativados são em geral compostos por tanque (reator biológico), sistema de aeração, decantador secundário e sistema de recirculação e descarte do lodo. No reator biológico ocorre a exposição da matéria orgânica à massa biológica, a qual em presença de oxigênio cresce e flocula (VON SPERLING, 1997).

No tratamento de efluentes industriais de laticínios processos aeróbios são comumente empregados devido ao grande conteúdo de matéria orgânica biodegradável presente. Estes sistemas apresentam boa redução de matéria orgânica, boa resistência a choques de carga e boa flexibilidade operacional. Por

outro lado, os custos, tanto os de implantação quanto os operacionais, são elevados, a supervisão do processo deve ser contínua e a disposição do lodo excedente pode apresentar problemas (ROSA, 2004).

Nos sistemas de lodos ativados, o alto teor de O&G forma uma camada na superfície do tanque de aeração, que afeta principalmente a eficiência de transferência de oxigênio. Isto dificulta as trocas gasosas no tanque de geração que são necessárias para a degradação biológica, ocasionando o desenvolvimento de bactérias filamentosas que, por sua vez, dificultam a sedimentação do lodo e prejudicam o desempenho dos sistemas em termos de remoção de matéria orgânica. (CAMMAROTA & FREIRE, 2006, JUNG *et al.*, 2002).

As lagoas aeradas são normalmente construídas com taludes de terra e funcionam como reatores biológicos de crescimento suspenso, com recirculação do lodo, tendo profundidade de 2,5 a 5,0 m. São normalmente usados aeradores mecânicos para a mistura e aeração da massa líquida (D'ALMEIDA & VILHENA, 2000).

DURÁN & ESPOSITO (1997) citam as variações na composição do efluente e na temperatura ambiente às quais está exposta a lagoa como sendo os principais fatores que afetam a eficiência das lagoas aeradas na redução dos níveis de sólidos suspensos e da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em efluentes. Os autores advertem também para o problema da geração de grande quantidade de sólidos resultante do tratamento aeróbio por lodos ativados.

Nas lagoas aeradas os efluentes são submetidos à ação de consórcio de organismos, muitas vezes de composição desconhecida, durante vários dias.

Neste tipo de tratamento, a variação de carga e algum grau de toxicidade efluente podem ser atenuados graças ao grande volume da lagoa (MORAIS, 2005). No entanto, os parâmetros de descarga (DQO, DBO, por exemplo) nem sempre são atendidos e também existem os problemas associados com perdas de substratos tóxicos por volatilização e contaminação de lençóis freáticos por percolação (infiltração). Outra dificuldade desse processo é a necessidade da retirada periódica do lodo do fundo da lagoa ou ainda a instalação de um decantador secundário para melhorar a clarificação do efluente final (MORAIS, 2005).

2.4.2.2. Processos Biológicos Anaeróbios

O processo anaeróbio é efetuado por bactérias que não necessitam de oxigênio para a sua respiração. Na lagoa anaeróbia, a matéria orgânica é decomposta gradativamente em estruturas moleculares menores, em que os produtos finais da degradação fermentativa são o metano e o gás carbônico. Lagoas anaeróbias são tanques com profundidade de 4,0 a 5,0 m, de maneira a reduzir a possibilidade de penetração, nas camadas mais profundas, do oxigênio produzido na superfície. A carga orgânica aplicada nestas lagoas deve ser alta, principalmente para que a taxa de consumo de oxigênio seja várias vezes superior à taxa de produção de biomassa, criando condições estritamente anaeróbias (MORAIS, 2005).

Óleos e graxas, em elevadas quantidades podem ficar adsorvidas na superfície das lagoas anaeróbias podendo dificultar o transporte de substratos solúveis para a biomassa e, conseqüentemente, podem reduzir a taxa de conversão do substrato (VALLADÃO *et al.*, 2007). A hidrólise de triacilgliceróis

libera ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. Quando esses ácidos graxos de cadeia longa estão em excesso, ocorre a adsorção deles na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para os microrganismos, bem como a formação de grânulos de lodo nos reatores (OMIL *et al.*, 2003; MASSE *et al.*, 2002, 2001).

O tratamento anaeróbio vem sendo muito utilizado por agroindústrias e indústrias de alimentos, porque traz algumas vantagens: não precisa de equipamento para aeração, e apresenta um baixo excesso de lodo, em relação ao processo aeróbio (VIDAL *et al.*, 2000). Porém, existem algumas preocupações sobre a capacidade de degradação de O&G (LEAL *et al.*, 2006). Em alguns efluentes com grande quantidade de gorduras, como efluentes de laticínios por exemplo, a digestão anaeróbia pode ser problemática, pois pode causar um flotação do lodo, formação de espuma na superfície do reator e acúmulo de compostos intermediários (MENDES *et al.*, 2006). Além disso, a baixas temperaturas as gorduras podem se solidificar, causando problemas operacionais como a colmatação e desenvolvimento de odores desagradáveis (CAMMAROTA *et al.*, 2001).

2.5. TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS EM EFLUENTES COM ELEVADOS TEORES DE ÓLEOS E GRAXAS

2.5.1. Introdução

Como existem vários problemas de tratamento em efluentes com elevados teores de óleos e graxas, pesquisas em pré-tratamentos para remoção das gorduras estão sendo realizadas. Uma das propostas é a utilização de hidrólise enzimática por lipases para remoção de óleos e graxas dos efluentes, seja pela utilização de microrganismos produtores de lipases ou pela utilização de enzimas (isoladas ou não). A grande diferença entre os dois tipos de processo é que, no primeiro, células dos microrganismos são inoculadas diretamente no efluente, ou no sítio em que este se encontra (lagoas de tratamento, por exemplo), sem haver necessidade prévia da produção da enzima. No segundo caso, as lipases são produzidas, e em alguns casos, purificadas e imobilizadas, e então adicionadas ao efluente que se quer tratar. O caso de utilização de sólidos fermentados contendo lipases, por sua vez, poderia ser enquadrado nos dois tipos, uma vez que o sólido fermentado contém necessariamente a enzima e também o microrganismo que produziu esta enzima, que dependendo do tipo de secagem, pode estar ativo. Abaixo serão relatados os casos reportados na literatura para os processos que geralmente, por simplificação, foram chamados de “enzimáticos”.

2.5.2. O Estado-da-Arte

Enzimas são catalisadores biológicos e seu uso no tratamento de efluentes apresenta varias vantagens, tais como simplicidade e facilidade no

controle do processo e a ausência de necessidade de aclimação de biomassa. Além disso, as enzimas podem resistir a altas cargas de poluentes, podem ser aplicadas em processos com concentrações-limite de poluentes (muito altas ou muito baixas) e operam em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade (MENDES *et al.*, 2005). A principal desvantagem é o custo de produção da enzima, que pode ser minimizado, por exemplo, utilizando-se resíduos agroindustriais como substrato para cultivo de microrganismos e produção de enzimas (FERNANDES *et al.*, 2007).

A remoção aeróbia de gorduras de origem animal ou vegetal em efluentes industriais por processos biotecnológicos, utilizando microrganismos ou enzimas, tem sido relatada por vários autores como um processo que pode ser associado aos tratamentos usuais nas estações de tratamento de efluentes. O ataque inicial aos triglicerídeos por microrganismos envolve a hidrólise das ligações éster por lipases, que removem os ácidos graxos do glicerol (SHARMA *et al.*, 2001). Dentre os fatores que afetam o processo enzimático de remoção de gorduras dos efluentes, têm sido citados a especificidade da enzima em relação ao substrato, as características físico-químicas do efluente, o pH do meio de reação, a concentração e a composição de óleo (PEREIRA *et al.*, 2003).

O tratamento enzimático consiste em tratar previamente o efluente com uma preparação enzimática. O efluente pré-hidrolisado segue então para a ETE com uma carga orgânica com menor teor de óleos e gorduras, diminuindo assim o tempo de retenção hidráulica, o volume dos reatores e conseqüentemente os custos do processo (LEAL *et al.*, 2002).

Preparações comerciais nacionais e importadas têm sido empregadas na pré-hidrólise de efluentes das indústrias de carnes (PEREIRA *et al.*, 2003) e laticínios (MENDES & CASTRO, 2003). O processo consiste em adicionar a preparação lipolítica ao efluente previamente caracterizado e incubar em condições ótimas para a atividade enzimática. Acompanha-se a cinética da hidrólise através da percentagem de ácidos graxos liberados ao longo de 24 h (RIGONI *et al.*, 2003). Uma lipase nacional (pancreatina Kin Master-LKM), apesar da menor atividade da enzima em relação à comercial (pancreática Sigma, tipo II-LPP), apresentou, em um trabalho comparativo realizado por MENDES & CASTRO (2003), um desempenho semelhante ao da lipase importada e melhor relação custo-benefício na pré-hidrólise de efluente de laticínios. A avaliação do desempenho destes processos é geralmente monitorada pela percentagem de ácidos graxos liberados na reação e pela redução na DQO do efluente, já que alguns autores relataram correlação positiva entre DQO e percentagem de óleos e gorduras (AZBAR & YONAR, 2004). Após otimização do processo de pré-hidrólise enzimática do efluente, faz-se a avaliação do impacto deste tratamento por meio de testes de biodegradabilidade.

As condições reacionais variam conforme o tipo de preparação enzimática a ser utilizada, ou seja, com o grau de pureza da enzima, da sua especificidade ao substrato, estabilidade e atividade frente aos poluentes e de prováveis fatores inibitórios presentes no meio reacional (MENDES & CASTRO, 2003). Extratos brutos ou enzimas não-purificadas são utilizados em concentrações maiores, e geralmente apresentam menor eficiência enzimática, porque sua atividade específica (U/mg de proteína da preparação) pode ser relativamente mais

baixa do que em preparações impuras (RIGONI *et al.*, 2003). Por outro lado, enzimas purificadas, que apresentam maior atividade específica, são caras e podem tornar a aplicação industrial do processo inviável. Devido ao grande número de variáveis do processo - pH, temperatura, presença de íons cálcio, concentração de agente emulsificante, agitação e concentração de enzima - alguns autores sugerem um planejamento fatorial como forma de otimizar as variáveis reacionais (PEREIRA *et al.*, 2003; RIGONI *et al.*, 2003).

Testes de biodegradabilidade do efluente pré-hidrolisado com extrato enzimático foram realizados por LEAL *et al.* (2002). Efluentes sem tratamento e enzimaticamente hidrolisados foram submetidos a um tratamento biológico anaeróbio. Observou-se que, para o efluente pré-hidrolisado, houve um aumento significativo na eficiência do tratamento anaeróbio. A pré-hidrólise enzimática de efluentes com até 1200 mg/L de gordura, reduziu problemas operacionais durante o tratamento anaeróbio e promoveu elevada redução da DQO (de 19 % para o efluente bruto para 80 % hidrolisado) com menor tempo de tratamento (48 h).

JUNG *et al.* (2002) estudaram efluentes de indústria de laticínios brutos e pré-hidrolisados enzimaticamente, os quais foram submetidos a um tratamento aeróbio em batelada, utilizando dois biorreatores com volume de 1,5 L (1 L com efluente e 0,5 L com lodo ativado) e agitação de 200 rpm. Os biorreatores foram simultaneamente operados com efluente bruto (biorreator controle) e com efluente pré-hidrolisado (biorreator hidrolisado). O pré-tratamento consistiu na adição da torta de babaçu (0,2% m/v), microrganismo produtor de lipase *P. restrictum* com atividade lipolítica de 11 U/g) ao efluente e incubação por 8 h, 30 °C e 120 rpm.

Ambos os biorreatores foram operados por três meses com efluente contendo 38 mg/L de concentração de O&G para adaptação do lodo ao efluente. No fim deste estágio, os biorreatores foram operados com efluentes com concentração de 400 (53 dias), 600 (30 dias) e 800 mg/L de O&G (113 dias) com e sem a etapa de pré-hidrólise enzimática. Observou-se que, quando o biorreator aeróbio foi alimentado com efluentes não tratados com as concentrações de 400 e 600 mg/L, houve assimilação da matéria orgânica pelo consórcio de microrganismo que foi introduzido no biorreator; a eficiência de remoção de DQO foi de 86 % e 75 %, respectivamente. Porém, quando o biorreator foi alimentado com efluente não tratado com a concentração de óleos e graxas de 800 mg/L, praticamente foi nula a eficiência de remoção de DQO. No biorreator alimentado com efluentes pré-hidrolisados enzimaticamente, a eficiência na remoção de DQO foi de 93%, 92% e 82% para 400, 600 e 800 mg/L de concentração de óleos e graxas, respectivamente. Por outro lado, ROSA (2004) observou que, quando os biorreatores foram operados em regime contínuo com a concentração de O&G de 800 mg/L, houve uma pequena diferença na eficiência da remoção de DQO entre os dois biorreatores, sendo a remoção da DQO no biorreator controle de 80% e o hidrolisado 90 %.

LEAL *et al.* (2006), trabalharam com efluentes semi-sintéticos, contendo 2 g/L de leite em pó e gorduras adicionadas para obter as concentrações de 200, 600 e 1000 mg/L de O&G. Esses efluentes foram hidrolisados com 0,1 % do material fermentado de torta de babaçu com atividade lipolítica de 21,8 U/gss, com três diferentes temperaturas (25, 35 e 45 °C). A maior quantidade de ácidos livres

liberados foi em 45 °C, após 24 h de incubação; porém, à temperatura de 35 °C obteve-se a maior quantidade de ácidos livres após 12 h. Com base nesses resultados e no custo do processo, a temperatura 35 °C foi selecionada para a etapa de hidrólise antes do tratamento biológico anaeróbio em reator UASB (upflow anaerobic sludge blanket reator). O tratamento foi realizado com dois reatores, um utilizado como controle (com efluente bruto) e outro com efluente hidrolisado. Em termos de remoção de DQO o reator controle obteve 91, 88, 82 % nas concentrações iniciais de 200, 600 e 1000 mg/L de O&G, respectivamente. Para o reator com efluente hidrolisado a remoção de DQO foi de 90, 91 e 90 % nas concentrações iniciais de 200, 600 e 1000 mg/L de O&G respectivamente, mostrando que houve uma pequena diferença entre os reatores controle e hidrolisado na remoção de DQO.

VALLADÃO *et al.* (2007) também trabalharam com lipases produzidas por *P. restrictum* por FES, utilizando como substrato torta de babaçu, para tratamento de efluentes de matadouro aviário. O teor de O&G, obtido por adição de gordura (coletada no matadouro aviário após a separação por flotação) ao efluente, variou de 150 a 1200 mg/L. As amostras foram pré-tratadas com 0,1, 0,5 ou 1 % (m/V) do material fermentado, sendo incubadas por 22 h, a 35 °C e 120 rpm. O teste de biodegradabilidade foi anaeróbio, conduzido em frascos de 100 mL, com 90 mL de efluente bruto ou pré-hidrolisado, misturado com o lodo anaeróbio. Na etapa de hidrólise observou-se a diminuição na quantidade de ácidos liberados com o aumento na concentração de O&G para as três concentrações mais baixas (150-750 mg/L de O&G). Entretanto, observaram-se

aumentos de ácidos livres com o aumento da concentração do material fermentado em todas as concentrações de O&G. Nos testes de biodegradabilidade anaeróbio, efluentes com concentração de O&G 1200 mg/L, pré-tratados com 0,1 % (m/V) de material fermentado apresentaram grande eficiência na remoção de DQO (85 %), contra 53 % para o efluente bruto. Já os efluentes pré-tratados com a concentração de material fermentado de 0,5 e 1 % (m/V) não resultaram em uma grande remoção de DQO.

JEGANATHAN *et al.* (2006) estudaram a hidrólise de efluentes com elevado teor de óleos e graxas com a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em alginato de sódio, com atividade lipolítica de 760 U/mg do sólido. Os efluentes (autoclavados e não autoclavados) foram pré-hidrolisados com concentrações de lipase imobilizada (0,6 e 1,2 g/L). Houve uma eficiência da remoção de O&G entre 40 a 60%, sendo que as amostras autoclavadas mostraram maior eficiência na remoção; as diferentes concentrações de enzimas imobilizadas não levaram a uma grande diferença na remoção de O&G.

Alguns autores também reportaram a utilização de microrganismos, produtores de lipases, para o tratamento de efluentes com elevado teor lipídico.

LANCIOTTI *et al.* (2005) trabalharam com 62 cepas de *Yarrowia lipolytica* de diferentes origens para o tratamento de efluentes de fábricas de azeite de oliva. Todas as 62 cepas estudadas demonstraram bom crescimento nos efluentes. Vinte dessas cepas foram selecionadas pelo maior potencial de crescimento, e foram incubadas no efluente por 72 h. Em seguida, foi analisada a eficiência da remoção de matéria orgânica nas amostras pela redução de DQO,

obtendo-se valores entre 1,47 e 41,22 % de remoção. Nove das cepas selecionadas proporcionaram uma remoção maior que 20 %.

EL-BESTAWY *et al.* (2004) utilizaram bactérias produtoras de lipases isoladas de efluentes de indústria de óleo vegetal, dentre elas várias espécies do gênero *Pseudomonas*. As bactérias (isoladas ou em consórcio) foram testadas em um efluente sintético (suplementado com 1 % de óleo de palma) e a remoção da matéria orgânica do efluente foi acompanhada por DQO e DBO₅. Os autores reportaram uma remoção de DQO de 93% quando *P. diminuta* foi utilizada isoladamente, após 72 h; para um consórcio com diferentes cepas, a remoção foi de 89 %, com o mesmo tempo de incubação.

MATSUMIYA *et al.* (2007) isolaram a bactéria *Burkholderia sp* (DW2-1) de uma amostra de solo e estudaram o seu poder de degradação de lipídios, para um posterior tratamento de efluentes com elevados teores de O&G. O estudo foi feito com efluente sintético composto de 10 g de óleo de salada, 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 de NaCl, 0,014 g de CaCl₂, 0,014 g de KCl e 0,01 g de MgSO₄ por litro. A cepa de *Burkholderia sp* foi pré-cultivada em meio LB a 30 °C e 180 rpm por 18 h. Subseqüentemente, 1 % (V/V) do pré-cultivo foi inoculado em 100 mL de efluente sintético. Também foi analisada a habilidade de degradação de outros lipídeos, além do óleo de salada, como óleo de oliva, óleo de sésamo e sebo bovino, os quais foram adicionados ao efluente sintético nas mesmas condições, obtendo-se 96,7 %, 92,3 %, 90,1 % e 77,4 % de degradação, respectivamente. Segundo os autores, esses resultados mostraram que *Burkholderia sp* DW2-1 pode ser usada

para tratamento de efluentes sem o controle de temperatura, visto que essas degradações foram obtidas na faixa de 20 a 38 °C, após 48 h de incubação.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de estudos de utilização de lipases de *B. cepacia* LTEB11 produzidas por fermentação em estado sólido (FES) para tratamento de efluente de indústria de laticínios, e teve como objetivos específicos:

- Verificar a influência do pré-tratamento enzimático, variando-se o teor de gordura, no perfil de ácidos livres liberados durante o tratamento e na remoção de óleos e graxas em amostras de efluentes autoclavadas e não autoclavadas.
- Verificar o efeito das variações de temperatura, pH e concentração do sólido fermentado contendo a lipase no pré-tratamento de efluente de indústria de laticínios, utilizando-se um delineamento fatorial e avaliando-se as respostas teor de óleos e graxas, DQO e atividade enzimática no efluente.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático na biodegradabilidade aeróbia do efluente, através da metodologia de Zahn-Wellens.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático na razão de biodegradabilidade, através das determinações da demanda bioquímica de oxigênio e da demanda química de oxigênio (DBO₅/DQO)

- Avaliar a influência do pré-tratamento enzimático no crescimento dos microrganismos do lodo ativado, pela determinação do teor de sólidos totais do lodo ativado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

As Tabelas 2 e 3 mostram os principais equipamentos e os reagentes utilizados neste trabalho, respectivamente.

Tabela 2. Descrição dos equipamentos utilizados nesse trabalho.

<u>Equipamentos</u>	<u>Marca</u>
- Balança analítica e de precisão	HR-200, Marte
- Extrator Soxhlet	Fisatom
- Espectrofotômetro	UV-240 IPC, Shimadzu; HP Hewlett Packard 8452A
- Evaporador rotatório	Fisatom -0405
- Câmara de fluxo laminar	Veco
- Bloco digestor para DQO.	Policontrol
- Potenciômetro	Handylab 1.
- Titulador automático	718 stat Titrino, Metrohm
- Centrífuga	BR4i, Jouan
- Agitador orbital	TE-421, Tecnal
- Autoclave	Bio Enge
- Liofilizador	Jouan LP3 modelo 60
- Estufa	Quimis
- Agitador mecânico	Fisatom 713

Tabela 3. Principais reagentes utilizados nesse trabalho

<u>Reagentes</u>	<u>Fornecedor</u>
- Palmitato de p-nitrofenila	Sigma
- Tributirina	Sigma
- Ácido sulfúrico p.a	F.maia
- Glicerol p.a,	Panreac (USA)
- Acetona, 99%	F. maia
- Etanol	Dipalcool
- Hidróxido de sódio p.a	Vetec
- Celite p.a	Synth
- Caolim p.a	Synth
- Hexano, 98%	F.maia
- Sulfato de mercúrio II p.a	Synth
- Dicromato de potássio p.a	Merck
- Sulfato de prata p.a	Vetec
- Filtro de membrana 0,45 µm	Millipore®
- Creme de leite comercial	Cedrense

4.2. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa bacteriana isolada de uma contaminação de meio de cultura no LTEB (*Burkholderia cepacia* LTEB11), e caracterizada pelo IRD (ex-ORSTOM), Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL, Marseille, France.

4.3. MANUTENÇÃO DA CEPA E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para a manutenção, *B. cepacia* foi inoculado em do meio líquido Luria-Bertani (LB, 0,5 g de NaCl, 0,5 g de triptona, 0,25 g de extrato de levedura,

dissolvidos em 50 mL de água destilada) e cultivada a 29 °C, 200 rpm, durante 12 h. Este meio foi utilizado como pré-inóculo ou para armazenamento da cepa. Neste caso, retirou-se 1 mL e adicionou-se 1 mL de glicerol 40% (v/v), previamente autoclavado. A cepa foi então armazenada a -18 °C.

4.4. PRODUÇÃO DA ENZIMA

A enzima foi produzida por FES conforme descrito e otimizado por FERNANDES (2006). Utilizou-se frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de farelo de semente de girassol, umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 para dar 55 % de umidade no substrato. O meio de cultivo foi autoclavado a 120 °C por 15 min e 1 atm e, em seguida, resfriado e inoculado com 1 mL do pré-inóculo e incubado a 29 °C por 72 h, quando normalmente ocorreu a produção máxima da enzima. Em seguida, o sólido fermentado foi seco em liofilizador Jouan LP3 modelo 60, por 24 h, sob vácuo de 0,097 mPa, caracterizado em termos de sua atividade enzimática, e armazenado a 4 °C para utilização nos experimentos de tratamento do efluente. Também foram feitos controles de atividade durante o armazenamento para assegurar que a quantidade de enzima (em unidades totais, U) era a requerida em cada experimento.

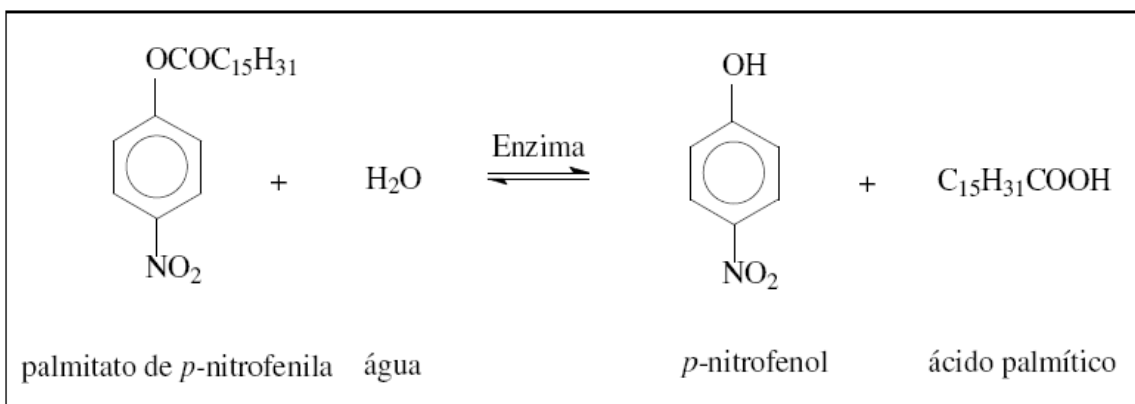
Para caracterização da enzima e acompanhamento do cultivo, foram retirados 1,5 g de cada Erlenmeyer a cada 24 h para dosagem de atividade lipolítica diretamente no sólido fermentado e a outra parte (aproximadamente 8,5 g do material fermentado) foi submetida à extração da enzima com 50 mL de solução de NaCl 2 % (m/V). A mistura de sólido fermentado e solução extratora foi

incubada em agitador orbital por 1 h, a 200 rpm e 29 °C. A mistura foi filtrada em gaze e o sólido foi prensado manualmente para extração do líquido. O extrato resultante foi centrifugado por 10 min a 12520 xg e utilizado para determinação da atividade lipolítica. O controle dos experimentos foi feito seguindo-se o mesmo procedimento, mas sem inocular a bactéria. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1. Método do pNPP

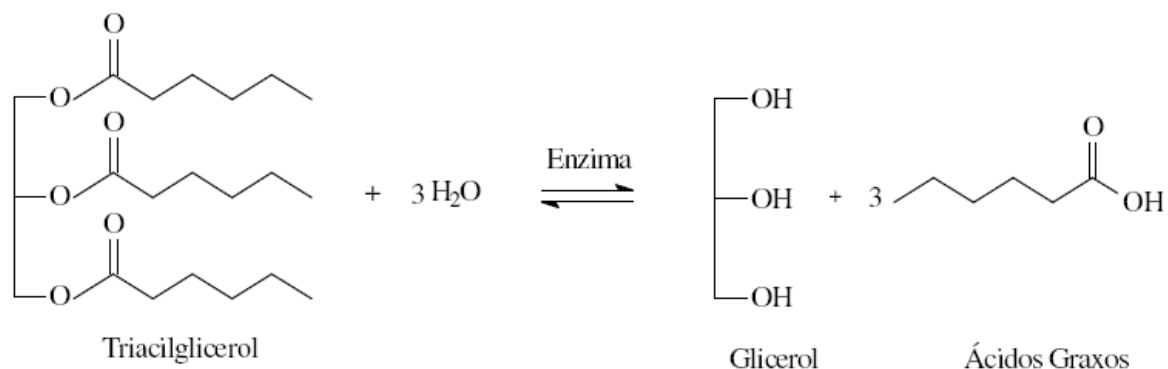
Este método espectrofotométrico foi utilizado em todo o trabalho para determinar a atividade lipolítica do extrato do material fermentado. O método foi inicialmente descrito por WINKLER & STUKMANN (1979), sendo modificado por LIMA (2004). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila em meio aquoso contendo (Esquema 1) goma arábica e Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela, é monitorada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de *p*NP (*p*-nitrofenol), nas condições do ensaio.



Esquema 1. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

4.5.2. Método Titulométrico

Este método foi utilizado tanto para determinar a atividade no extrato, quanto diretamente no sólido fermentado. A determinação da atividade de lipases por titulometria é baseada no método proposto por STUER *et al.* (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (Esquema 2). A determinação das atividades foi realizada utilizando-se como substrato a tributirina, em titulador automático pH-Stat Metrohm 718. O meio de reação consistiu de 250 μL de tributirina em 15 mL de tampão Tris-HCl 0,025 mol/L, pH 7,5 e NaCl 0,15 mol/L. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que produz 1mmol/L de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.



Esquema 2. Reação de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases

4.5.3. Cálculo e Expressão da Atividade Enzimática Produzida por Fermentação no Estado Sólido

Para expressar-se a atividade enzimática obtida por FES, utilizou-se a definição de unidades de atividade enzimática especificada para cada método (ver 4.5.1. e 4.5.2), e estas unidades são então relacionadas com a quantidade de sólido seco inicial (usualmente 10 g) utilizada para produzir o extrato bruto, ou com a quantidade de sólido usada diretamente na determinação da atividade (método titulométrico). A unidade final de expressão de atividade é “unidade por grama de substrato seco” (U/gss).

4.6. ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi cedido pela Indústria de Laticínios Batávia S.A, (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. A vazão de efluentes nesta indústria é de 2500 m³ por dia.

A Figura 9 mostra a lagoa de equalização da indústria, onde foram coletadas as amostras (20 L a cada 15 dias) utilizadas neste trabalho. As amostras de efluente foram caracterizadas segundo normas recomendadas por métodos oficiais, (SMEWW, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 1995), conforme descrito nos itens 4.10.2, 4.10.3 e 4.10.6.



Figura 9. Lagoa de equalização na Indústria de Laticínios Batávia S.A., em cuja entrada foi feita a coleta de amostras do efluente.

4.7. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO EFLUENTE

O tratamento enzimático do efluente foi realizado adicionando-se o sólido fermentado diretamente em amostras do efluente, utilizando-se as condições experimentais requeridas e especificadas nos experimentos. Foram

sempre realizados controles, onde era adicionado material fermentado autoclavado. Os parâmetros monitorados foram: ácidos livres (4.10.1), atividade enzimática detectada no efluente ($[E]_{\text{efl}}$) pelo método pNPP (4.5.1) e óleos e graxas, O&G (4.10.2), realizados antes e após o tratamento enzimático. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de efluente para análise de óleos e graxas, e Erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de efluente para as análises de ácidos livres e atividade enzimática.

4.7.1. Experimentos Prévios

Nos experimentos iniciais, a hidrólise foi realizada a 30 °C sob agitação de 150 rpm com 0,1 % (m/V) (ROSA, 2004) do material fermentado com atividade média de 23 U/gss. Foram testados diferentes tempos de incubação e, antes de iniciar a reação, o pH do efluente foi ajustado para 7,0.

Em uma primeira etapa, o tratamento foi realizado com amostras não autoclavadas nas condições descritas acima. O objetivo era verificar o efeito da ação de microrganismos originalmente presentes nas amostras. Com o efluente não autoclavado foram feitos tratamentos com três concentrações de óleos e graxas: 167 mg/L (concentração original no efluente), 242 mg/L, 348 mg/L e 690 mg/L. Estas três últimas concentrações foram obtidas adicionando-se gordura animal (creme de leite comercial, nata) ao efluente. Nas amostras autoclavadas, para fins de comparação, foi feito apenas o tratamento com efluente contendo o teor original de gordura.

4.7.2. Otimização do tratamento enzimático por delineamento fatorial

4.7.2.1. Padronização do efluente

Para os estudos de otimização, foram obtidos 50 L de efluente provenientes de uma só coleta. Nesta amostra, verificou-se a presença de sedimentos, onde estava a maior parte da gordura (534 ± 91 mg/g). Assim, o sedimento foi separado por decantação e o sobrenadante (doravante denominado efluente) foi separado e homogeneizado com agitador mecânico, e submetido à determinação de óleos e graxas (em triplicata) e finalmente armazenado a -18°C . Para melhor controle das variáveis, o efluente foi autoclavado antes do início de cada experimento.

O sedimento, aqui denominado de “gordura”, foi armazenado a -18°C e utilizado para conferir o teor de gordura requerido nos experimentos. Foram realizados experimentos para determinar a equivalência entre a gordura adicionada e o resultado final em óleos e graxas obtido na amostra antes do tratamento enzimático. Para tanto, diferentes quantidades da gordura foram adicionadas ao efluente com homogeneização em agitador mecânico por 2 h, seguindo-se a determinação de O&G (Figura 10). Após esta etapa foi estabelecida a quantidade de gordura que seria adicionada em todos os experimentos do delineamento fatorial ($0,6$ g/L de efluente) que correspondeu a 348 ± 39 mg/L de O&G efetivamente medidos no efluente.

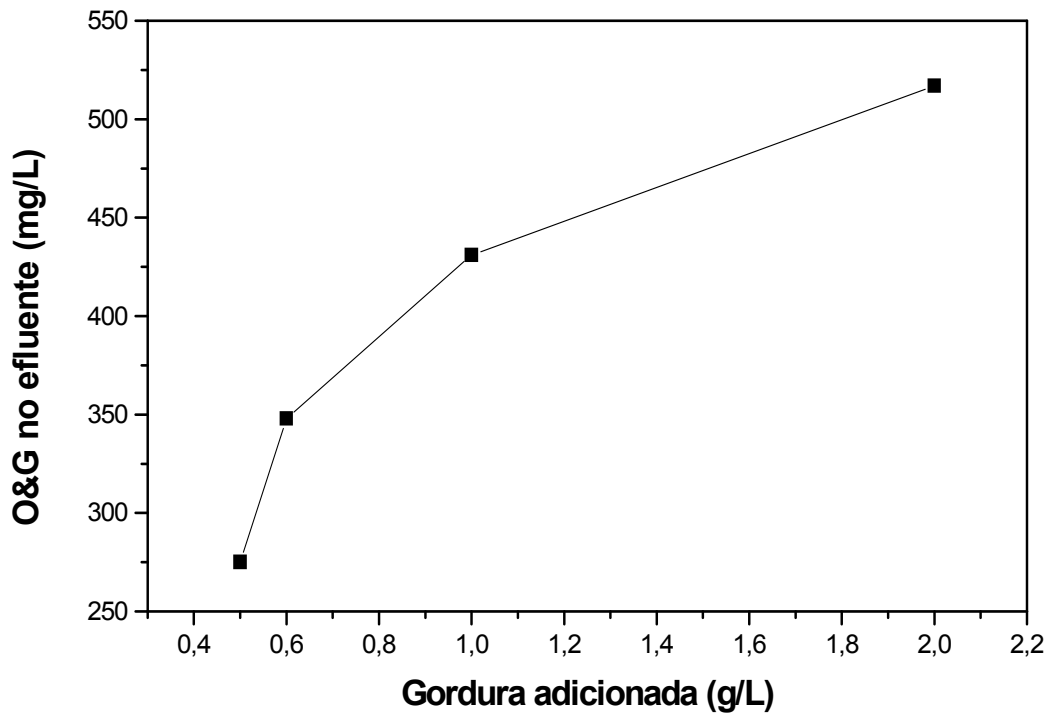


Figura 10. Relação de diferentes quantidades de gordura adicionadas ao efluente com o teor de óleos e graxas obtido no efluente após homogeneização em agitador mecânico por 2 h.

4.7.2.2. Planejamento Fatorial

Para investigar o efeito de três variáveis independentes sobre o tratamento do efluente utilizou-se um delineamento fatorial incompleto 3^3 com três repetições no ponto central (BOX e BEHNKEN, 1960). As variáveis independentes estudadas (em 3 níveis) foram temperatura (x_1), pH (x_2) e concentração da enzima inicial ($[E]_{\text{inicial}}$) no experimento, expressa por unidades totais iniciais por L de efluente (x_3) (Tabela 4).

Neste trabalho, a concentração mínima de enzima (nível -1) foi equivalente a 0,1 % (m/V) do sólido fermentado por L de efluente, conforme ROSA

(2004), o que correspondeu a 23,4 U/L de efluente, valor já utilizado nos experimentos prévios. Os outros níveis foram equivalentes a 47,2 U/L (nível zero) e 70,8 U/L (nível +1), correspondentes a 0,2 e 0,3 % (m/V) respectivamente. Os níveis de temperatura estudados foram os mais próximos possíveis da temperatura ambiente, para permitir uma redução de custos do processo. Os níveis de pH estudados neste trabalho estão relacionados com as variações de pH do efluente original, conforme mostrado na caracterização do efluente (Tabela 7).

Tabela 4. Delineamento de Box-Behnken (BOX e BEHNKEN, 1960) com as variáveis independentes originais e codificadas para o tratamento enzimático de efluente da indústria de laticínios

Ensaio	Temperatura °C (Nível)	pH (Nível)	[E] _{inicial} U/L (Nível)
1	25 (-1)	5,0 (-1)	47,2 (0)
2	35 (1)	5,0 (-1)	47,2 (0)
3	25 (-1)	9,0 (1)	47,2 (0)
4	35 (1)	9,0 (1)	47,2 (0)
5	25 (-1)	7,0 (0)	23,6 (-1)
6	35 (1)	7,0 (0)	23,6 (-1)
7	25 (-1)	7,0 (0)	70,8 (1)
8	35 (1)	7,0 (0)	70,8 (1)
9	30 (0)	5,0 (-1)	23,6 (-1)
10	30 (0)	9,0 (1)	23,6 (-1)
11	30 (0)	5,0 (-1)	70,8 (1)
12	30 (0)	9,0 (1)	70,8 (1)
13	30 (0)	7,0 (0)	47,2 (0)
14	30 (0)	7,0 (0)	47,2 (0)
15	30 (0)	7,0 (0)	47,2 (0)

*[E]_{inicial} = 23,6 U/L correspondem a 1 g do sólido fermentado adicionado a 1 L de efluente (0,1%), com atividade 23,6 U/gss (tributirina) ou 204,5 U/gss (pNPP).

(I) Procedimento experimental

Os tratamentos foram feitos incubando-se o efluente com o sólido fermentado contendo a enzima na temperatura requerida no experimento e agitação de 150 rpm. Foram utilizados Erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de efluente para a variável resposta O&G e em Erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de efluente para as respostas ácidos livres, DQO e atividade enzimática detectada no efluente $[E]_{\text{efl}}$. Foram feitos controles para todos os experimentos utilizando-se o sólido fermentado autoclavado.

(II) Análise dos resultados

Uma equação polinomial quadrática foi escolhida para o presente estudo em razão de ser uma equação relativamente simples e que permite o emprego de técnicas gerais de otimização (MYERS, 1971).

A forma geral da equação quadrática é:

$$\hat{Y}_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \varepsilon$$

Onde:

\hat{Y}_1 é a variável dependente;

x_1, x_2, x_3 são os níveis codificados das variáveis independentes;

β 's são os coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados;

ε é o resíduo que mede o erro experimental, apresentando uma distribuição normal, com média zero e variância igual σ^2

Os resultados da regressão múltipla (incluindo os respectivos coeficientes) e da análise de variância (teste F) mostram as relações quantitativas existentes entre os fatores e a resposta.

A influência das variáveis foi visualizada nas curvas de superfície de resposta, que foram construídas fixando-se uma das variáveis independentes, sendo observadas as seguintes respostas:

\hat{Y}_1 = remoção de óleos e graxas (%)

\hat{Y}_2 = Atividade enzimática detectada no efluente $[E]_{\text{eff}}$ (U/L do efluente)

\hat{Y}_3 = ácidos livres, mmol/mL

\hat{Y}_4 = Demanda Química de Oxigênio (DQO) mg/L.

4.8. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE

Após a otimização do tratamento enzimático via delineamento fatorial, foram realizados experimentos nas melhores condições de hidrólise enzimática (pH 8,0, 32°C e 47,2 U/L). Os testes de biodegradabilidade tem uma grande importância para se saber como se comportam os efluentes em tratamentos biológicos utilizados nas indústrias

4.8.1. Origem e Coleta do Lodo Ativado

Amostras de lodo ativado foram coletadas na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE-Belém), no Município de Curitiba. As coletas foram realizadas no tanque de aeração pelos operadores da estação e o lodo foi colocado em frascos plásticos de 20 L de capacidade, sendo imediatamente transportado até 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.

4.8.2. Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia

A determinação da biodegradabilidade aeróbia foi fundamentada na metodologia Zahn Wellens, descrita em *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD 302B, 1996). Os experimentos foram realizados empregando 12 reatores de 1 L de capacidade, sendo três para efluente tratado, três para efluente não tratado e os outros seis com os controles de glucose e dietilenoglicol. Todos os reatores tiveram aeração proporcionada por placas de pedras porosas adaptados em sua base, ligados a uma bomba de ar comprimido (do tipo empregado em aquário), colocadas na parte inferior de cada reator, de forma a proporcionar aeração e turbulência em todo conteúdo do reator (Figura 11). As condições gerais para a execução do teste estão descritas na Tabela 5 (MORAIS, 2005).



Figura 11. Reatores utilizados para o teste de biodegradabilidade aeróbio. A aeração e a turbulência são proporcionadas por difusores de pedra porosa ligados a uma bomba de aquário de forma a manter o oxigênio dissolvido (OD) entre 2 e 6 mg/L . Esta foto é do momento de sedimentação do lodo para a coleta da amostra para análise de DQO.

Tabela 5. Condições gerais de avaliação da biodegradabilidade aeróbia (Zahn Wellens) de efluentes

Condições gerais	Método OECD 302B (1996)	Adotadas nesse trabalho
DQO	100 a 1000 mg/L.	1000 mg/L.
Incubação	20 a 25 °C	20 a 25 °C
Duração do ensaio		
Biodegradabilidade Total	28 dias	12 dias
Biodegradabilidade Primária	< 28 dias	
Forma de Homogeneização	Agitação magnética ou mecânica	aeração (com difusores)
Concentração de sólidos no meio	0,2 a 1 g/L em SST*	3 g/L em SST*
Recipiente de teste	Volume útil de 1 a 4 L	0,5 L
Volume de Amostragem	10 mL	5 mL
Freqüência de Amostragem	Diária	Diária
Controle de Viabilidade da Biomassa	Dietilenoglicol + nutrientes	Dietilenoglicol + nutrientes

* SST (sólidos suspensos totais)

O lodo ativado foi coletado na ETE e aerado por um período de 24 h; em seguida, o sobrenadante foi retirado. Após esse período, os reatores receberam a biomassa de lodo ativado, que foi aerada por 10 min e, em seguida adicionada aos efluentes tratados e não tratados enzimaticamente e aos controles (dietilenoglicol e glucose), juntamente com 2,5 mL da 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). $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (21,75 g/L) em cada reator. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (nas condições da Tabela 5). O planejamento dos experimentos foi realizado com base

nas seguintes equações, considerando determinações de DQO de acordo com metodologia Zahn-Wellens.

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

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

Onde:

V_A : Volume de amostra (mL); V_L : Volume de lodo (mL);
 V_T : Volume total (mL); C_A : DQO da amostra, (mg /L);
 C_L : Sólidos Suspensos Totais do Lodo (SST) (mg/L);
 A/M: relação alimento/microrganismos (kg_{DQO}/kg_{SST})

Foram realizados dois tipos controles: um foi empregado para comprovar a atividade do lodo ativado não aclimatado nos primeiros dias de teste (4 a 6 dias); este controle consiste em uma solução à base de glucose. Para controle do poder de degradação dos microrganismos (do lodo ativado), no período de 8 a 12 dias de teste, foi utilizada a solução de dietilenoglicol, que é empregado para testar a atividade microbiana presente no lodo. De acordo com a metodologia de Zahn-Wellens, para o teste de biodegradabilidade ser considerado válido, a concentração de dietilenoglicol, determinada em carbono orgânico dissolvido (COD) ou DQO, deve sofrer redução acima de 90 % após 10 dias de incubação. A cada 24 h, a aeração foi interrompida por 15 min para verificação das condições dos difusores e para coleta das amostras. A aeração foi mantida

durante o restante do tempo. As alíquotas coletadas foram filtradas em membranas Millipore® 0,45 µm e submetidas à análise de DQO.

4.9. ESTUDOS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 NO EFLUENTE

Realizados os experimentos de otimização, e tendo-se verificado atividade no efluente durante e após o tratamento com o sólido fermentado contendo a lipase, foram feitos ensaios para se determinar a possibilidade de crescimento da bactéria e produção da lipase nas amostras de efluente. Para fins de comparação, foram estudadas as cinéticas de crescimento e produção da lipase em 3 diferentes meios líquidos: (a) LB - 1 % (m/V) triptona, 1 % (m/V) NaCl e 0,5 % (m/V) extrato de levedura; (b) no meio LB com 1 % (V/V) de óleo de oliva; (c) em amostras de efluente com concentração de óleos e graxas de 255 mg/L, com dois tipos de inóculo: com o inóculo preparado em meio LB (com interrupção quando a densidade ótica, D.O., a 600 nm, do meio estava entre 0,6 a 0,8) e com o sólido fermentado utilizado nos experimentos anteriores. Foram utilizados 50 mL dos meios, em Erlenmeyers de 250 mL, inoculados com um 1 mL de inóculo ou 0,2 % do material fermentado (m/V). O crescimento do microrganismo nos meios foi acompanhado pela leitura da D.O. das amostras em 600 nm. A atividade lipolítica foi determinada pelo método do pNPP (4.5.1).

4.10. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1. Determinação do teor de ácidos livres

A eficiência da hidrólise enzimática do efluente foi avaliada através da determinação do teor de ácidos totais liberados. Realizou-se uma cinética, onde alíquotas de 5 mL foram retiradas do efluente submetido à ação enzimática. A paralisação da atividade enzimática foram feitas pela adição de uma mistura acetona:etanol (1:1V/V) (ROSA, 2004). As alíquotas foram tituladas com solução NaOH 0,01 mol/L com fenolftaleína. O teor final de ácidos livres foi obtido através da equação (3).

$$AL = \frac{V(NaOH)M(NaOH)1000}{Va} \quad (3)$$

Onde:

AL = teor de ácidos livres (mmoles/mL)

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

M(NaOH) = concentração da solução de NaOH (mol/L);

Va = volume da amostra (mL)

4.10.2. Óleos e Graxas

A determinação do teor de óleos e graxas (O&G), antes e depois do tratamento enzimático foi feita pelo método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente, de acordo com o procedimento padrão (APHA, 2005). As amostras foram acidificadas com HCl concentrado (5 mL/L) e filtradas em papel de filtro

quantitativo (MN 640W), coberto com uma camada de auxiliar de filtração obtida pela filtração de uma suspensão aquosa de Celite 1 % e Caolim 0,5 % (m/V). As amostras preparadas foram colocadas dentro de um cartucho de extração e secas em estufa a 105 °C por 30 min. A extração foi realizada utilizando-se balões de fundo redondo, com pérolas de vidro, previamente tarados, contendo 250 mL de hexano, conectados ao extrator Soxhlet contendo o cartucho com as amostras, com velocidade de 20 ciclos por min, durante 4 h. O hexano foi então evaporado em evaporador rotatório e o balão contendo os resíduos oleosos foi colocado para secar em estufa a 105 °C até peso constante e, após isto, resfriado em dessecador e então pesado. Foram feitas triplicadas de cada determinação. O cálculo do teor de óleos e graxas, em percentagem, foi feito utilizando-se a Equação 4.

$$O \& G(mg / L) = \frac{(P1 - P) \times 1000000}{V_{amostra}(mL)} \quad (4)$$

Onde:

P = peso (g) do balão tarado;

P1 = peso (g) do balão com resíduo oleoso

V = volume da amostra (mL).

4.10.3. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO é um indicador de matéria orgânica baseado na concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica, biodegradável ou não (ZUCCARI, 1996). A DQO, determinada em amostras tratadas e não-tratadas enzimaticamente, foi determinada pelo método colorimétrico-padrão de refluxo fechado (ZUCCARI, 1996), com $K_2Cr_2O_7$ (0,40 mol/L) em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 (0,02 mol/L) como catalisador e $HgSO_4$ (0,20 mol/L) para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. As amostras foram diluídas de forma adequada para as faixas de concentração utilizadas na curva de calibração. Em seguida, foram adicionadas as soluções, sendo os tubos colocados em digestor e mantidos a 150 °C por 2 h. Após resfriamento dos tubos, foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro em 600 nm, contra controles preparados com água destilada.

Para preparar a curva analítica (Figura 12) foi utilizado biftalato de Potássio previamente seco a 103 °C por 2 h, onde 850 mg de biftalato/L correspondem a 1000 ppm de O_2 . Os pontos preparados foram: 900, 800, 600, 500, 400, 200 e 100 ppm de O_2 . Foram adicionados 1 mL de amostra contendo biftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$) e 1 mL de água, para completar os 2 mL exigidos pela técnica.

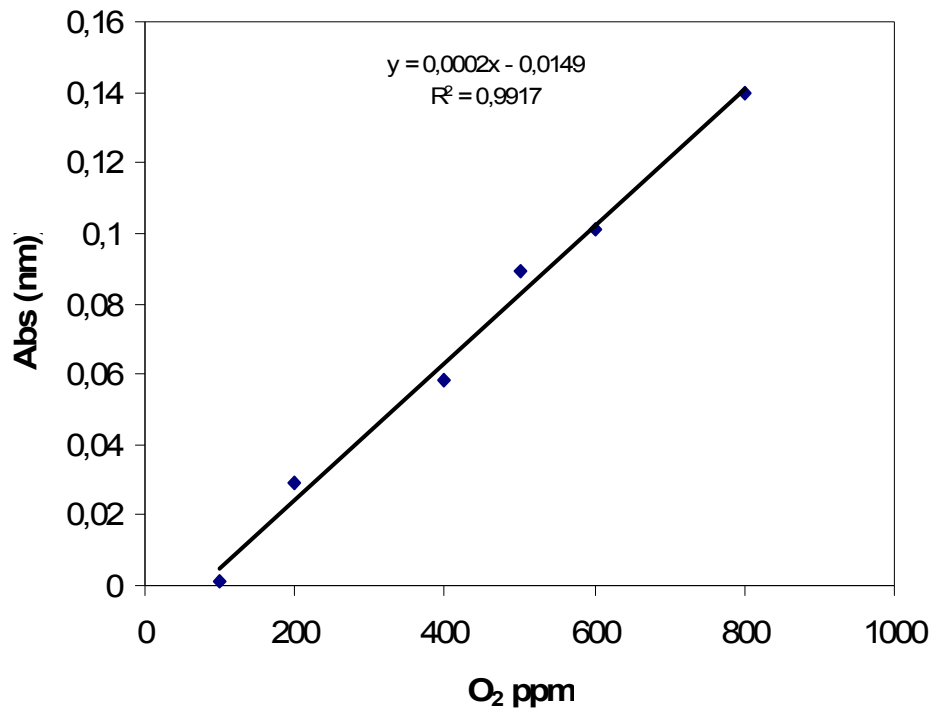


Figura 12. Curva de calibração para determinação da demanda química de oxigênio (DQO).

4.10.4. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅)

A DBO₅ corresponde à quantidade de oxigênio necessária para a metabolização da matéria biodegradável por um consórcio de microrganismos, nas condições de ensaio (MORAIS, 2005). As determinações foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos em APHA (5210B e 5210D, 1995).

O procedimento simplificado consta das seguintes etapas: (a) determinação do DQO da semente (esgoto doméstico) e da amostra a ser analisada; (b) diluição das amostras e da semente, em função dos resultados obtidos, e correção do pH para 7,0 -7,3 com solução de H₂SO₄ ou de NaOH; (c)

determinação do oxigênio dissolvido (OD) inicial pelo método iodométrico de Winkler; (d) incubação das amostras acondicionadas em frascos para DBO, por 5 dias, a 20 °C no escuro; (e) determinação do teor de OD final das amostras. A diferença de consumo de oxigênio nesse período, descontando o controle é a medida da DBO em 5 dias (DBO_5) expressa como massa de oxigênio consumido por litro de amostra.

Os cálculos, quando é empregado o sistema Winkler (método modificado da azida), foram realizados pela Equação 5.

$$DBO_5 (mg / L) = \frac{(OD_i - OD_f)}{\%(\text{diluição})} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

OD_i = Oxigênio dissolvido inicial

OD_f = Oxigênio dissolvido final

4.10.5. Razão de Biodegradabilidade (DBO_5/DQO)

Em termos de biodegradabilidade de efluentes, a maior aplicação do parâmetro 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 (MORAIS, 2005).

A razão de biodegradabilidade é determinada a partir dos valores de DBO_5 e de DQO, avaliados tanto para o efluente tratado como para o efluente bruto, sendo que as determinações foram realizadas das descrições descritas nos itens 4.10.4 e 4.10.3. Esta razão foi determinada em amostras obtidas nas condições otimizadas de tratamento enzimático. As análises de DBO_5 e de DQO foram feitas, neste caso específico, pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR, CEPPA, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.10.6. Sólidos Suspensos Totais (SST) do Lodo Ativado

O teor de sólidos suspensos totais foi determinado em amostras de lodo ativado por gravimetria, empregando a metodologia da *American Public Health Association* (APHA, 2540D, 1995). Alíquotas de 20 mL de lodo homogeneizado foram filtradas a vácuo, em cadinhos de Gooch, com porosidade n^o 2, limpos e previamente tarados, e secas por 1 h à temperatura de 103-105 °C, e então resfriadas e pesadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

5.1.1. Caracterização da enzima

A dosagem lipolítica do sólido fermentado foi determinada por dois métodos diferentes: do pNPP (espectrofotométrico) e por titulometria, usando-se tributirina como substrato. Neste último caso, foram dosadas as atividades do extrato bruto e do sólido fermentado adicionado diretamente à emulsão de tributirina. Este ensaio teve por objetivo verificar se era possível dosar a atividade enzimática produzida diretamente no sólido fermentado, sem passar pela etapa de extração. Observou-se (Tabela 6) que a atividade do extrato bruto frente ao pNPP alcançou um valor máximo de 36,7 U/mL após 72 h de cultivo, o equivalente a 204,5±5,3 U/gss. Os resultados obtidos quando se utilizou o método titulométrico foram muito menores, tanto na dosagem no extrato bruto (18,4 U/mL, 36,8 U/gss), quanto na dosagem por adição direta do sólido fermentado ao substrato emulsionado (23,6 U/gss).

Tabela 6. Caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 produzida por fermentação no estado sólido

Atividade/amostra	pNPP U/mL	Titulométrico U/mL	pNPP U/gss	Titulométrico U/gss
Extrato Bruto	36,7±5,3	18,4±0,2	204,5±5,3	36,8±0,2
Sólido Fermentado*				23,6±3,4

* Adição direta do material fermentado e liofilizado ao meio reacional

É importante salientar que os resultados dos dois métodos são de difícil comparação, tendo em vista que os substratos são bastante diferentes e a atividade de enzimas lipolíticas, que são enzimas que atuam na interface, está diretamente ligada à qualidade da emulsão formada pelos diferentes substratos (VERGER, 1997). Note-se que o objetivo destes ensaios foi a caracterização da enzima (atividade lipolítica) que seria utilizada nos ensaios posteriores, para fins de padronização e controle dos experimentos.

A presença de lipases ditas *verdadeiras*, aquelas que apresentam atividade contra triacilgliceróis de ácidos graxos com cadeia acima de 10 carbonos, já foi previamente confirmada no mesmo material para este microrganismo por FERNANDES *et al* (2007), onde as atividades encontradas no extrato bruto foram de 240 U/gss contra o pNPP, 379 U/gss contra a trioleína e 84 U/gss contra tributirina.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste trabalho foi proveniente da Indústria de Laticínios Batávia S.A (Carambeí, PR), que forneceu também os resultados das análises realizadas pelo seu próprio laboratório. Os resultados comparativos das análises estão mostrados na Tabela 7. No decorrer deste trabalho foram utilizadas várias amostras de efluentes, coletadas em diferentes datas, a cada 15 dias aproximadamente, entre o ano de 2006 e 2007. Os resultados obtidos neste trabalho estão próximos dos obtidos no laboratório da empresa, que por sua vez estão dentro do esperado para um efluente com elevada carga lipídica.

Os valores encontrados para óleos e graxas (167 - 341 mg/L) são considerados adequados para estudos de tratamento enzimático, uma vez que efluentes contendo acima de 150 mg/L de teor lipídico podem prejudicar o desempenho de tratamento subsequente (PEREIRA *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2000). Em muitos países, o máximo permitido de O&G situa-se entre 5 a 10 mg/L (EL-Bestawy *et al.*, 2005), sendo que no Brasil este valor é de 50 mg/L (CONAMA, 2005).

Tabela 7. Caracterização do efluente produzido pela Indústria de laticínios

	pH	DQO (mg/L)	Óleos e Graxas (mg/L)
LTEB*	4,8 -11,5	1591- 4626 ± 204	167 - 341 ± 35
Batávia S.A	4,9 -9,0	1700 – 3500	231
Literatura**	3,4 - 8,4	1070 – 8200	200 – 2000

* LTEB – Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, DQ/UFPR

** Rosa (2004), Mendes *et al.*, (2005).

5.3. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO EFLUENTE

5.3.1 Tratamento com efluente não autoclavado

Os resultados obtidos na cinética da hidrólise enzimática, avaliando-se ácidos livres, com efluente não autoclavado contendo diferentes teores de gordura estão apresentados na Figura 13. Observou-se que, para todas as concentrações de gordura estudadas, a produção de ácidos livres no meio até 5 h de tratamento, após o que ocorre uma estabilização ou pequeno decréscimo (entre 2 e 22 %) . À medida que a concentração de O&G no efluente aumentou, maior foi a quantidade de ácidos livres liberados, como era de se esperar, devido à ação da lipase sobre a gordura. Entretanto, não se pode afirmar que este aumento seja devido apenas

aos ácidos graxos, pois outros ácidos orgânicos podem estar sendo gerados no meio.

Jung *et al.* (2002) e Leal *et al.* (2006, 2002) também observaram que, quanto maior a quantidade da concentração de óleos e graxas, maior a quantidade de ácidos livres presentes nas amostras tratadas por lipases. A redução da concentração de ácidos livres após 24 h pode ser explicada pelo crescimento de microrganismos no efluente, que podem utilizar os ácidos livres como fonte de carbono. Como as amostras não foram autoclavadas, estes resultados podem ser atribuídos tanto à atividade da lipase de *B. cepacia*, como à atividade de enzimas de outros microrganismos presentes no efluente.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de remoção de O&G após 24 h de incubação, partindo-se de diferentes concentrações de O&G iniciais. Observou-se que não houve linearidade nos resultados, que assim se tornam de difícil interpretação. A variação dos resultados pode estar relacionada com o crescimento dos microrganismos que podem ter interferido na remoção de O&G, ou com o método de adição de gordura comercial (nata) ao efluente devido a problemas de homogeneização das amostras.

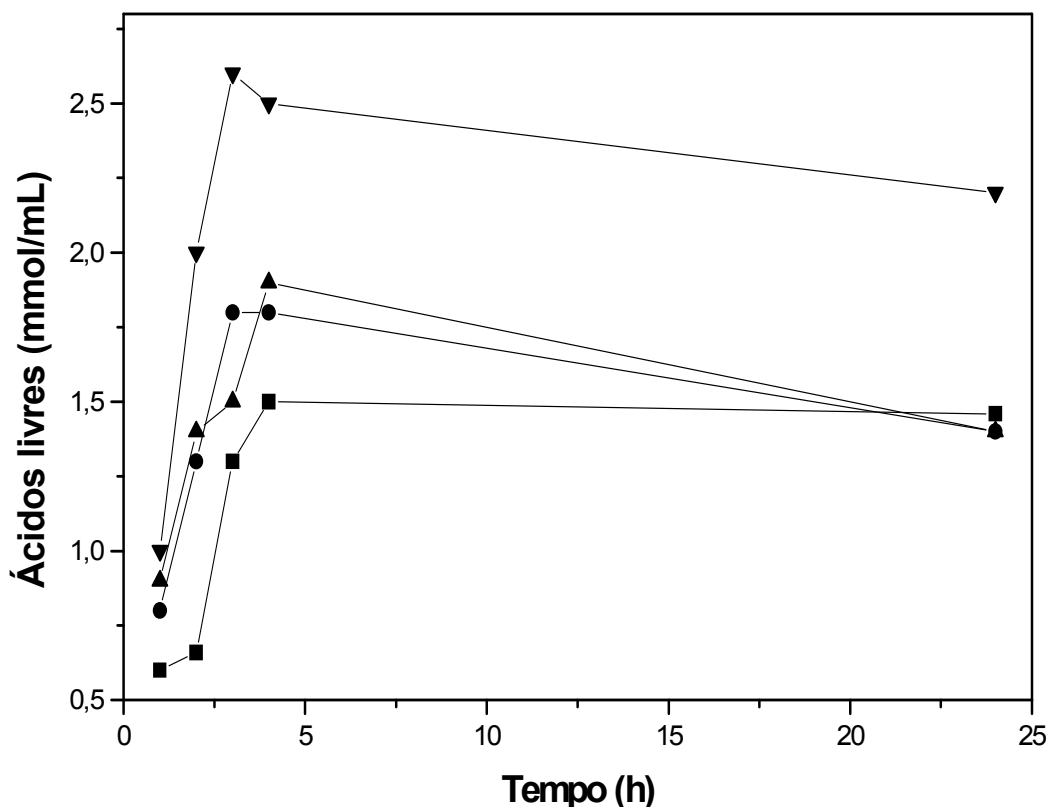


Figura 13. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Concentração de óleos e graxas: 167 mg/L \pm 15 (-■-), 242 mg/L \pm 20 (-●-), 348 mg/L \pm 7 (-▲-), 690 \pm 35 mg/L (-▼-). Condições: 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm.

Tabela 8. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção após 24 h de tratamento do efluente com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Concentrações Iniciais	167 mg/L	242 mg/L	348 mg/L	690 mg/L
Concentração após 24 h	67 mg/L	145 mg/L	62 mg/L	400 mg/L
Remoção de óleos e graxas %	60	40	82	42

Condições: 0,1% (m/v) do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm.

O experimento com a amostra de concentração inicial de O&G de 348 mg/L foi então repetido, para confirmação da atividade enzimática e verificação da reprodutibilidade dos resultados, considerando que foi o que apresentou maior remoção de lipídeos (82 %). Neste experimento, a adição da mesma quantidade (663 mg/L) de creme de leite comercial ao efluente levou a um teor de 464 ± 16 mg/L, mostrando que este método de adição de gordura não era reprodutível, o que pode ser atribuído à dificuldade de homogeneização da amostra. Os resultados estão mostrados na Figura 14. As maiores concentrações de ácidos livres (2,6 mmol/mL) foram obtidas em aproximadamente 12 h de incubação e a remoção de O&G foi de 70 % (Tabela 9). A diminuição acentuada do teor de ácidos livres a partir de 12 h de incubação pode ser atribuída ao crescimento dos microrganismos no efluente.

Dosou-se a atividade enzimática nas amostras correspondentes à cinética apresentada na Figura 14. Observou-se que a atividade presente no efluente manteve-se constante em $420 \pm 0,07$ U/L da amostra, o que mostrou a presença da enzima ativa no efluente e indicou a possibilidade de aumentar a remoção de O&G pelo aumento do tempo de incubação.

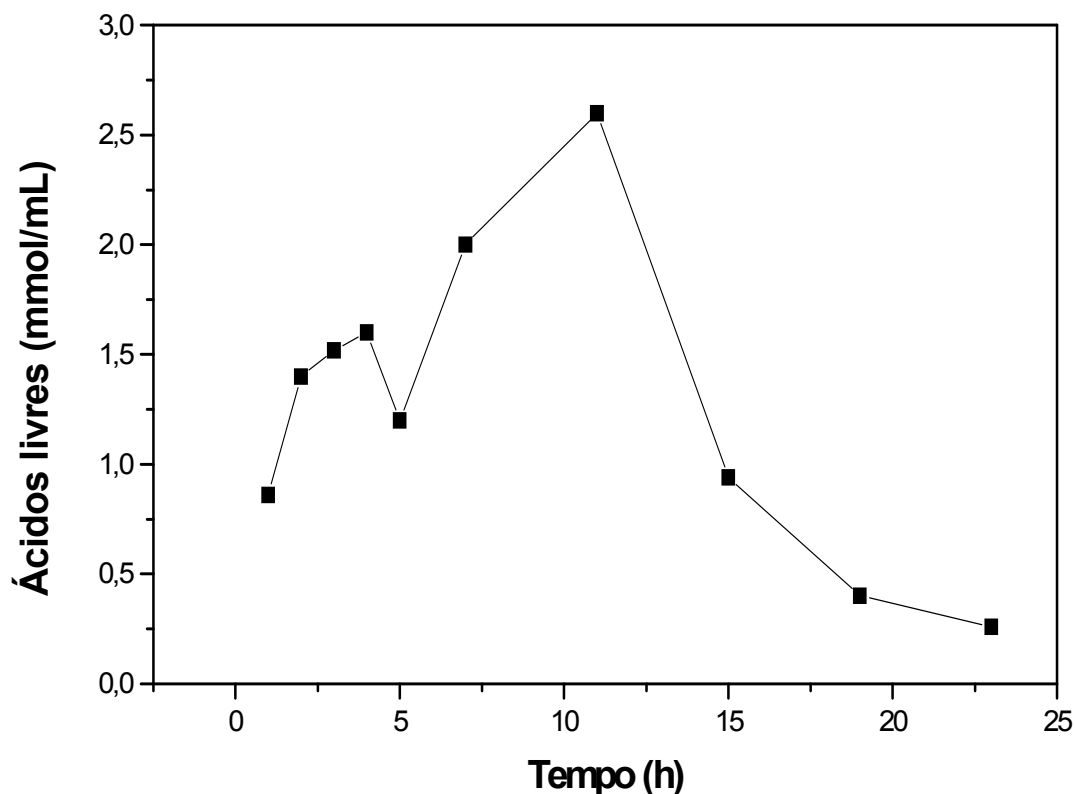


Figura 14. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente não-autoclavado com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 464 ± 16 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm.

Tabela 9. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção após 24 h de tratamento do efluente (não-autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Concentração inicial	464 mg/L
Concentração após 24 horas de reação	135 mg/L
Remoção de óleos e graxas, %	70

Condições: concentração inicial de 464 ± 16 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm.

A partir destes experimentos pode-se concluir, para o efluente não autoclavado, que existiu remoção máxima de óleos e gorduras entre 70 e 80 % após 24 h de incubação, mas que não era possível verificar o efeito do aumento do teor de gordura inicial nas amostras, pelo menos pelo método de adição utilizado, por falta de reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a presença de atividade lipolítica no meio sugeria que um aumento do tempo de incubação das amostras poderia levar a uma maior remoção de O&G.

As próximas etapas então consistiram em aumentar o tempo de incubação para 48 h, e utilizar amostras de efluente autoclavado para tentar diminuir a variabilidade nos resultados e verificar a influência do tratamento enzimático sem a presença dos microrganismos naturalmente presentes no efluente.

5.3.2 Tratamento com efluente autoclavado

Os resultados obtidos na curva (48 h) da hidrólise enzimática com efluente com concentração inicial de 167 mg/L de O&G (concentração original do efluente, sem adição de creme de leite comercial) estão mostrados na Figura 15. A remoção de O&G atingiu o máximo de 90 % após 48 h de reação (Tabela 10). Comparando-se os resultados obtidos com amostras não autoclavadas, observa-se que o efluente não autoclavado produziu a máxima remoção de O&G (70 a 80 %) após 24 h, enquanto que não houve remoção de O&G neste tempo para o efluente esterilizado.

Tabela 10. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção de gordura após 24 e 48 h de tratamento do efluente (autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Tempo de reação	Concentração de O&G	Remoção %
24 h	158 ±11 mg/L	0
48 h	10 ±4 mg/L	90

Condições: concentração inicial de 155±14mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm.

O perfil de concentração de ácidos graxos foi similar ao mostrado na Figura 14, exceto que neste caso, a máxima produção de ácidos livres foi menor (0,66 mmol/mL) e ocorreu em 16 h, com diminuição a partir de então. Estes resultados, em comparação com os obtidos no efluente não autoclavado, são coerentes, pois mostram a ação de um único microrganismo e de sua lipase sobre a gordura do efluente.

Neste experimento também foram dosadas as atividades lipolíticas no efluente durante o tratamento e verificou-se que a atividade se mantinha constante em 340±0,06 U/L da amostra, valor este menor do que o obtido com a amostra não autoclavada (420±0,07 U/L), o que sugere a atuação de outros microrganismos presentes nos efluentes, e confirma a estabilidade da lipase de *B. cepacia* nas condições do ensaio.

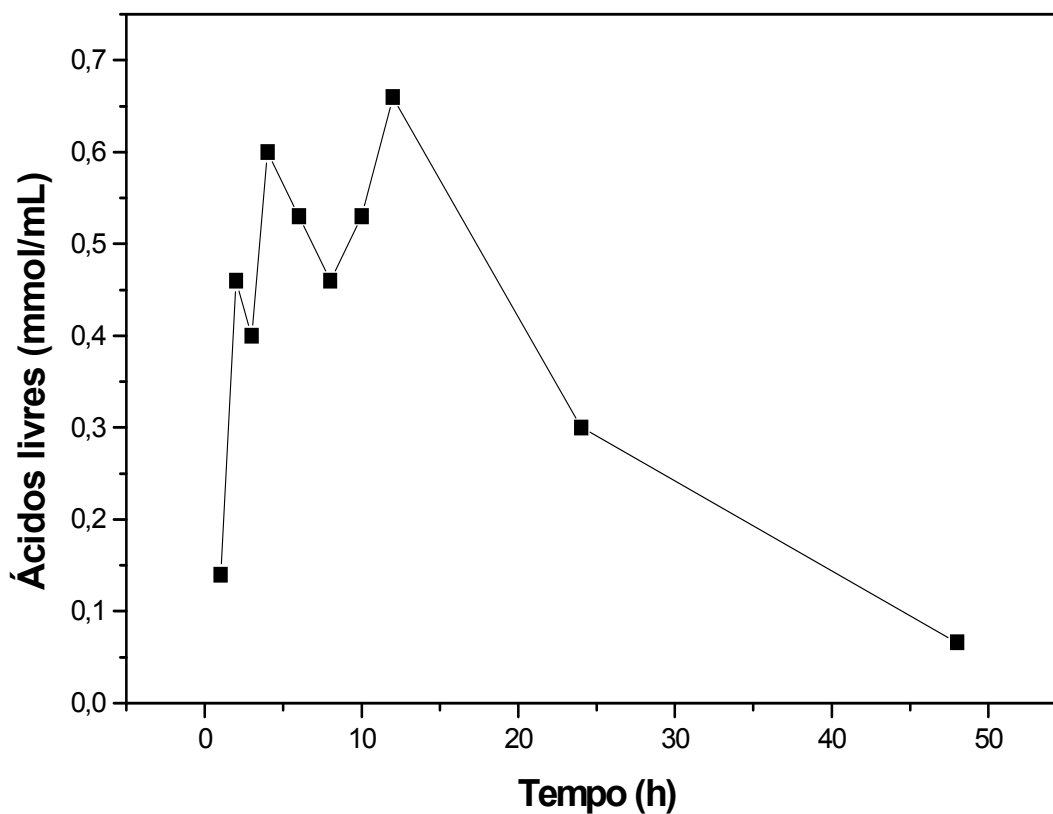


Figura 15. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente (autoclavado) com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 167 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm.

Em seguida, foi realizado outro experimento com efluente autoclavado, mas aumentado-se a concentração de óleos e graxas para 341 ± 22 mg/L. A Figura 16 mostra o perfil de ácidos livres durante o ensaio e a Tabela 11 mostra a remoção de O&G do efluente ao final do tratamento. Obteve-se um máximo de 76 % de remoção de O&G após 48 h, não havendo diferença estatisticamente significativa quando se aumentou o tempo para 72 h de incubação.

A partir destes experimentos, foi escolhido como tempo padrão 48 h de incubação para os experimentos de otimização e decidiu-se autoclavar o efluente

antes dos ensaios para evitar interferências de outros microrganismos que poderiam causar falta de reprodutibilidade nos resultados.

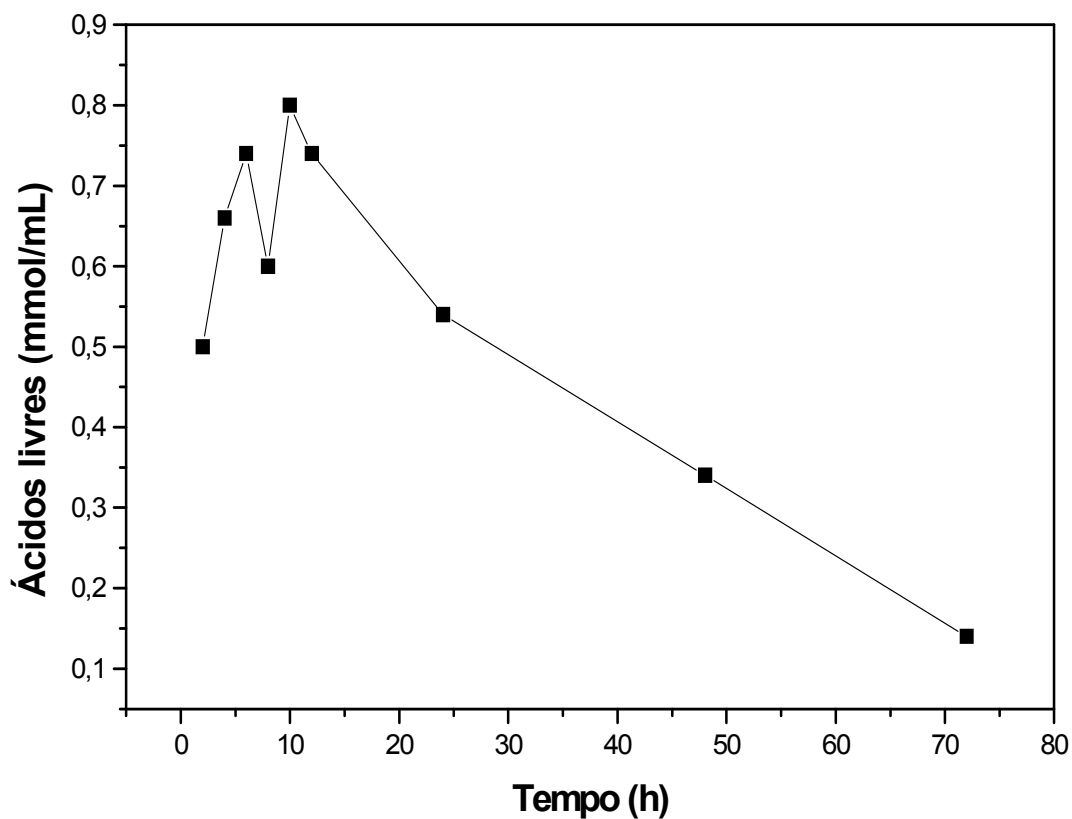


Figura 16. Ácidos livres liberados durante o tratamento do efluente (autoclavado) com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 341 ± 22 mg/L de óleos e graxas, 0,1 % do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação 30 °C e 150 rpm.

Tabela 11. Concentração de óleos e graxas e percentagens de remoção de gordura após 48 e 72 h de tratamento do efluente (autoclavado) com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Tempo de reação	Concentração de O&G	Remoção %
48 h	82±10 mg/L	76
72 h	76 ±4 mg/L	77

Condições: concentração inicial de 341 mg/L de óleos e graxas, 0,1% do sólido fermentado (23,6 U/L), pH 7,0, incubação a 30 °C e 150 rpm.

Os resultados aqui apresentados são similares ou, em alguns casos, são melhores do que os reportados por outros autores. CAMMAROTA *et al.* (2001) observaram o declínio dos ácidos livres após 24 h de incubação em todos os experimentos de efluente de laticínio contendo entre 203 e 868 mg/L de O&G, utilizando o sólido fermentado por *Penicillium restrictum*. O máximo de remoção de O&G no efluente hidrolisado foi de 90 % após 40 dias de operação no reator anaeróbico UASB (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*). EL-BESTAWY *et al.* (2004), observaram um aumento do teor de ácidos livres até seis dias de incubação, para *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia sp.* ou *P. pseudoalcaligenes*, utilizadas no tratamento de efluentes de indústria de extração de óleos e derivados. JEGANATHAN *et al.* (2006) reportaram remoção de O&G entre 40 e 60 %, ao final de três dias de tratamento do efluente de indústria de alimentos de animais domésticos com lipases imobilizadas de *Candida rugosa*.

5.4. ESTUDOS DE CRESCIMENTO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 NO EFLUENTE

Este estudo foi feito com o propósito de saber se *B. cepacia* crescia no efluente utilizado no presente trabalho. Para tanto, o crescimento da bactéria foi avaliado no efluente com dois tipos de pré-inóculo: um produzido no meio LB e outro inoculando-se o sólido fermentado, como utilizado nos experimentos de pré-hidrólise. Para fins de comparação, também foi acompanhado o crescimento de *B. cepacia* nos meios LB com e sem o indutor (1 % V/V de óleo de oliva). O efluente utilizado neste experimento continha concentração de 255 ± 11 mg/L de O&G.

Observou-se (Figura 17) que *B. cepacia*, quando inoculada no efluente, apresenta um crescimento mais lento do que quando cultivada em meio LB, com ou sem indutor, atingindo um valor máximo de absorvância em 72 h, de incubação, e não houve produção de atividade lipolítica. Entretanto, quando o sólido fermentado foi inoculado no efluente, observou-se que o crescimento começa depois de 24 h de incubação e, em 72 h a absorvância atingida foi a maior dentre todas as condições estudadas. Além disso, neste experimento, a atividade lipolítica foi de $4300 \pm 0,4$ U/L no final de 72 h, confirmando a produção da enzima no efluente durante o tratamento enzimático com o sólido fermentado.

Os resultados da curva de crescimento de *B. cepacia* no efluente estão de acordo com a remoção de O&G, e também com o consumo de ácidos livres, pois ambos O&G e ácidos livres começam a diminuir após 24 h de incubação, o que coincide com o início do crescimento do microrganismo no efluente.

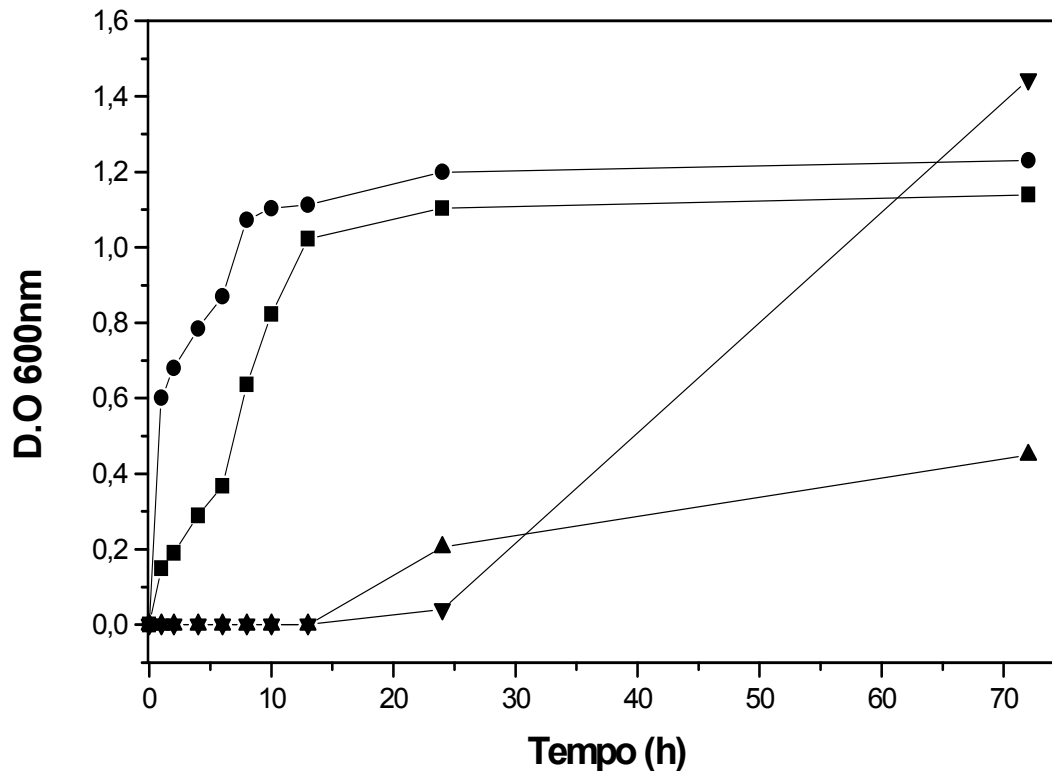


Figura 17. Curva de crescimento de *Burkholderia cepacia* LTEB11 nos meios: LB (1% de óleo de oliva) (-●-), LB (-■-), Efluente bruto (-▲-), sólido fermentado inoculado no efluente bruto (-▼-). Condições: concentração de O&G inicial do efluente 255 mg/L, 0,2% do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0, incubação 32 °C e 150 rpm.

Devido aos resultados de crescimento de *B. cepacia* no efluente, pode-se sugerir, para trabalhos futuros, a possibilidade de utilização do microrganismo diretamente inoculado no efluente para remoção de O&G, um método já reportado por outros autores (LANCIOTTI *et al.*, 2005, EL-BESTAWY *et al.*, 2004).

5.5. OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO POR DELINEAMENTO FATORIAL

A Tabela 12 mostra os parâmetros de caracterização do efluente utilizado na otimização do processo do tratamento enzimático. Estão mostrados os resultados para o efluente bruto, após a retirada do sedimento onde estava a maior parte da gordura (534 ± 91 mg/g), e quando foram adicionados 0,6 g/L desta gordura ao sobrenadante, que correspondeu 348 ± 39 mg/L de O&G.

A Tabela 13 mostra as variáveis estudadas, seus níveis e os resultados experimentais obtidos nas condições dos ensaios.

Tabela 12. Caracterização do efluente de indústria de laticínios utilizado para os experimentos de otimização por delineamento fatorial.

Amostras / Análises	DQO (mg/L)	pH	O&G (mg/L)
Sobrenadante	4280 ± 61	4,3	50 ± 3
Sobrenadante mais gordura adicionada	5266 ± 100	5,0	3480 ± 39

Tabela 13. Delineamento fatorial 3^3 incompleto (BOX e BEHNKEN, 1960) aplicado na otimização do tratamento de efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Resultados experimentais obtidos para as respostas remoção de O&G, atividade enzimática no efluente, $[E]_{\text{eff}}$, e DQO.

Ensaio	Temperatura °C	pH	$[E]^*$ inicial U/L	Remoção de O&G, %	$[E]_{\text{eff}}^*$ U/L	Ácidos livres mmol/mL	DQO mg/L
1	25	5	47,2	0,0	1000	4,0	3626
2	35	5	47,2	19,8	900	2,6	4644
3	25	9	47,2	38,9	1200	0,4	6347
4	35	9	47,2	43,6	1500	0,0	7125
5	25	7	23,6	10,4	500	1,2	2719
6	35	7	23,6	35,7	1700	0,0	4077
7	25	7	70,8	10,0	2700	3,2	13611
8	35	7	70,8	21,2	2800	0,0	7372
9	30	5	23,6	1,1	300	2,7	2416
10	30	9	23,6	42,1	3300	3,0	6805
11	30	5	70,8	5,4	1800	2,1	4614
12	30	9	70,8	49,3	4800	2,2	13801
13	30	7	47,2	56,6	4700	0,1	4744
14	30	7	47,2	51,9	5100	0,1	3722
15	30	7	47,2	53,2	4900	0,1	3864

* $[E]_{\text{inicial}} = 23,6$ U/L, corresponde a 1 g do sólido fermentado adicionado a 1 L de efluente

* $[E]_{\text{eff}}$ = atividade enzimática detectada no efluente após 48 h de incubação.

5.5.1. Análise de variância para a resposta “Remoção de óleos e graxas”

A análise de variância para a resposta remoção de O&G, em função dos dados experimentais, está mostrada nas Tabelas 14 e 15. Os coeficientes obtidos a partir da ANOVA para o modelo matemático preditivo foram os seguintes:

$$\text{O\&G} = 53,93 + 8,65x_1 + 19,46x_2 - 17,74x_1^2 - 12,62x_2^2 - 16,84x_3^2$$

Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta de “remoção de óleos e graxas (%)” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2 = 0,98$

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Modelo	6611,077	9	734,564	29,042*	4,77
Erro	126,464	5	25,293		
Falta de ajuste	114,413	3	38,138	6,33 (ns)	6,34
Erro puro	12,051	2	6,025		

* significativo $p < 0,05$

ns = não significativo

O valor do coeficiente de determinação total (R^2) observado para a resposta “% remoção de O&G” foi de 0,98, mostrando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste para a equação foi não significativa (Tabela 14), indicando que a equação preditiva pode ser utilizada para qualquer combinação dos valores das variáveis analisadas dentro da região experimental estudada. Ainda pela análise de variância, os termos lineares das variáveis temperatura ($p=0,0099$) e pH ($p=0,0019$), foram significativos ao nível de 5 % ($p < 0,05$); para a concentração inicial de enzima $[E]_{\text{inicial}}$, apenas o termo quadrático ($p=0,006$) foi significativo. Além disso,

observou-se a relevância da interação entre temperatura e o pH ($p=0,042$). Esses resultados mostram a complexidade dos fenômenos que ocorrem durante o processo e mostram também que a aplicação do delineamento fatorial, que leva em conta as interações entre as variáveis, foi adequada para o presente estudo.

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a variável “remoção de óleos e graxas (%)” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
(1) Temperatura (L)	598,403	1	598,403	99,3116	0,009920
Temperatura(Q)	1162,480	1	1162,480	192,9264	0,005143
(2)pH (L)	3029,898	1	3029,898	502,8450	0,001983
pH (Q)	587,800	1	587,800	97,5519	0,010096
(3) [E]_{inicial} (L)	1,447	1	1,447	0,2401	0,672609
[E]_{inicial} (Q)	1046,707	1	1046,707	173,7125	0,005707
T x pH	132,918	1	132,918	22,0592	0,042466
T x [E]_{inicial}	49,358	1	49,358	8,1916	0,103474
pH x [E]_{inicial}	2,065	1	2,065	0,3427	0,617546

*Linear (L); Quadrática (Q); concentração inicial de enzima ($[E]_{inicial}$).

As curvas de nível da superfície de resposta para a variável “% remoção de O&G”, fixando-se a variável $[E]_{inicial}$ no nível zero (47,2 U/L de efluente), estão mostradas na Figura 18. A solução do modelo é dada por um ponto de sela, cujo ponto de máxima resposta é de 60% de remoção. Este valor é obtido dentro da região experimental nas faixas de temperatura de 29 a 32 °C e pH de 8,0 a 9,2.

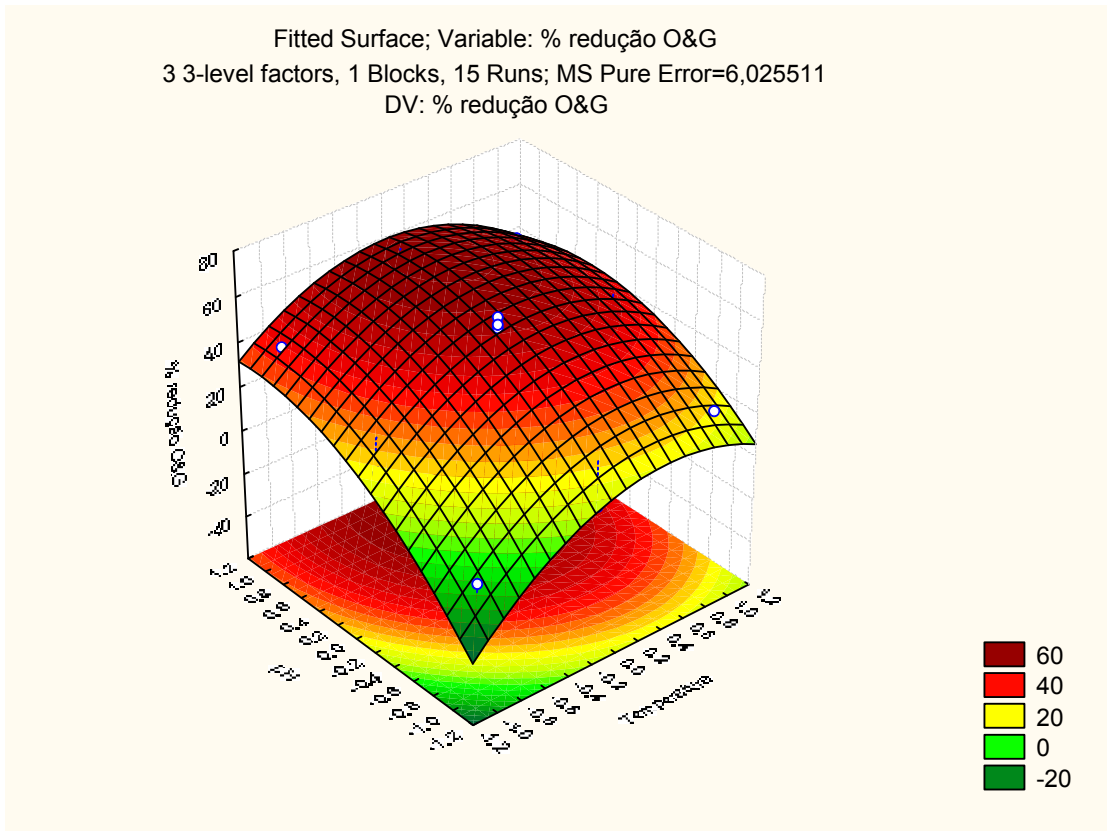


Figura 18. Superfície de resposta para a variável “% de remoção de óleos e graxas” no tratamento enzimático do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

O máximo de remoção de O&G previsto pelo modelo matemático foi de 60 %, partindo-se de uma concentração inicial de O&G de 348 mg/L. Comparando-se este valor com os obtidos nos ensaios preliminares, verifica-se que a remoção máxima obtida aqui foi 16 % menor, pois nos primeiros experimentos realizados com efluente autoclavado obteve-se 76 % de remoção em 48 h com uma concentração inicial de O&G similar (341 mg/L) e 90 % de remoção para concentração inicial de 167 mg/L. É provável que o aumento do teor de gordura no efluente precise de um maior teor de enzima adicionada. Salienta-se que a variável teor de gordura inicial não foi incluída neste delineamento devido à falta de reprodutibilidade detectada em ensaios

preliminares (ver item 5.3.1). A menor taxa de redução aqui prevista pelo modelo matemático pode ser devida à variação da composição do efluente em relação às amostras utilizadas nos experimentos anteriores. Além disso, outros parâmetros que não foram analisados neste trabalho, como a presença de detergentes e desinfetantes, por exemplo, podem ter contribuído para este resultado menor.

A remoção de lipídeos no efluente de indústria de laticínios foi promissora, visto que se trata de um efluente que é real, ou seja, a lipase produzida *B. cepacia* obteve um bom desempenho para remoção de gordura em um efluente onde podem existir inúmeros contaminantes que poderiam inibir a ação da enzima. Na maioria dos trabalhos utiliza-se um efluente sintético para o estudo da reação de hidrólise enzimática. Por exemplo, ROSA (2004) relatou a redução de O&G do efluente semi-sintético constituído por leite em pó desnatado, ácido nítrico, ácido fosfórico, hipoclorito de sódio, lauril-aquil sulfato e uma gordura obtida na unidade de tratamento de efluentes de uma indústria de laticínios. Houve remoção de aproximadamente 53 % no teor de O&G depois de 24 h de tratamento no biorreator aeróbio com volume útil de 3,4 L, sendo a concentração inicial do efluente de 400 mg/L. CAMMAROTA *et al.* (2001) trataram efluentes de laticínio em reator UASB, o qual foi operado com efluente pré-hidrolisado com lipases produzidas por *Penicillium restrictum*, obtendo-se o máximo de 90 % da remoção de O&G, sendo a concentração inicial do efluente de 800 mg/L. Por outro lado, JEGANAETHAN *et al.* (2006) reportaram a utilização de lipases imobilizadas de *Candida rugosa* (760 U/mg de lipase imobilizada em alginato de sódio) no pré-tratamento de efluente de indústria de rações para animais domésticos, com a remoção de 40 a 60 %,

após 3 dias incubação, com concentração inicial média de 83000 mg/L de O&G

5.5.2. Análise de variância para a resposta “Atividade enzimática detectada no efluente”

A análise de variância para a resposta atividade enzimática detectada no efluente, $[E]_{\text{efl}}$, em função dos dados experimentais está mostrada nas Tabelas 16 e 17. Os coeficientes obtidos a partir da ANOVA para o modelo matemático preditivo foram os seguintes:

$$[E]_{\text{efl}} = 4896,67 - 2349,58x_1^2 - 1382,08x_2^2$$

Tabela 16. Análise de Variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta “atividade enzimática detectada no efluente” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2 = 0,91$.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Modelo	35833,884	9	3981,543	5,84*	4,77
Erro	3410,492	5	682,098		
Falta de ajuste	3351,025	3	1117,008	37,57*	34,35
Erro puro	59,467	2	29,733		

* significativo $p < 0,05$

A falta de ajuste do modelo foi significativa ao nível de 5 % ($p < 0,05$), o que não invalida o modelo, pois a análise de variância para a equação apresentou um R^2 de 91 % (Tabela 16). A análise de variância do modelo quadrático (Tabela 17) mostra que os termos lineares – temperatura, pH e concentração inicial de enzima $[E]_{\text{inicial}}$, assim como os termos quadráticos – temperatura, pH - foram significativos ao nível de 5 % ($p < 0,05$).

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para a variável “atividade enzimática detectada no efluente” dos dados experimentais mostrados na Tabela 13.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
(1)Temp (L)	787512	1	787512	23,0043	0,040827
Temp (Q)	20383539	1	20383539	595,4296	0,001675
(2)pH (L)	2645000	1	2645000	77,2639	0,012697
pH (Q)	7052878	1	7052878	206,0237	0,004819
(3) [E] _{inicial} (L)	2989012	1	2989012	87,3129	0,011260
[E] _{inicial} (Q)	477416	1	477416	13,9459	0,064812
T x pH	32400	1	32400	0,9464	0,433241
T x [E] _{inicial}	2025	1	2025	0,0592	0,830510
pH x [E] _{inicial}	1464100	1	1464100	42,7683	0,022592

*Linear (L); Quadrática (Q); concentração inicial de enzima ([E]_{inicial}).

As curvas de nível da superfície de resposta para a variável $[E]_{\text{efl}}$ estão mostradas na Figura 19, onde foi fixada a temperatura em 30 °C. Similarmente ao obtido para a outra variável resposta “% de remoção de O&G” (Figura 18), a solução do modelo é dada por um ponto de sela, cujo ponto de máxima resposta é de 5000 U/L. Este valor é obtido dentro da região experimental nas faixas de pH de 7,0 a 8,3 e $[E]_{\text{inicial}}$ de 47,2 a 70,8 U/L. Estes resultados dão uma medida da atividade residual da enzima no efluente após 48 h de tratamento e mostram que a enzima tem atividade nas condições estudadas e que, portanto, pode ser utilizada para tratamento deste efluente.

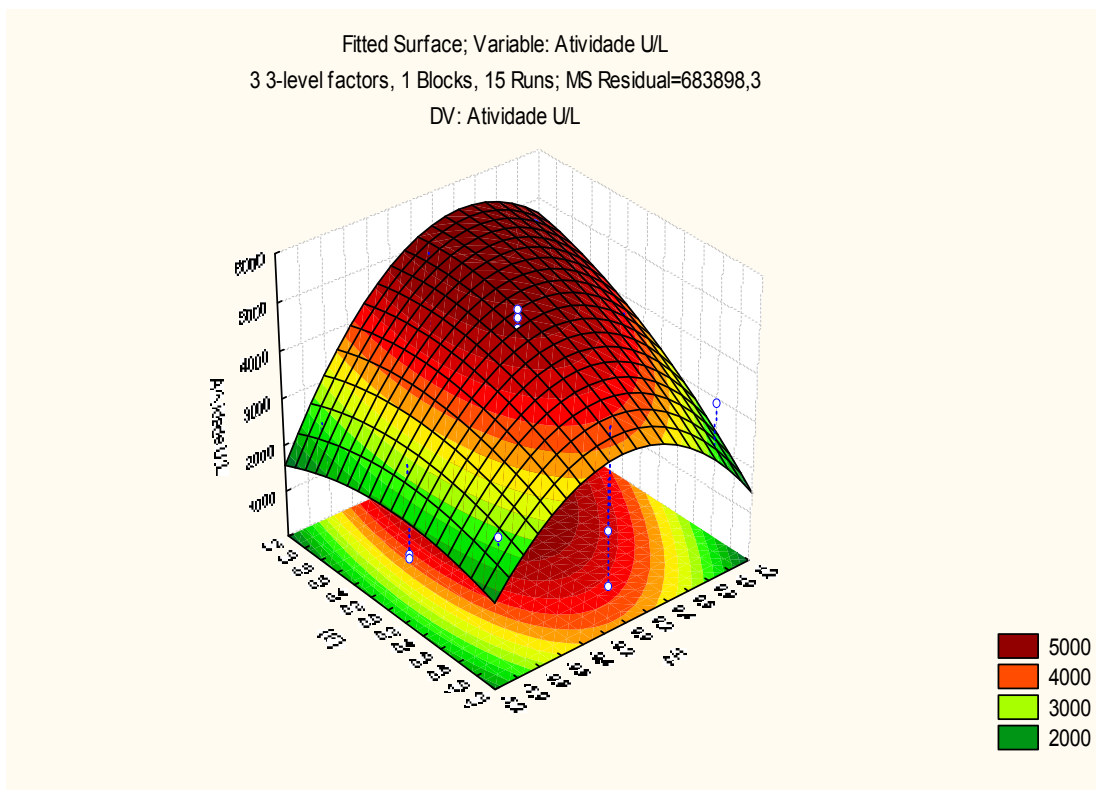


Figura 19. Superfície de resposta para a variável “atividade enzimática detectada no efluente” no tratamento enzimático do efluente de indústria de laticínios com o sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

5.5.3. Análise de variância para a resposta “Ácidos Livres”

A análise de variância para a resposta “ácidos livres” em função dos dados experimentais está mostrada na Tabela 18. O valor do coeficiente de determinação total (R^2) observado para a resposta ácidos livres foi de 0,73, mostrando que as variáveis estudadas não foram significativas para esta resposta, ou seja, não existem diferenças significativas no teor de ácidos livres na região experimental estudada.

Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta “ácidos livres” no efluente a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2 = 0,73$.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Modelo	22,30	9	2,48	1,6 (ns)	4,77
Erro	7,74	5	1,55		
Falta de ajuste	7,74	3	2,58		
Erro puro	0,00	2			

ns = não significativo

Este resultado pode ser explicado pelo tempo de incubação de 48 h, quando os ácidos livres já podem ter sido consumidos. Além disso, a baixa sensibilidade do método titulométrico pode causar erros quando o teor de ácidos livres é muito baixo.

5.5.4. Análise de variância para a resposta “demanda química de oxigênio (DQO)”

A análise de variância para a resposta DQO está mostrada nas Tabelas 19 e 20. Os coeficientes obtidos a partir da ANOVA para o modelo matemático preditivo foram os seguintes:

$$DQO = 4109,87 + 2581,61x_3$$

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) da equação quadrática para resposta de “DQO” a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13. $R^2= 0,79$

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Modelo	137.545,31	9	15.282,81	2,18(ns)	4,77
Erro	35.052,32	5	7.010,46		
Falta de ajuste	34.439,82	3	11.479,94	37,48*	6,34
Erro puro	612,50	2	306,25		

* significativo $p<0,05$

ns = não significativo

O valor do coeficiente de determinação total (R^2) observado para a resposta DQO foi baixo (0,79). A Tabela 19 mostra ainda que a falta de ajuste foi significativa ao nível de 5 % ($p<0,05$), o que faz com que o modelo preditivo seja não adequado. A análise de variância do modelo quadrático (Tabela 20) mostra que os termos lineares – pH e concentração da enzima inicial $[E]_{inicial}$, assim como os termos quadráticos pH e $[E]_{inicial}$ - foram significativos ao nível de 5 % ($p<0,05$).

Estes resultados de baixa correlação entre a DQO e as variáveis estudadas pode ser explicado pelas dificuldades de homogeneização das amostras, pois se determinou a DQO total do efluente (e não a solúvel) depois do tratamento enzimático. Isto também pode explicar as variações dos resultados da triplicata, que foram altas. Pode-se sugerir, para trabalhos futuros, a determinação da DQO solúvel.

Tabela 20. Análise da Variância (ANOVA) para a variável “DQO” a partir dos dados experimentais mostrados na Tabela 13.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
(1) Temperatura (L)	1188928	1	1188928	3,8822	0,187600
Temperatura(Q)	1712273	1	1712273	5,5911	0,141784
(2)pH (L)	32206492	1	32206492	105,1645	0,009375
pH (Q)	6500569	1	6500569	21,2264	0,044023
(3) [E]_{inicial} (L)	53317682	1	53317682	174,0993	0,005695
[E]_{inicial} (Q)	8005706	1	8005706	26,1412	0,036190
T x pH	2201247	1	2201247	7,1878	0,115512
T x [E]_{inicial}	26658841	1	26658841	87,0497	0,011293
pH x [E]_{inicial}	5753570	1	5753570	18,7873	0,049323

*Linear (L); Quadrática (Q); concentração inicial de enzima ($[E]_{inicial}$).

5.5.5. Validação do Modelo Matemático Obtido para a variável Remoção de Óleos e Graxas

As melhores condições obtidas na otimização foram de $[E]_{inicial}$ 47,2 U/L , pH 8,0 e temperatura 32 °C, para experimentos realizados com incubação de 48 h e concentração de O&G no efluente de 348 mg/L. Nestas condições, o máximo obtido (previsto pelo modelo) é de 60 % de remoção de O&G. Essas condições foram utilizadas para a validação do modelo, variando-se a amostra de efluente, proveniente de nova coleta, cuja concentração original de O&G foi de 255 ± 11 mg/L.

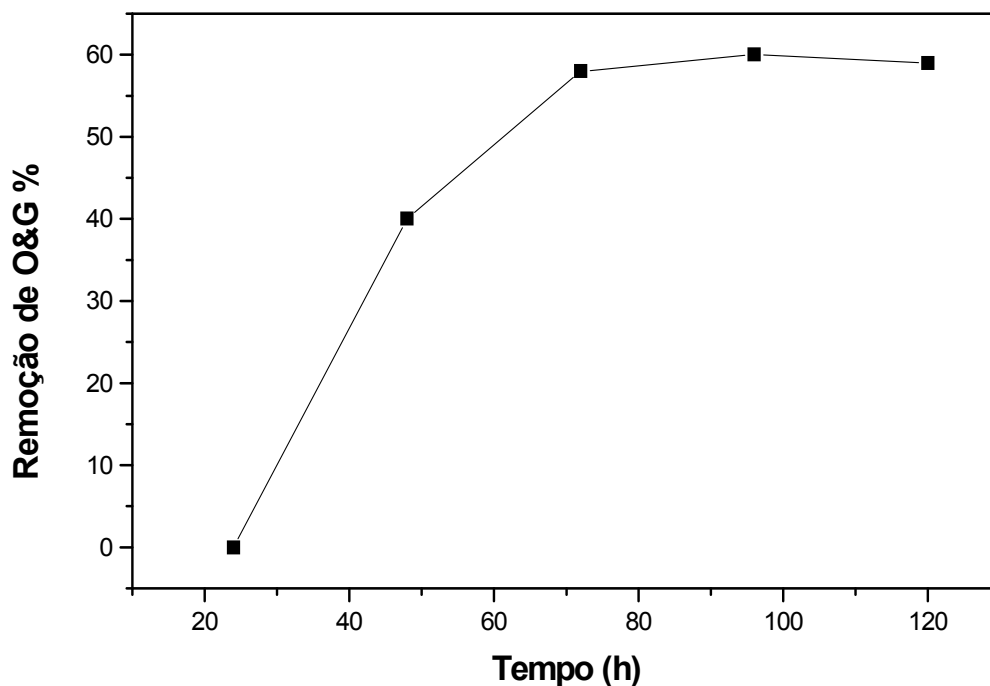


Figura 20. Curva de remoção de óleos e graxas no tratamento do efluente com lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Condições: concentração inicial de 255 mg/L de óleos e graxas, 0,2 % do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0, incubação 32 a °C e 150 rpm.

A Figura 20 mostra que, após 48 h de tratamento, obteve-se apenas 40% de remoção de O&G, sendo a máxima remoção (60%) atingida somente a partir de 72 h. Provavelmente este tempo mais longo para atingir-se o resultado esperado possa ter sido causado pela variação na composição do efluente, em termos de compostos que não foram avaliados no presente trabalho (detergentes e sanitizantes, por exemplo), conforme já mencionado anteriormente.

Estes resultados mostram que, mesmo tendo-se otimizado o tratamento para uma amostra padronizada de efluentes estudando-se variáveis

controladas (pH, temperatura, concentração de enzima), no processo real de geração e tratamento de efluentes por hidrólise enzimática outras variáveis deverão ser consideradas e que o processo enzimático pode funcionar, desde que se faça um controle da remoção de O&G para se determinar o tempo de interrupção do processo.

5.6. TESTES DE BIODEGRADABILIDADE

Os testes para determinação da biodegradabilidade do efluente tratado enzimaticamente foram feitos por dois métodos: (a) pela determinação da razão de biodegradabilidade (razão DBO_5/DQO) e (b) pela avaliação de biodegradabilidade aeróbia pelo método de Zahn-Wellens descrita em *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 302B,1996). Para estes testes, foi utilizada a amostra de efluente proveniente da mesma coleta e tratada nas condições do experimento anterior, contendo 255 ± 11 mg/L de O&G, com incubação de 72 h, quando ocorreu 60 % de remoção de O&G.

5.6.1. Determinação da Razão de Biodegradabilidade DBO_5/DQO

Para a determinação da razão de biodegradabilidade das amostras dos efluentes tratados e não tratados, as análises de DBO_5 e DQO foram feitas pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR (CEPPA). Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de DBO₅ e DQO e razão de biodegradabilidade (DBO₅/DQO) das amostras de efluente produzido pela Indústria de laticínios antes e após tratamento enzimático com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Amostras	Tempo de Tratamento (h)	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	Razão DBO5/DQO
Não tratado	-	3.920	1.150	0,3
Tratado	72	3.680	1377	0,4

Condições: concentração inicial de O&G de 255±11 mg/L, 0,2% do sólido fermentado (47,2U/L), pH 8,0, incubação a 32 °C e 150 rpm

Em comparação com a amostra não tratada, o processo de tratamento enzimático proporcionou um pequeno aumento da biodegradabilidade (de 0,3 para 0,4), mas que já pode ser considerado adequado para tratamento posterior, uma vez que processos biológicos convencionais, aeróbios ou anaeróbios, requerem uma razão de biodegradabilidade maior ou igual a 0,4 (MORAIS, 2005).

5.6.2. Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia

O teste empregado para a avaliação de biodegradabilidade foi o de Zahn-Wellens, que consiste na utilização de lodo ativado concentrado não aclimatado adicionado de amostras de efluente tratado e não tratado enzimaticamente. A cinética da degradação da matéria orgânica em termos de DQO pode ser observada na Figura 21.

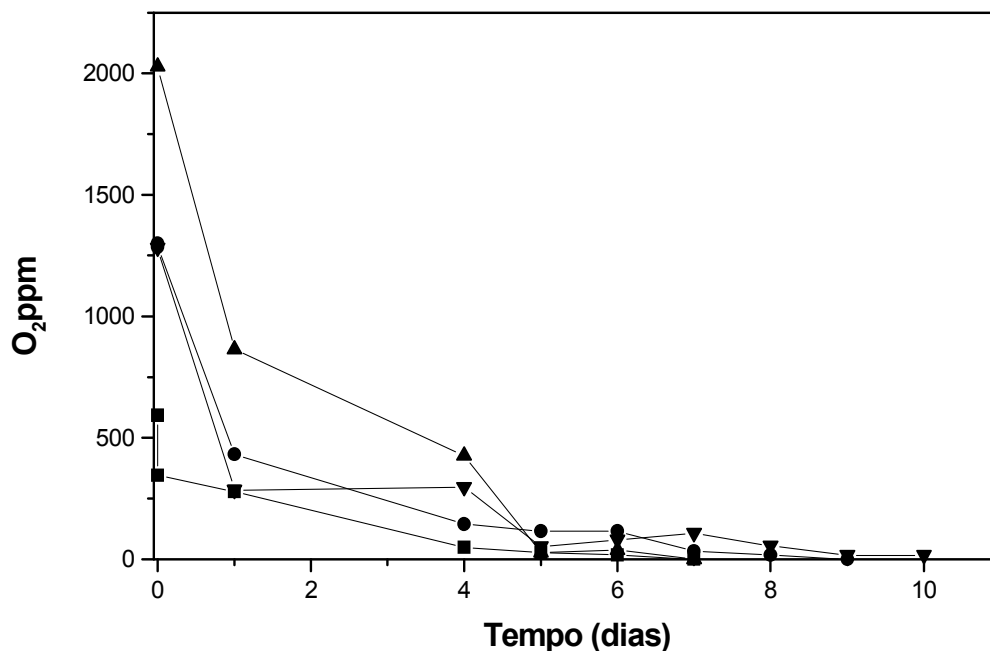


Figura 21. Biodegradabilidade aeróbia – teste de Zahn-Wellens. Variação da DQO em amostras de efluente tratado com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Controle com glucose (-▲-), efluente hidrolisado(-■-), efluente bruto (-●-), controle de dietilenoglicol (-▼-). Condições pré-hidrólise: concentração inicial de 255 ± 11 mg/L de óleos e graxas, 0,2 % do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0 incubação a 32 °C e 150 rpm.

Observou-se que os teores iniciais de DQO variaram significativamente para as duas amostras – 600 ppm para a amostra tratada e 1300 ppm para a amostra de efluente sem tratamento. Para a amostra tratada, observou-se uma cinética lenta de degradação até o quarto dia, para haver um consumo de 100 % da matéria orgânica depois de 7 dias. Já para a amostra não tratada, a partir do segundo dia, a redução de matéria orgânica é acentuada, mas ocorre uma remoção de 100 % apenas após 9 dias.

Neste teste, o dietilenoglicol foi empregado para testar a atividade microbiana presente no lodo ativado. Segundo o protocolo do teste, quando

uma solução de 0,5 g/L de dietilenoglicol é degradada em até 98 % num período de 10 a 12 dias, a atividade microbiana do lodo é considerada adequada. O padrão da glucose foi empregado para comprovar a atividade do lodo ativado não aclimatado nos primeiros dias, por ser facilmente biodegradável. O controle de dietilenoglicol mostrou que o lodo obteve boa atividade microbiana, pois no décimo dia de teste a biodegradação foi de 98 %; o controle de glucose apresentou o consumo da matéria orgânica total após 7 dias, como mostra a Figura 21.

Os resultados reportados na literatura em relação aos testes de biodegradabilidade diferem bastante entre si. ROSA (2004) utilizou biorreatores aeróbios e mostrou que, na faixa de concentração de O&G de 400 a 800 mg/L, não houve diferença significativa na remoção da DQO dos controles e das amostras tratadas enzimaticamente após 44 e 111 dias de teste. LEAL *et al.* (2006) também mostraram uma pequena diferença na remoção de DQO entre os reatores controle e hidrolisado, quando submetidos ao tratamento anaeróbio com reatores do tipo UASB, com as concentrações iniciais de 200, 600 e 1000 mg/L. A remoção de DQO no reator controle foi de 91, 88, 82 %, enquanto no reator alimentado com efluente hidrolisado a remoção de DQO foi de 90, 91 e 90 %, respectivamente. JUNG *et al.* (2002) observaram que, quando os biorreatores aeróbios foram alimentados com efluentes não tratados com as concentrações de 400 e 600 mg/L, houve assimilação da matéria orgânica pelo consórcio de microrganismos que foi introduzido no biorreator, apresentando uma eficiência na remoção da DQO de 86 % e 75 %, respectivamente. Porém, quando os biorreatores foram alimentados com efluente não tratado com a concentração de óleos e graxas de 800 mg/L, praticamente foi nula a eficiência

da remoção da DQO. Nos biorreatores alimentados com efluentes pré-hidrolisados enzimaticamente, a eficiência na remoção da DQO foi de 93 %, 92 % e 82 % para 400, 600 e 800 mg/L de concentração de óleos e graxas, respectivamente. VALLADÃO *et al.* (2007) também reportaram eficiência na remoção de DQO com efluente de teor de O&G de 1200 mg/L. O efluente foi pré-tratado com 0,1 % (m/V) de material fermentado, apresentando remoção de DQO de 85 %, enquanto no efluente bruto, esta foi de 53 %.

No presente trabalho, apesar de se ter obtido 100 % de degradação da matéria orgânica para o efluente bruto e para o pré-hidrolisado, os resultados obtidos na remoção da DQO mostram a importância do pré-tratamento enzimático, pois a remoção total da DQO no efluente hidrolisado se deu em dois dias a menos do que para o efluente não tratado. Além disso, o efluente hidrolisado tem uma carga orgânica inicial menor e já no tempo de adaptação com o lodo, sua remoção é de 42 %. Isto ocorre provavelmente devido ao tamanho das partículas de matéria orgânica, que no efluente pré-tratado são significativamente menores devido à degradação prévia das partículas de gorduras e proteínas pelas lipases e proteases presentes no meio, o que facilita a assimilação da matéria orgânica pelo consórcio microbiano (ROSA, 2004).

5.3.6.1. Avaliação de Sólidos Suspensos Totais (SST) no Lodo Ativado

O fornecimento de substratos e oxigênio aos microrganismos do lodo ativado proporciona crescimento da sua biomassa, que pode ser medido em termos de sólidos suspensos totais (SST). Assim, um aumento da biomassa está relacionado à boa biodegradabilidade do substrato, e a sua redução pode

ser entendida como falta de biodegradabilidade ou toxicidade do substrato (MORAIS, 2005).

Tabela 22. Valores de sólidos suspensos totais (SST) do lodo ativado utilizado durante o teste de biodegradabilidade mostrado na Figura 21. Substratos: glucose e dietilenoglicol, efluente não tratado e tratado enzimaticamente com a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Efluentes	Inicial (g/L)	1dia (g/L)	2dia (g/L)	5dia (g/L)	Final (g/L)
Tratado	2,7±0,2	2,7±0,1	4,6±0,2	4,1±0,4	4,9±0,4
Bruto	6,2±0,4	2,8±0,4	4,6±0,4	4,3±0,1	3,6±0,1
Glucose	2,3±0,9	2,8±0,1	3,5±0,2	3,1±0,1	3,1±0,2
Dietilenoglicol	2,9±0,7	2,4±0,1	3,8±0,5	3,0±0,2	4,0±0,4

Condições do efluente tratado enzimaticamente: concentração inicial de 255±11 mg/L de óleos e graxas, 0,2% do sólido fermentado (47,2 U/L), pH 8,0, incubação a 32 °C e 150 rpm

A Tabela 22 mostra que os controles de glucose e dietilenoglicol apresentaram um aumento de 35 % e 38 % de SST, respectivamente. No efluente não tratado o valor de SST foi reduzido em 42 %; já no efluente tratado enzimaticamente, o valor do SST aumentou 81 %, mostrando a boa biodegradabilidade do efluente.

6. CONCLUSÕES

Após estudo de tratamento de efluente de indústria de laticínio com lipases de *B. cepacia* LTEB11 produzidas por FES com o sólido fermentado adicionado diretamente ao efluente, pode-se concluir que:

Ensaio Prévios

- Houve remoção máxima de óleos e gorduras entre 70 e 80 % após 24 h de incubação para as amostras não autoclavadas; quando as amostras foram autoclavadas, a eficiência de remoção de óleos e gorduras chegou a 90 % depois de 48 h de incubação. Entretanto, não foi possível determinar o efeito do teor de gordura por falta de reprodutibilidade nos resultados.
- Os ácidos livres são produzidos entre 2 a 18 h depois do início do tratamento e depois consumidos pelos microrganismos presentes no efluente; quando as amostras são previamente autoclavadas, o consumo é mais lento.
- Estudos de crescimento de *B. cepacia* mostraram que a bactéria pode crescer no efluente e também produzir a lipase em quantidades significativas.

Otimização do processo de tratamento por delineamento fatorial

- As variáveis temperatura e pH isoladamente ($p=0,0099$ e $p=0,0019$ respectivamente) e a interação entre estas duas variáveis foram as mais importantes na resposta remoção de óleos e graxas. O modelo matemático ajustou-se bem aos dados experimentais ($R^2= 0,98$), sendo

as melhores condições previstas uma faixa de temperatura de 29 a 32 °C e pH de 8,0 a 9,2, onde se pode obter um máximo de 60 % de remoção de O&G após 48 h. Entretanto, não se conseguiu o resultado esperado quando se utilizaram as condições previstas pelo modelo para tratamento de amostras diferentes do efluente, obtendo-se 60 % de remoção de O&G somente após 72 h de incubação.

- Para a resposta atividade residual no efluente ($R^2= 0,91$), as melhores condições para o máximo de atividade foram uma faixa de temperatura de 29 a 32 °C e pH 7,0 a 8,2 onde se pode alcançar até 5000 U/L de atividade enzimática residual no efluente.
- Para a resposta DQO, o valor do coeficiente de determinação total (R^2) observado para a resposta foi de 0,79 e a falta de ajuste foi significativa, o que faz com que o modelo preditivo não seja adequado. Os termos lineares de pH ($p=0,009375$) e concentração inicial da enzima $[E]_{\text{inicial}}$ ($p=0,005695$) foram significativos ao nível de 5 % ($p<0,05$). A interação entre Temperatura e $[E]_{\text{inicial}}$ ($p=0,011293$), pH e $[E]_{\text{inicial}}$ ($p=0,049323$) também foram significativas.

Avaliação da Biodegradabilidade do Efluente

- A razão de biodegradabilidade DBO_5/DQO foi de 0,3 para efluente não tratado e 0,4 para efluente tratado.
- No teste de biodegradabilidade de Zahn-Wellens, a remoção de DQO foi de 100 %, tanto para o efluente tratado como para o não tratado. Porém, a remoção total da DQO no efluente hidrolisado ocorreu 48 h antes do que no efluente não tratado. Além disso, o efluente hidrolisado

apresentou uma carga orgânica inicial menor e já no tempo de adaptação com o lodo (3 h), a remoção de DQO foi de 42 %.

- No efluente não tratado, o valor de sólidos suspensos totais foi reduzido para 42 %; já no efluente tratado enzimaticamente, o valor da SST aumentou 81 %, evidenciando crescimento microbiano e a biodegradabilidade das amostras tratadas.
- Dessa forma, analisando-se os resultados de biodegradabilidade como um todo, a razão DBO_5/DQO , teste de Zahn-Wellens e o aumento da biomassa mostrado pelo aumento nos valores de SST, conclui-se que houve uma maior biodegradabilidade do efluente tratado enzimaticamente.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho que abre novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar os seguintes temas:

- Determinação do efeito do teor de gordura no tratamento enzimático, adequando-se o método de adição de gordura ao efluente;
- Estudo da variação da composição do efluente ao longo do tempo para estabelecer o seu efeito no tratamento enzimático;
- Estudo da influência de outros componentes no tratamento enzimático, como presença de sanitizantes e detergentes e tempo, entre outros;
- Estudo do tratamento enzimático de outros tipos de efluentes de indústrias de alimentos;
- Estudos de avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do efluente tratado enzimaticamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA-American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 19th ed., **American Public Health Association**, New York: 1995.

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

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455-475, 1960.

CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pré-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters** 23, 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**, 2006.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova** Vol, 27, No. 1, 146-156, 2004.

CONAMA 357 – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Legislação Ambiental Federal, **Resolução nº 357**, 2005. Disponível em: [www. Caema.ma.gov.br](http://www.Caema.ma.gov.br). Acesso em : 10/04/2007.

D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. Lixo municipal: **Manual de Gerenciamento Integrado**. 2. ed. (rev. e ampl.). São Paulo: IPT - CEMPRE, 2000.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. (Ed).

Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 269-292.

EL-BESTAWY, E., EL-MASRY, M. H., EL-ADL, N.E. The potentiality of free gram negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21, 815-822, 2004.

FERNANDES, M.L.M; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 44, 8-13, 2007.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Curitiba. Tese (doutorado Universidade Federal do Paraná). 122f, 2006.

GIORDANO, G. **Tratamento e Controle de Efluentes Industriais**. Apostila. UFMT, 2004

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

IAP –.INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Lei Estadual de Resíduos nº 12.493/99**, 2003. Disponível em < <http://www.pr.gov.br/iap>> Acesso em: 12/07/2006.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual do Cadastro Técnico Federal, Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/ctf/manual/html/044200.htm>. Acesso em: 27/09/2006

ILLANES, A. Biotecnología de enzimas. **Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso**, Chile, 1994.

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

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

JAEGER , K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Vol. 26, p. 37-46, 2002.

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 B** Vol. 137, p.121-128, 2006.

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**, Vol. 24, p. 1797-1802, 2002.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, D.B.; SUZZI, G.; MASTROCOLA, D.; GUERZONI, M.E. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresource Technology**, Vol. 96, 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**, Vol. 19, 2, 2002.

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

LIMA, V.M.G. **Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocalise em Solventes Orgânicos.** Curitiba. 151 f. Tese (Doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná), 2004.

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

MASSE, L.; MASSÉ, D.I.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Neutral fat hydrolysis and long-chain fatty acid oxidation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Biotechnology and Bioengineering.** Vol. 79 p. 43-52, 2002.

MATSUMIYA, Y.; WAKITA, D.; KIMURA, A.; SANPA, S.; KUBO, M. Isolation and characterization of a lipid-containing wastewater treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** vol. 103, p. 325-330, 2007.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos,** Curitiba. Dissertação (Mestrado Universidade Federal do Paraná). 99f, 2007.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F. Biotratamento para redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos. CD-ROM - XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - **SINAFERM,** 2003, Florianópolis Anais do congresso, Florianópolis UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; JÚNIOR, A.F. Aplicação de lípases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova,** Vol.28, p.296-305, 2005.

MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion.

Biochemical Engineering journal , Vol. 32, p.185-190, 2006.

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

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, Vol.13, p.137-147, 2003.

MITCHELL, David A (Org.); KRIEGER, N. (Org.) ; BEROVIC, Marin (Org.) .

Solid state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation. 1^a. ed. Heidelberg: Springer,. Vol. 01. 447 p. 2006.

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

MORAIS, J.L. **Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados, isolados e integrados com processos biológicos tradicionais, para tratamento de chorume de aterro sanitário**. Curitiba. Tese (doutorado Universidade Federal do Paraná). 229f, 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT
OECD, 1981 Guideline for testing of chemicals: **Test 302 B**, Vol. 2, 1996.

OMIL, F.; GARRIDO, J.M.; ARROJO, B.; MÉNDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale.

Water Research. Vol. 37, p. 4099-4108, 2003

MYERS, R.H. Response surface methodology. **Boston, Alin and Bacon**, p. 126-95, 1971.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.;

THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology.

Biotechnology Applied Biochemistry. Vol.29, p. 119-131, 1999

PANDEY, A. Lipases. In: Kademi, A.; Leblanc, D., Houd, A.; Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. **The Haworth Pres.**,. New York: p.552-560, 2004.

PEREIRA, E. B. CASTRO, H.F. de; FURIGO JÚNIOR, A. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*. CD-ROM – XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - **SINAFERM**, 2003, Florianópolis Anais do congresso, Florianópolis UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

RIGONI, R. E.; RIGO, E.; FREIRE, D.M.G.; De OLIVEIRA, D.; Di LUCCIO, M. Utilização de lipases como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes. CD-ROM - XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - **SINAFERM**, 2003, Florianópolis Anais do congresso, Florianópolis UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

ROSA, D. R. **Tratamento Enzimático/Biológico de Efluentes com Alto Teor de Gordura, Rio de Janeiro. Dissertação** (Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro). 107f, 2004.

SALUM, T.F.C; BARON, A.M; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Ester synthesis by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2007 (*in press*).

SATO, K.; SHIGETOSHI, S. Small-scale solid-state fermentations. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. A.L. Demain & J.E. Davies (eds) 2nd ed. ASM Press, Washington DC, pp. 61-79, 1999.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.J.;

SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**. v. 5, n. 12, p. 187-202, 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Vol. 19, p.627-662, 2001.

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

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 & Biodegradation**, Vol. 60, p. 219-225, 2007.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Tibtech**, Vol. 15, p. 32-38, 1997.

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

VON SPERLING, M. (1997). Lodos ativados. Em: **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Vol. 4, 2ª ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG - Belo Horizonte.

WINKLER, U. K. E STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronat, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal Bacteriology**, Vol. 3, p. 663-670, 1979.

ZUCCARI, M. L. A. digestão pelo “calor de diluição” e a determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes. **Tese (Doutorado)**, Botucatu, 1996.